

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE**

Spécialité : BIOCHIMIE

Par
Laurent DUCA

**Etude des voies de signalisation activées par les peptides
d'élastine dans les fibroblastes dermiques humains :**

**Application à la régulation de la production de la
pro-MMP-1 dans le cadre de la réaction stromale**

Soutenue publiquement le 9 décembre 2004

JURY

- Président :** L. MARTINY, Professeur des Universités, Reims
- Rapporteurs :** M.P. JACOB, Directeur de Recherche CNRS, Paris
A. MAUVIEL, Directeur de Recherche INSERM, Paris
- Examineurs :** F.X. MAQUART, Professeur des Universités, Reims
P. SOMMER, Directeur de Recherche CNRS, Lyon
- Membre Invité :** W. HORNEBECK, Directeur de Recherche CNRS, Reims
- Directeur de thèse :** L. DEBELLE, Maître de Conférences des Universités, HDR, Reims

Sommaire

Liste des abréviations utilisées	V
Liste des figures	VIII
Listes des tableaux	XI
Introduction	1
Introduction Générale	2
I. L'élastine	4
I.1. <u>Les fibres élastiques</u>	4
I.2. <u>Présentation de l'élastine</u>	5
I.3. <u>Structure de l'élastine</u>	6
I.4. <u>La tropoélastine</u>	6
I.4.1. <i>Contrôle de l'expression</i>	6
I.4.2. <i>Nature</i>	8
I.4.3. <i>Modifications post-traductionnelles</i>	12
I.4.4. <i>Sécrétion et assemblage</i>	13
I.5. <u>Les peptides d'élastine</u>	16
I.5.1. <i>Nature et Origine</i>	16
I.5.2. <i>Activités biologiques des peptides d'élastine</i>	17
I.6. <u>Maladies affectant les fibres élastiques</u>	20
II. Le complexe récepteur de l'élastine	22
II.1. <u>Présentation</u>	22
II.2. <u>Sous-unités constitutives</u>	22
II.2.1. <i>L'EBP</i>	22
II.2.2. <i>La Protéine Protectrice ou Cathepsine A</i>	24
II.2.3. <i>La Neuraminidase</i>	24
II.3. <u>Ligands identifiés de l'EBP</u>	25
II.4. <u>Rôles du complexe récepteur de l'élastine</u>	27
II.4.1. <i>Rôle dans la synthèse des fibres élastiques</i>	27
II.4.2. <i>Rôle dans la signalisation cellulaire</i>	28
III. Les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs)	30
III.1. <u>Classification</u>	31
III.2. <u>Structure</u>	33
III.3. <u>Régulation</u>	35
III.3.1. <i>Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle</i>	35
III.3.2. <i>Régulation de l'activation</i>	38
III.3.3. <i>Régulation de l'activité</i>	38
III.4. <u>Rôle des MMPs dans la dégradation de la MEC</u>	40
III.4.1. <i>Renouvellement physiologique de la MEC</i>	40
III.4.2. <i>L'invasion tumorale et la formation des métastases</i>	41
IV. Voies de signalisation	44
IV.1. <u>Promoteur du gène de la MMP-1 et facteurs de transcription</u>	44

IV.2. <u>Les voies de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)</u>	46
IV.2.1. <u>La voie p38</u>	49
IV.2.2. <u>La voie JNK</u>	50
IV.2.3. <u>La voie ERK1/2</u>	51
IV.2.3.1. <u>La kinase Raf-1</u>	52
IV.2.3.2. <u>La kinase B-Raf</u>	54
IV.3. <u>Les radeaux lipidiques</u>	59
IV.3.1. <u>Rôle des radeaux lipidiques en signalisation cellulaire</u>	60
IV.3.2. <u>Rôle des gangliosides en signalisation cellulaire</u>	63
But du travail	68
Matériels et Méthodes	69
I. Modèle cellulaire utilisé	70
II. Préparation de la kappa-élastine (kE)	71
III. Culture cellulaire	71
III.1. <u>Obtention de fibroblastes dermiques à partir d'explants de peau</u>	71
III.2. <u>Obtention de sous-culture par trypsinisation</u>	72
III.3. <u>Mise au repos des cellules</u>	72
III.4. <u>Stimulation des cellules</u>	73
IV. Transfection des fibroblastes dermiques humains	73
IV.1. <u>Plasmides utilisés</u>	73
IV.1.1. <u>pEGFP-C1</u>	73
IV.1.2. <u>pRK5-βARK1-CT</u>	74
IV.1.3. <u>pECE-HA-ERK1</u>	74
IV.1.4. <u>pSV₂-RasNI7</u>	74
IV.1.5. <u>pDC516</u>	75
IV.2. <u>Transfection transitoire de fibroblastes dermiques humains</u>	75
V. Méthodes d'analyse des protéines	76
V.1. <u>Obtention d'extraits cellulaires</u>	76
V.2. <u>Western-blot (immunodétection des protéines)</u>	76
V.3. <u>Immunoprécipitation</u>	81
V.4. <u>Test d'activité PI3K</u>	81
V.5. <u>Test d'activité protéine kinase (Raf-1 et B-Raf)</u>	82
V.6. <u>Détermination de l'état d'activation de HA-ERK1</u>	83
V.7. <u>Extraction des protéines nucléaires</u>	83
V.8. <u>Gel-shift (ou retard sur gel)</u>	84
V.9. <u>Mesure d'activité Neuraminidase <i>in vivo</i></u>	85
VI. Dosage Radioimmunologique de l'AMPc	85
VII. Extraction et analyse des gangliosides	86
VII.1. <u>Extraction des glycolipides</u>	86
VII.2. <u>Analyse par HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)</u>	86
VIII. Analyse de la colocalisation EBP-radeaux lipidiques par immunocytochimie	87
VIII.1. <u>Immunomarquage de l'EBP à la surface des fibroblastes</u>	87

VIII.2. <u>Marquage des radeaux lipidiques</u>	88
IX. Inhibiteurs chimiques utilisés	89
IX.1. <u>U0126, inhibiteur de MEK1/2</u>	89
IX.2. <u>SB203580, inhibiteur de p38</u>	90
IX.3. <u>SP600125, inhibiteur de JNK</u>	90
IX.4. <u>GF109203X, inhibiteur de PKC</u>	91
IX.5. <u>LY294002, inhibiteur de PI3K</u>	91
IX.6. <u>H-89, inhibiteur de PKA</u>	92
IX.7. <u>L'acide 2,3-désoxy-2-déhydro-N-acétylneuraminique (DANA), inhibiteur de neuraminidase</u>	92
X. Analyse statistique des résultats obtenus	93
Résultats	94
1ère partie	
<i>Les peptides d'élastine induisent la production de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques via l'activation de la voie ERK1/2 par les modules AMPC / PKA / B-Raf / MEK1/2 et protéine G_v/G₀ / p110γ / Raf-1 / MEK1/2</i>	95
I. La kE induit la production de pro-MMP-1 via les voies ERK1/2, PKA et PI3K	96
I.1. <u>Influence de l'inhibition des voies ERK1/2, JNK1/2 et p38 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE</u>	96
I.2. <u>La kE induit l'activation de facteurs de transcription de la famille AP-1 via la voie ERK1/2</u>	99
I.3. <u>La production de pro-MMP-1 par la kE implique les kinases PKA et PI3K</u>	100
I.3.1. <i>Influence de l'inhibition des PKC sur la production de pro-MMP-1</i> ...	100
I.3.2. <i>Effet de la kE sur la production d'AMPC et rôle de ce second messenger dans la production de pro-MMP-1</i>	101
I.3.3. <i>Effet de l'inhibition des PKA sur la production de pro-MMP-1 stimulée par la kE</i>	103
I.3.4. <i>Effet de l'inhibition des PI3K sur la production de pro-MMP-1 stimulée par la kE</i>	105
II. Les peptides d'élastine activent la voie ERK1/2 par un mécanisme indépendant de Ras impliquant les voies p110γ / Raf-1 / MEK1/2 et PKA / B-Raf / MEK1/2	107
II.1. <u>La kE active MEK1/2 et ERK1/2, mais pas p38 ni JNK1/2</u>	107
II.2. <u>MEK1/2 et ERK1/2 sont activées de manière dépendante de PKA et PI3K</u>	109
II.2.1. <i>Influence du LY294002 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2</i>	109
II.2.2. <i>Influence du H-89 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2</i>	110
II.2.3. <i>Les voies PI3K et PKA sont additives</i>	111
II.3. <u>La PI3K est responsable de l'activation de Raf-1</u>	112
II.3.1. <i>La kE induit la phosphorylation de Raf-1 sur S338</i>	112
II.3.2. <i>La phosphorylation de Raf-1 sur S338 est régulée par la PI3K</i>	113
II.3.3. <i>Raf-1 est activé par la kE de manière PI3K-dépendante</i>	115
II.4. <u>Les peptides d'élastine activent p110γ, PI3K de classe Iβ</u>	116

II.5. <u>p110γ est activée par les sous-unités $\beta\gamma$ dérivées d'une protéine G hétérotrimérique sensible à la toxine pertussique.....</u>	118
II.5.1. <u>p110γ est activée par une protéine G sensible à la toxine pertussique.....</u>	118
II.5.2. <u>La PTX inhibe la phosphorylation de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2</u>	120
II.5.3. <u>p110γ est activée par les sous-unités $\beta\gamma$ dérivées de la protéine G</u>	121
II.6. <u>B-Raf est exprimé par les fibroblastes dermiques humains et activé par la kE via un mécanisme PKA-dépendant</u>	123
II.7. <u>Le mécanisme d'activation de la voie ERK1/2 par la kE est indépendant de Ras</u>	126
2^{ème} partie	
<i>Etude préliminaire du mécanisme de fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine : importance des radeaux lipidiques et de la neuraminidase</i>	129
I. Evaluation bioinformatique du rôle potentiel de l'interaction Neu-1 – effecteurs de signalisation dans la transduction du signal du récepteur de l'élastine	130
I.1. <u>Recherche de similitudes entre Neu-1 et des récepteurs de signalisation</u>	131
I.2. <u>Recherche de motifs, domaines ou sites consensus connus.....</u>	132
II. Rôle de l'activité catalytique de Neu-1 dans la transduction du signal du récepteur de l'élastine.....	133
II.1. <u>Effet de la stimulation de l'EBP sur l'activité neuraminidase à la membrane plasmique des fibroblastes dermiques humains.....</u>	133
II.2. <u>Influence du DANA sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE.....</u>	135
II.3. <u>Influence du DANA sur l'activation de ERK1/2.....</u>	136
III. Rôles des radeaux lipidiques et du couple GM3-lactosylcéramide dans la transduction du signal du complexe récepteur de l'élastine	137
III.1. <u>Rôle des radeaux lipidiques dans le fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine</u>	138
III.1.1. <u>L'EBP et les radeaux lipidiques sont colocalisés.....</u>	138
III.1.2. <u>Les radeaux lipidiques sont cruciaux pour le fonctionnement du récepteur de l'élastine</u>	139
III.2. <u>Influence de la kE sur la production de lactosylcéramide.....</u>	140
Conclusions, Discussion et Perspectives.....	142
Publications et Communications	158
Références	163

Liste des abréviations utilisées

ABP-280	<i>Actin-Binding Protein 280</i>
ADAM	<i>A Desintegrin And Metalloproteinase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine 3',5'- monophosphate cyclique
AP-1 et 2	<i>Activator Protein-1 et 2</i>
AP2	<i>Adaptator Protein complex 2</i>
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ASK	<i>Apoptosis Signal-regulated Kinase</i>
ATF-2	<i>Anti-Activating Transcription Factor-2</i>
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
b-FGF	<i>basic-Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
C/EBP- β	<i>CCAAT/enhancer binding protein β</i>
CREB	<i>cAMP-Response Element Binding Protein</i>
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EBP	<i>Elastin Binding Protein</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
Elk-1	<i>ETS-like transcription factor-1</i>
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FDH	Fibroblaste Dermique Humain
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
GAP	<i>GTPase-Activating Protein</i>
GCK	<i>Germinal Center Kinase</i>
GD	<i>Ganglioside Disialo-</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factors</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM	<i>Ganglioside Monosialo-</i>
GMPc	Guanosine 3',5'- monophosphate cyclique
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GT	<i>Ganglioside Trisialo-</i>
HA	Hémagglutinine
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HPK	<i>Hematopoietic Progenitor Kinase</i>
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
HUVECS	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IP	Immunoprécipitation
IP ₃	<i>Inositol 3, 4, 5- trisphosphate</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>

JNK/SAPK	<i>c-jun N-terminal kinase / Stress Activated Protein Kinase</i>
kb	<i>kilobase</i>
kD	Constante de dissociation
kDa	<i>kiloDalton</i>
kE	<i>kappa-élastine</i>
LAT	<i>Linker for Activation of T cells</i>
LRP	<i>LDL receptor-Related Protein</i>
MAGP-1	<i>Microfibrills associated glycoprotein 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MCD	Méthyl- β -cyclodextrine
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
MEF2C	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
MKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MLK	<i>Mixed Lineage Kinase</i>
MM	Masse Moléculaire
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MT-MMP	<i>Membrane Type-MMP</i>
Muf-NANA	Acide 4-méthylumbelliferyl-N-acétyl- α -D-neuraminique
NADH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADPH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
Nase	<i>Neuraminidase</i>
Neu-1	<i>Neuraminidase 1</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor- kappa Binding</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
pb	Paire de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCPE	<i>Procollagen-C-terminal proteinase enhancer protein</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinases</i>
PEA3	<i>Polyoma Enhancer A binding protein-3</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PI3-P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate</i>
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKG	Protéine Kinase G
PLA2	<i>Phospholipase A2</i>
PMNn	Polymorphonucléaires neutrophiles
PP	Protéine Protectrice
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>

PTX	<i>Pertussis Toxin</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
REGF	Récepteur de l'EGF
RFGF	Récepteur du FGF
RPDGF	Récepteur du PDGF
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
SAP-1	<i>SRF-associated protein 1</i>
SBE	<i>STAT binding element</i>
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SEK1	<i>SAPK/ERK kinase 1</i>
Serpins	<i>Serine proteases inhibitors</i>
S-Gal	<i>Spliced Galactosidase</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SP1	<i>Specific Protein 1</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAK	<i>TGF-β Activated Kinase</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
TFPI2	<i>Tissue-factor pathway-inhibitor-2</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIE	<i>TGF-β inhibitory element</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TPA	<i>12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate</i>
UV	Ultra-Violet
α E	<i>alpha-élastine</i>
β ARK1	<i>β-adrenergic receptor kinase 1</i>
β -Gal	<i>β-Galactosidase</i>

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de peau illustrant la position du derme	5
Figure 2 : Modèles structuraux proposés de l'élastine	7
Figure 3 : Séquence codée par les différents exons du gène de l'élastine humaine.....	9
Figure 4 : A) Structure de l'ADNc de la tropoélastine et B) Séquence d'acides aminés de quelques domaines typiques	11
Figure 5 : Description schématique de la synthèse de l'élastine.....	14
Figure 6 : Structure et voie de synthèse des desmosines et isodesmosines	15
Figure 7 : Schéma représentant l'épissage du transcrit primaire de la β -Gal générant la forme S-Gal (<i>Spliced Galactosidase</i>), correspondant à l'EBP	23
Figure 8 : Résumé des données de la littérature concernant les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine	29
Figure 9 : Organisation modulaire des MMPs	34
Figure 10 : Eléments de régulation des régions promotrices de quelques MMPs.	36
Figure 11 : Schéma d'activation des pro-MMPs.....	39
Figure 12 : L'invasion tumorale.....	42
Figure 13 : Expression des MMPs et des TIMPs lors de l'invasion tumorale.....	43
Figure 14 : Sites de fixation pour des éléments de régulation présents dans le promoteur du gène de la MMP-1.	44
Figure 15 : Représentation d'un dimère c-Fos/c-Jun lié à l'ADN	45
Figure 16 : Cascades de signalisation MAPKs.	47
Figure 17 : PI 3-kinases et protéines présentant des homologies avec les PI 3-kinases.	53
Figure 18 : Cycle d'activation et de désactivation des protéines G hétérotrimériques.	56
Figure 19 : Voies d'activation des MAPK ERK1/2 par Raf-1 et B-Raf illustrant les différents mécanismes d'activation de Raf-1 et B-Raf et la possibilité d'activer la voie ERK1/2 par les récepteurs couplés aux protéines G	58
Figure 20 : Mécanismes d'induction de la signalisation cellulaire dans les radeaux lipidiques.	62

Figure 21 : Structure développée d'un ganglioside, le GM1	63
Figure 22 : Structures et voies de biosynthèse des gangliosides.....	64
Figure 23 : Mécanisme de l'inhibition du REGF par le GM3	65
Figure 24 : Mécanisme d'inhibition du récepteur du FGF par le GM1	66
Figure 25 : structure chimique du U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene)	89
Figure 26 : Structure chimique du SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole)	90
Figure 27 : Structure chimique du SP600125 (Anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one 1,9- pyrazoloanthrone).....	90
Figure 28 : Structure chimique du GF109203X 2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide.....	91
Figure 29 : Structure chimique du LY294002 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one.....	91
Figure 30 : Structure chimique du H-89 N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide.....	92
Figure 31 : Structure chimique de l'acide 2,3-désoxy-2-déhydro-N-acétylneuraminique	92
Figure 32 : Analyse par western-blot de l'effet du U0126 (A) et du SB203580 (B) sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE.....	97
Figure 33 : Analyse par western-blot de l'effet du SP600125 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE	98
Figure 34 : Analyse de l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 par technique de gel-shift.....	99
Figure 35 : Analyse par western-blot de l'effet du GF109203X sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE	101
Figure 36 : Effet de la kE sur la production d'AMPC par les fibroblastes dermiques et influence de la forskoline sur la production de pro-MMP-1	102
Figure 37 : Influence du H-89 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE	104
Figure 38 : Influence du LY294002 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE	105
Figure 39 : Effet de la kE sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2	107
Figure 40 : Effet de la kE sur l'activation de JNK1/2 et p38.....	108

Figure 41 : Effet du LY294002 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 induite par la kE ..	109
Figure 42 : Effet du H-89 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 induite par la kE	110
Figure 43 : Effet cumulatif du H-89 et du LY294002 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 induite par la kE	111
Figure 44 : Influence de la kE sur la phosphorylation de Raf-1 sur S338	113
Figure 45 : Effet du LY294002 sur la phosphorylation de Raf-1 (S338) induite par la kE..	114
Figure 46 : Effet de la kE et du LY294002 sur l'activité kinase de Raf-1	115
Figure 47 : Effet de la kE sur l'activité des PI3K de classe I _A et I _B	117
Figure 48 : Effet de la PTX sur l'activité p110 γ stimulée par la kE	119
Figure 49 : Effet de la PTX sur la phosphorylation de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2	120
Figure 50 : Effet du peptide β ARK1-CT sur l'activité p110 γ stimulée par la kE.....	122
Figure 51 : Effet de la kE et du H-89 sur l'activité kinase de B-Raf	125
Figure 52 : Effet de RasN17 sur l'activation de ERK1-HA.....	127
Figure 53 : Recherche de similitudes entre la séquence de Neu-1 et les protéines recensées au sein de la SWISS-PROT (analyse effectuée le 22/06/04).....	131
Figure 54 : Recherche de motifs, domaines et séquences consensus potentiels au sein de la séquence protéique de Neu-1 avec Prosite et la fonction Feature Aligner de l'entrée Neu-1 (Q99519) de la Swiss-Prot (analyse du 22/06/04).	132
Figure 55 : Mesure d'activité Neuraminidase à la membrane plasmique des fibroblastes dermiques	134
Figure 56 : Effet du DANA sur la sécrétion de pro-MMP-1	135
Figure 57 : Effet du DANA sur l'activation de ERK1/2.....	136
Figure 58 : Analyse en microscopie confocale du marquage des radeaux lipidiques et de l'EBP	138
Figure 59 : Effet de la MCD sur l'activation de ERK1/2 stimulée par la kE	139
Figure 60 : Analyse par HPTLC de la production de lactosylcéramide induite par la kE....	140
Figure 61 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine dans les fibroblastes dermiques régulant l'expression de la pro-MMP-1	157

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Effets biologiques des peptides d'élastine en fonction de leur nature et des cellules cibles.	18
<u>Tableau 2</u> : Constantes de dissociation déterminées pour différents peptides d'élastine vis à vis de leur récepteur et nombre de récepteurs par cellule établi pour divers types cellulaires	27
<u>Tableau 3</u> : Récapitulatif des Métalloprotéinases Matricielles et de leurs substrats.....	32
<u>Tableau 4</u> : Sous-unités des protéines G hétérotrimériques et quelques unes de leurs cibles	55
<u>Tableau 5</u> : Protéines et lipides impliqués dans la signalisation cellulaire trouvés dans les radeaux lipidiques	61
<u>Tableau 6</u> : Anticorps utilisés en western-blot (WB) et immunoprécipitation (IP).....	78
<u>Tableau 7</u> : Anticorps et réactifs utilisés en immunocytochimie	89

Introduction

Introduction générale

La Matrice Extracellulaire (MEC) est un réseau tridimensionnel de macromolécules (collagènes, élastine, glycoprotéines (laminines, fibronectine...), glycosaminoglycannes). Elle a longtemps été considérée comme un simple support architectural pour les cellules permettant la cohésion des tissus.

Il est maintenant acquis que cette structure en perpétuel renouvellement est un environnement dynamique instructif pour les cellules et qu'il régule diverses fonctions cellulaires fondamentales telles que l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie [Schenk et Quaranta, 2003].

Des domaines trouvés à la surface de diverses protéines, matricielles ou non, ont la capacité d'induire des signaux intracellulaires influençant le comportement des cellules. La protéolyse de ces molécules peut libérer ces domaines, ce qui leur permet d'exercer leur fonction hors des protéines auxquelles ils appartiennent. Cependant, dans le cadre des protéines de la MEC, l'émergence du concept de sites cryptiques a élargi notre connaissance des mécanismes par lesquels la matrice influence le comportement cellulaire. Le terme cryptique se réfère à des sites fonctionnels enfouis dans la structure de la MEC, n'étant donc pas exposés à la surface de la protéine les possédant [Davis et al, 2000]. Ce sont donc des sites latents. L'activation de ces sites requiert des modifications structurales des composants de la matrice pouvant avoir lieu soit par changement de conformation, soit par clivage protéolytique. Chacun de ces processus conduit à exposer le site cryptique qui peut alors être reconnu par les cellules et ainsi exercer son activité.

Les modifications conformationnelles de la matrice peuvent être dues à des tensions générées par les cellules elles mêmes, ou par la liaison d'autres molécules matricielles à des récepteurs membranaires. La libération de peptides biologiquement actifs suite à un clivage protéolytique a conduit à la notion de matrikine. Il en découle le concept de matricryptine quand le peptide matriciel est cryptique.

Différents types d'enzymes peuvent être impliqués dans ce clivage, et notamment les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs ou *Matrix MetalloProteinases*). Toutefois, de nombreux autres types de protéases participent activement à la dégradation de la matrice, et

particulièrement les sérine protéases appartenant au système plasminogène-plasmine, étroitement liées au mécanisme d'activation des MMPs.

La protéolyse matricielle peut avoir lieu dans des conditions physiologiques telles que le remodelage matriciel ou la cicatrisation, mais aussi dans des processus physiopathologiques tels que l'inflammation ou le cancer. Dans certains cas, cette dégradation induit la libération de matrikines ou/et matricryptines qui, en se fixant sur des récepteurs cellulaires, activent des voies de signalisation régulant l'expression de protéases. Ces dernières vont à leur tour entraîner une dégradation accrue de la MEC pouvant favoriser le développement de certains processus nécessitant une protéolyse matricielle importante, telle que l'invasion tumorale [Hornebeck et coll., 2002].

L'élastine, molécule matricielle responsable de l'élasticité des tissus, répond parfaitement à cette définition. En effet, la dégradation de ce polymère par méthode enzymatique ou chimique, conduit à la production de peptides biologiquement actifs capables de réguler l'expression de MMPs par de nombreux types cellulaires normaux et tumoraux. En particulier, de tels peptides sont capables d'induire l'expression de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques, MMP cruciallement impliquée dans le développement tumoral. La connaissance des voies de signalisation induites par le récepteur de l'élastine permettrait de définir les bases d'une thérapie visant à limiter la participation de la dégradation de l'élastine à la progression tumorale.

I. L'élastine

I.1. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont des composants essentiels de la MEC responsables de la résilience des tissus des vertébrés. Ces structures sont trouvées en abondance dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques nécessitant des cycles répétés d'extension et de retour à leur structure d'origine tels que la peau, les artères, les poumons ou encore les ligaments [Kielty et coll, 2002].

Du point de vue morphologique, l'observation en microscopie électronique de ces fibres révèle une structure centrale semblant amorphe, correspondant à une protéine appelée élastine, et une structure microfibrillaire composée de glycoprotéines retrouvée préférentiellement autour du composant amorphe mais aussi en son sein [Rosenbloom et coll, 1993]. Ces deux composants sont les constituants des fibres élastiques.

La genèse des fibres élastiques a lieu durant les stades précoces du développement et implique la déposition de tropoélastine, précurseur soluble de l'élastine, sur une matrice préformée de microfibrilles [Mecham et Davis 1994]. Des analyses ultrastructurales plus poussées ont en fait révélé que la composante élastine de la fibre n'est en réalité pas réellement amorphe mais se présente plutôt sous forme de fins filaments ordonnés [Pasquali-Ronchetti et Baccarani-Contrì, 1997]. De plus, l'architecture des fibres élastiques est hautement spécifique des tissus, et reflète leurs fonctions.

Le derme de la peau (Figure 1) contient un système complexe de fibres élastiques composées de trois types de fibres : les fibres oxytalanes, élaunines et élastiques matures. Ces fibres coexistent dans le derme humain et correspondraient aux trois étapes successives de l'élastogenèse. Elles possèdent toutes une composante microfibrillaire avec, dans l'ordre sus-cité, une quantité croissante d'élastine. Le derme profond contient des fibres élastiques matures constituées principalement d'élastine, tandis que le derme papillaire (partie supérieure du derme) contient des fibres oxytalanes et élaunines plus fines, s'intercalant dans la jonction dermo-épidermique. Cette continuité dans le réseau élastique confère à la peau son élasticité depuis le derme profond jusqu'à l'épiderme [Kielty et coll, 2002].

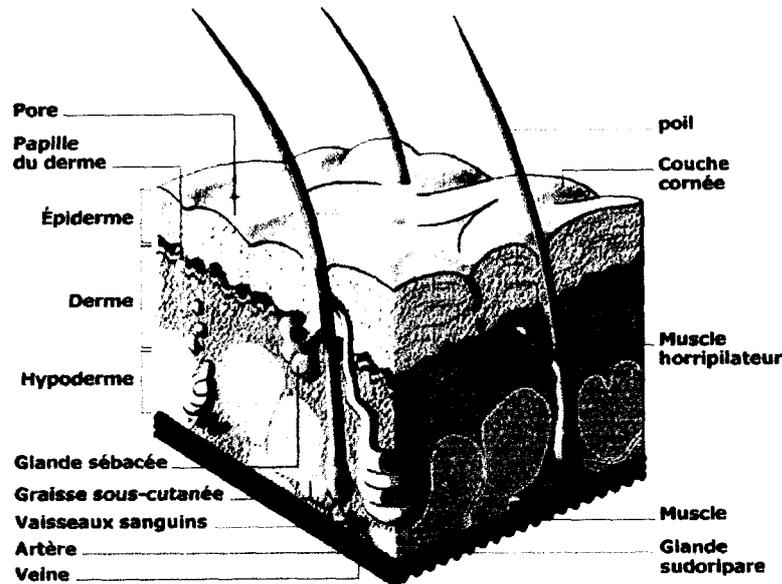


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de peau illustrant la position du derme.

I.2. Présentation de l'élastine

Les propriétés rhéologiques des fibres élastiques sont principalement assurées par l'élastine. L'aorte thoracique, le parenchyme pulmonaire et la peau de l'homme en contiennent respectivement 28 à 32%, 3 à 7% et 2 à 3% [Uitto, 1979]. Bien que l'élastine ne représente qu'un pourcentage relativement faible des protéines de la MEC, il est évident que son rôle est primordial pour le maintien de la fonction des tissus dans lesquels elle est exprimée. Elle est trouvée chez tous les Vertébrés mais n'a jamais été identifiée chez les Invertébrés [Sage et Gray, 1979 ; Davison et coll., 1995].

L'élastine est un polymère résultant de l'association de plusieurs molécules de tropoélastine, le précurseur soluble de l'élastine, et a la particularité de n'être élastique qu'en présence d'eau.

Cette protéine est caractérisée par sa totale insolubilité dans tout solvant, son extrême hydrophobie ainsi que sa résistance extraordinaire aux dégradations chimiques, physiques ou enzymatiques. Elle peut toutefois être dégradée par des enzymes protéolytiques communément nommées "élastases" ou protéases "de type élastase" incluant diverses

catégories de protéases telles que des MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12), et des sérine protéases (élastase leucocytaire, plasmine, cathepsine G) [Hornebeck et coll., 2002].

I.3. Structure de l'élastine

La conformation de l'élastine n'est pas connue de manière précise et il existe diverses théories quant aux mécanismes impliqués dans l'élasticité (Figure 2). Cependant, diverses études suggèrent fortement que l'élastine fibreuse est un assemblage tridimensionnel de molécules de tropoélastine globulaires reliées entre elles, ce qui semble valider le modèle architectural de la "goutte liquide" [Debelle et coll., 1998]. Cette hypothèse est de plus renforcée par les résultats obtenus en microscopie à champ proche sur de l' α -élastine bovine, hydrolysats d'élastine insoluble obtenu à l'aide d'acide oxalique, et sur un coacervat de tropoélastine [Miles et McMaster, 1993 ; Pasquali-Ronchetti et coll., 1993].

Cette architecture du polymère élastine est compatible avec le modèle classique de l'élasticité dans lequel l'élastine associée à l'eau peut-être assimilée à un système triphasique constitué de chaînes polypeptidiques liées à de l'eau de structure et baignant dans de l'eau solvant. La déformation de ce système par étirement conduit à un réarrangement des deux phases aqueuses ce qui baisse l'entropie. Lorsque la force exercée est stoppée, le système revient à son état initial par l'augmentation de son entropie [Debelle et Tamburro, 1999].

I.4. La tropoélastine

I.4.1. Contrôle de l'expression

Le gène de l'élastine humaine est localisé sur le chromosome 7, plus précisément sur le loci 7q11.1-21.1. Il a une taille de 45 kb et possède 34 exons avec un ratio intron : exon de 20:1, ce qui est significatif d'exons relativement petits s'intercalant entre de grands introns [Vrhovski et Weiss, 1998].

L'expression de la tropoélastine et l'élastogénèse sont plus importantes durant les étapes précoces du développement, et ont lieu sur une période de temps très limitée [Parks et coll., 1988]. Les changements observés pour la synthèse de l'élastine sont corrélés à une

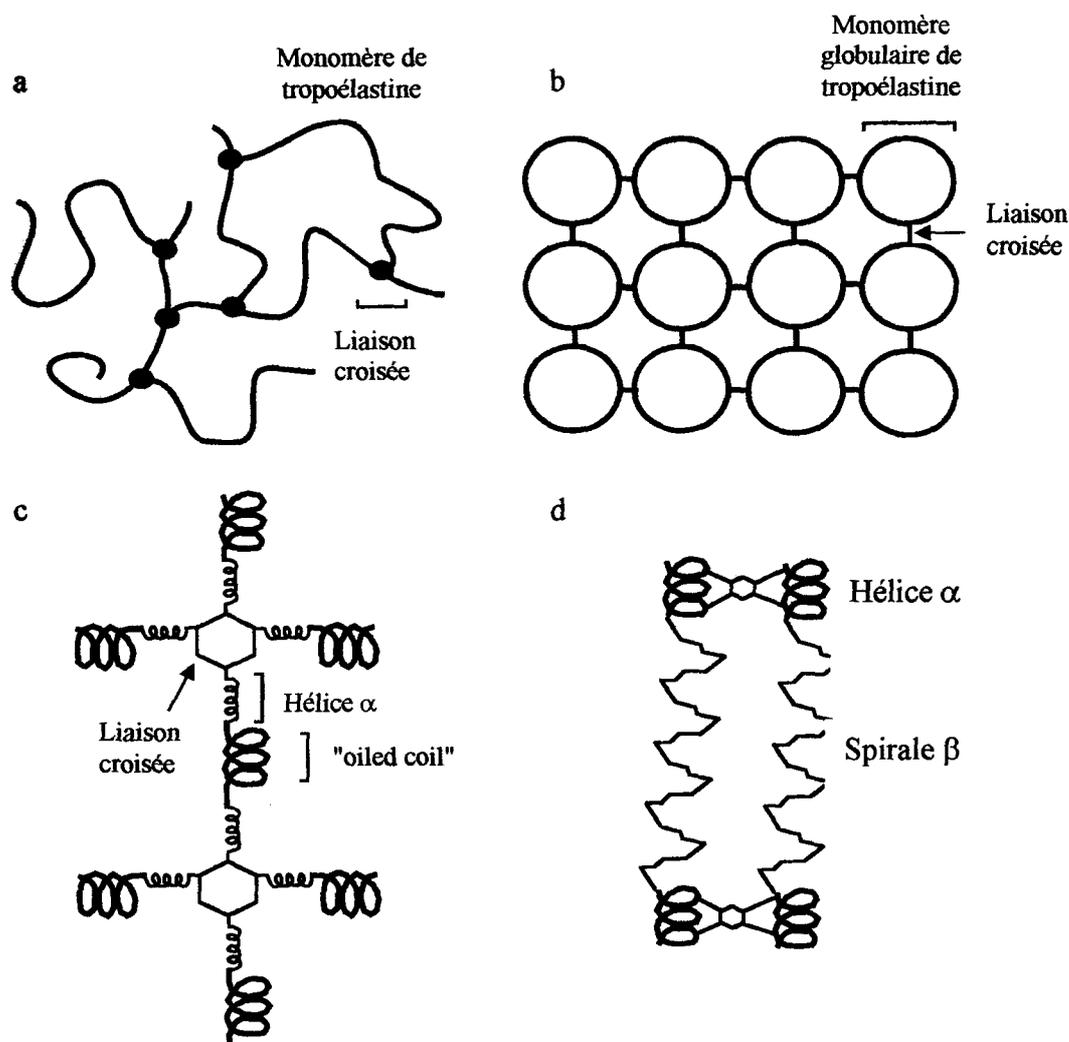


Figure 2 : Modèles structuraux proposés de l'élastine. a) modèle du "réseau aléatoire" correspondant à des chaînes pontées arrangées aléatoirement dans une architecture tridimensionnelle quelconque. b) modèle de la "goutte liquide" correspondant à des molécules de tropoélastine globulaire liées par des liaisons croisées. c) modèle "oiled coil" correspondant à des domaines de liaison croisée α -hélicoïdaux joignant deux ou plusieurs chaînes ainsi qu'un "oiled coil" formé par les domaines hydrophobes. d) modèle "fibrillaire" consistant en des liaisons croisées α -hélicoïdales et d'une hélice lâche, la spirale β , formée par les domaines hydrophobes répétitifs. Les spirales β peuvent s'associer pour former de longs filaments qui, avec l'aide des liaisons croisées, maintiennent plusieurs chaînes ensemble (d'après Vrhovski et Weiss, 1998).

augmentation du taux d'ARNm de la tropoélastine indiquant que cette synthèse est principalement sous contrôle traductionnel.

Il existe plusieurs éléments de contrôle du gène de l'élastine. Le promoteur du gène humain possède à la fois des sites de régulation positifs et négatifs [Rosenbloom et coll., 1991]. La région 5' flanquant le gène possède des séquences promotrices CAAT mais pas de boîte TATA [Bashir et coll., 1989 ; Fazio et coll., 1990]. Cette région promotrice est riche en séquences GC et de multiples sites de liaison pour des facteurs de transcriptions SP1 et AP-2 ont été décrits. De plus, huit points d'initiation de la transcription ont été identifiés, indiquant que l'expression de la tropoélastine est régulée par un mécanisme extrêmement complexe [Bashir et coll., 1989 ; Rosenbloom et coll., 1993 ; Rosenbloom et coll., 1991].

La baisse d'expression de l'élastine observée lors de la période post-natale met en jeu des mécanismes post-transcriptionnels et transcriptionnels. En effet, des études menées chez la souris et sur des cellules d'aorte de poulet ont permis de mettre en évidence à la fois une baisse d'activité du promoteur de l'élastine et des mécanismes de déstabilisation de l'ARNm [Hsu-Wong et coll., 1994 ; Johnson et coll., 1995].

Différents facteurs modulent le taux d'expression de l'élastine. Par exemple, le TNF- α et le b-FGF répriment l'expression de la tropoélastine au niveau de son promoteur tandis que les glucocorticoïdes, l'IL-1 β , l'IL-10 et l'IGF-1 ont des effets opposés [Kähäri et coll., 1992a ; Bretell et coll., 1994 ; Rich et coll., 1999 ; Pierce et coll., 1995 ; Mauviel et coll., 1993 ; Reitamo et coll., 1994 ; Rich et coll., 1993]. Le TGF- β 1 augmente la synthèse d'élastine en faisant appel à un mécanisme mettant en jeu une augmentation de la stabilité des ARNm [Kähäri et coll., 1992b ; Zhang et coll., 1999 ; Kucich et coll., 2002]. Cet effet semble impliquer la liaison de protéines cytosoliques à des régions spécifiques de l'ARNm. Hew et al. [1999] ont découvert qu'un grand domaine situé dans la région 3' non traduite de l'ARNm de la tropoélastine et possédant une structure secondaire stable, est impliqué dans la fixation de protéines cytosoliques non identifiées stabilisant le messager.

I.4.2. *Nature*

La tropoélastine est l'unité fondamentale constitutive de l'élastine. Ce précurseur, contrairement à l'élastine, est soluble en milieu aqueux, donc physiologique [Vrhovski et Weiss, 1998]. Les structures primaires des tropoélastines de l'homme (Figure 3), du bœuf, du

Exon	[----- Séquence -----]
1	<u>MAGLTAAPRPGVLLLLLSILHPSRPG</u>
2	GVPGAI PGGV PGGVFYP
3	GAGLGALGG
4	GALGPGGKPLKPV
5	PGGLAGAGLGA
6	GLGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAAYKAAKA
7	GAGLGGVPGVGGLGVSA
8	GAVVPQPGAGVKPGKVP
9	GVGLPGVYPPGGVLPGA
10	RFPGVGVLPGVPTGAGVKPKAP
11	GVGGAFAGIP
12	GVGPFGGPQPGVPLGYPIKAPKLP
13	GGYGLPYTTGKLPY
14	GYGPGGVAGAAGKAGYPTGT
15	GVGPQAAAAAAKAAAKF
16	GAGAAGVLPGVGGAGVPGVPGAIPGIGGIA
17	GVGTPAAAAAAKAAAKY
18	GAAAGLVPGGPGFGPGVVGVPAGVPGVPGAGIPVVPGAGIPGAAVP
19	GVVSPEAAKAAKAAKY
20	GARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPGFGVGGIPGVAGVPSVGGVPGVGGVPGVGIS
21	PEAQAAAAKAAKY
22	GAAGAGVLGGLVPGPQAAVPGVPGTGGVP
23	GVGTPAAAAKAAKAAQF
24	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGI
25	GPGGVAAAAKSAAKVAKAQL
26	RAAAGLGAGIPGLGVGVGPGLGVGAGVPGLGVGAGVPGFGA
26A	GADEGVRRLSPELREGDPSSSQHLPSTPSSPR
27	VPGALAAKAAKY
28	GAAVPGVLGGLGALGGVGIPGGVV
29	GAGPAAAAAAKAAKAAQF
30	GLVGAAGLGGLGVGGLGVPGVGGGLG
31	GIPPAAAAKAAKY
32	GAAGLGGVLGGAGQFPLG
33	GVAARPGFGLSPIFP
36	GGACLGKACGRKRK

Figure 3 : Séquence codée par les différents exons du gène de l'élastine humaine. Les exons sont numérotés en fonction de leur correspondance par rapport à ceux du gène de l'élastine bovine. L'élastine humaine ne comprend que 34 exons contre 36 pour la protéine bovine. Les exons correspondants aux exons 34 et 35 de la tropoélastine bovine n'existent pas chez l'homme. La flèche indique le site de clivage du peptide signal qui est souligné.

poulet, de la souris, du mouton et du rat sont connues et présentent toutes des homologies importantes [Debelle et Alix, 1999].

Les transcrits primaires du gène de l'élastine, sont sujets à un épissage alternatif important résultant en l'élimination d'un ou de plusieurs exons. Diverses isoformes de tropoélastine sont donc transcrites [Indik et coll, 1987a]. Néanmoins, quelque soit le type d'épissage, la tropoélastine se présente toujours sous forme d'une alternance de domaines hydrophiles et d'autres extrêmement hydrophobes :

1. les domaines hydrophiles de la tropoélastine sont riches en lysine et alanine et sont impliqués dans la formation des liaisons croisées responsables de l'association des différentes tropoélastines ensemble. Les résidus alanyl sont trouvés par paire ou par triplette entrecoupées de résidus lysyl tels que : AAKAAKAA.
2. les domaines hydrophobes sont riches en résidus glycylic et en résidus apolaires prolyl, alanyl, valyl, leucyl et isoleucyl. Ils sont organisés en séquences répétitives du type GX, PX, GGX et PGX où X = A, V, L, I ou G.

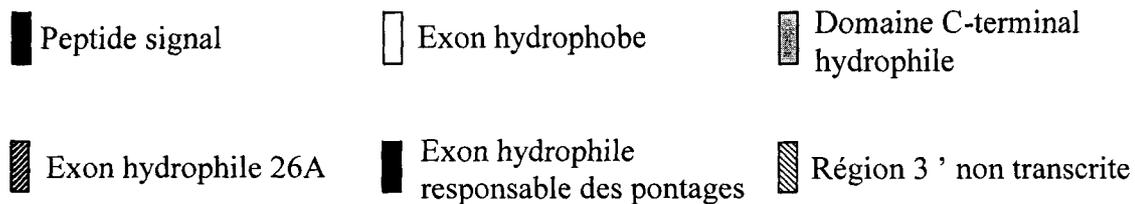
La tropoélastine humaine contient un peptide signal de 26 acides aminés et est secrétée sous la forme d'une protéine d'approximativement 72 kDa [Indik et coll., 1987b], bien qu'il y ait quelques variations dues à l'hétérogénéité des tropoélastines synthétisées.

Chez l'homme, le domaine codé par l'exon 24 présente six répétitions de l'hexapeptide VGVAPG qui est considéré comme le domaine de liaison de l'élastine à son récepteur. La séquence VGVAPG est présente deux fois dans la structure primaire de la tropoélastine bovine [Debelle et Alix, 1999].

Le domaine C-terminal de la tropoélastine (encodé par l'exon 36) est très conservé au sein des espèces. Il contient les deux seules cystéines de la molécule et se termine par la séquence RKRK chargée positivement. Il est important dans l'élastogénèse [Brown et coll., 1992].

Le gène de l'élastine humaine (Figure 4) contient un exon spécifique, l'exon 26A, codant pour une séquence hydrophile mais rarement retrouvée au sein de la tropoélastine. Cette séquence est riche en serine (8 des 14 existantes dans la molécule), contient de nombreux acides aminés chargés (Glu, Asp, Arg) et la seule histidine de la protéine [Indik et coll., 1987a]. Il semblerait que les isoformes de tropoélastine ne possédant pas cet exon soient un substrat moins efficace pour la lysyl oxydase (voir paragraphe I. 4.4. *Sécrétion et assemblage*) et que ceci ne soit pas seulement dû à l'hydrophilie de cet exon

A)



B)

Domaine	Séquence
Domaine hydrophobe (Exon 24)	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPG VGVAPGVGVAPGIGPGGVA
Domaine de liaison croisée (Exon 19)	GVVSPEAAAKAAAKAAKY
Exon 26A	GADEGVRRSLSPELREGGDPSSSQHLPSTPSSPR
Domaine C-terminal	GGACLGKACGRKRK

Figure 4 : A) Structure de l'ADNc de la tropoélastine. Les exons sujets à un épissage sont indiqués par les flèches. La numérotation des exons est indiquée. B) Séquences d'acides aminés de quelques domaines typiques.

[Bedell-Hogan et coll., 1993]. Certains auteurs ont suggéré que sa présence est augmentée lors du vieillissement ou dans des fibres élastiques anormales [Indik et coll, 1989]. Cependant, les effets de ce domaine sur les propriétés physiques de la tropoélastine et de l'élastine ne sont pas connus.

I.4.3. *Modifications post-traductionnelles*

Les modifications post-traductionnelles de la tropoélastine impliquent le clivage du peptide signal ainsi que l'hydroxylation de certains résidus prolyls [Jacob MP et Hornebeck W, 1985]. Cette réaction d'hydroxylation est catalysée par la prolyl-hydroxylase et a lieu sur un nombre variable de résidus prolyl étant compris entre 0 et 20 % du nombre de résidus prolyl total [Uitto J. et coll, 1976 ; Uitto J. et coll., 1991]. Il apparaît que l'hydroxylation des prolines n'est pas essentielle à la synthèse des fibres élastiques mais qu'une hyperhydroxylation est délétère. En effet, l'inhibition de la prolyl hydroxylase n'affecte pas la sécrétion de tropoélastine [Uitto J. et coll, 1976 ; Rosenbloom J. et Cywinski A., 1976] mais l'ajout à des cultures cellulaires d'ascorbate, un cofacteur de la prolyl hydroxylase, induit une hyperhydroxylation de la tropoélastine et une inhibition de son expression [Faris B. et coll., 1984 ; Barone L.M. et coll., 1985 ; Davidson J.M. et coll., 1997]. Il a été proposé que l'ascorbate affecte la transcription de l'ARNm de la tropoélastine mais le mécanisme est inconnu [Davidson J.M. et coll., 1997]. L'hyperhydroxylation peut entraîner la déstabilisation de la structure secondaire de la tropoélastine, diminuant ainsi sa capacité à s'associer à l'élastine en cours de synthèse [Urry D.W. et coll., 1979]. Il a été suggéré que l'hydroxylation des résidus prolyls de la tropoélastine ne soit peut-être que le résultat d'une réaction non spécifique de l'hydroxylation du collagène sur ces mêmes résidus, expliquant le fait qu'une telle modification post-traductionnelle ne soit pas essentielle dans la synthèse de l'élastine [Vrhovski B. et Weiss A.S., 1998].

La tropoélastine n'est pas glycosylée et certains de ses résidus lysyls vont subir des modifications afin de permettre l'assemblage des différentes tropoélastine (voir paragraphe I.4.4. *Sécrétion et assemblage*).

I.4.4. Sécrétion et assemblage

Plusieurs types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, et les fibroblastes synthétisent de la tropoélastine [Uitto et coll., 1991]. La traduction a lieu à la surface du réticulum endoplasmique rugueux et après clivage du peptide signal, la protéine est libérée dans la lumière de cet organite [Saunders et Grant, 1984]. La tropoélastine s'associe alors rapidement avec une protéine chaperonne, empêchant son agrégation intracellulaire.

Cette protéine chaperonne, appelée *Elastin Binding Protein* (EBP), accompagne la tropoélastine tout au long du processus de sécrétion. Dans l'espace extracellulaire, le complexe se trouve à la surface de la membrane plasmique. L'EBP se réassocierait au reste du complexe récepteur de l'élastine, composé d'une neuraminidase transmembranaire (Nase) et d'une protéine protectrice (PP), identifiée comme étant une cathepsine A (voir paragraphe II. 2. Sous-Unités constitutives). La réassociation du complexe permettrait à la neuraminidase de cliver l'acide sialique présent dans la partie glycanne de glycoprotéines constitutives des fibres élastiques en cours de synthèse. Cette étape aurait pour but de rendre l'EBP accessible à des résidus galactosyls, qui en se liant à ce dernier, diminuerait très fortement son affinité pour la tropoélastine, et la libérerait (Figure 5 ; voir paragraphe II. 4.1. *Rôle dans la synthèse des fibres élastiques*). D'après ce modèle, l'EBP semble donc ne pas être associé au reste du récepteur en absence de tropoélastine [Hinek, 1996].

Tandis que l'EBP est recyclée, la tropoélastine s'associe aux microfibrilles de la fibre élastique en cours de synthèse. Les deux résidus cystéyls trouvés dans le domaine C-terminal de la tropoélastine forment un pont disulfure intrachaine qui permettrait de créer une poche chargée positivement grâce à la séquence C-terminale RKRK [Brown et coll., 1992]. Cette région positive permettrait l'interaction entre la tropoélastine et les glycoprotéines microfibrillaires chargées négativement. A l'heure actuelle, on pense que les microfibrilles permettent d'aligner correctement les molécules de tropoélastine avant leur pontage au sein du réseau d'élastine [Mecham,, 1991].

L'hypothèse concernant le rôle des microfibrilles comme matrice de déposition de la tropoélastine est renforcée par l'observation du fait que l'élastine est alignée suivant la même orientation que les microfibrilles [Ross et Bornstein, 1969]. De plus, il a été montré que la tropoélastine peut s'associer à la *Microfibrills associated glycoprotein 1* (MAGP-1).

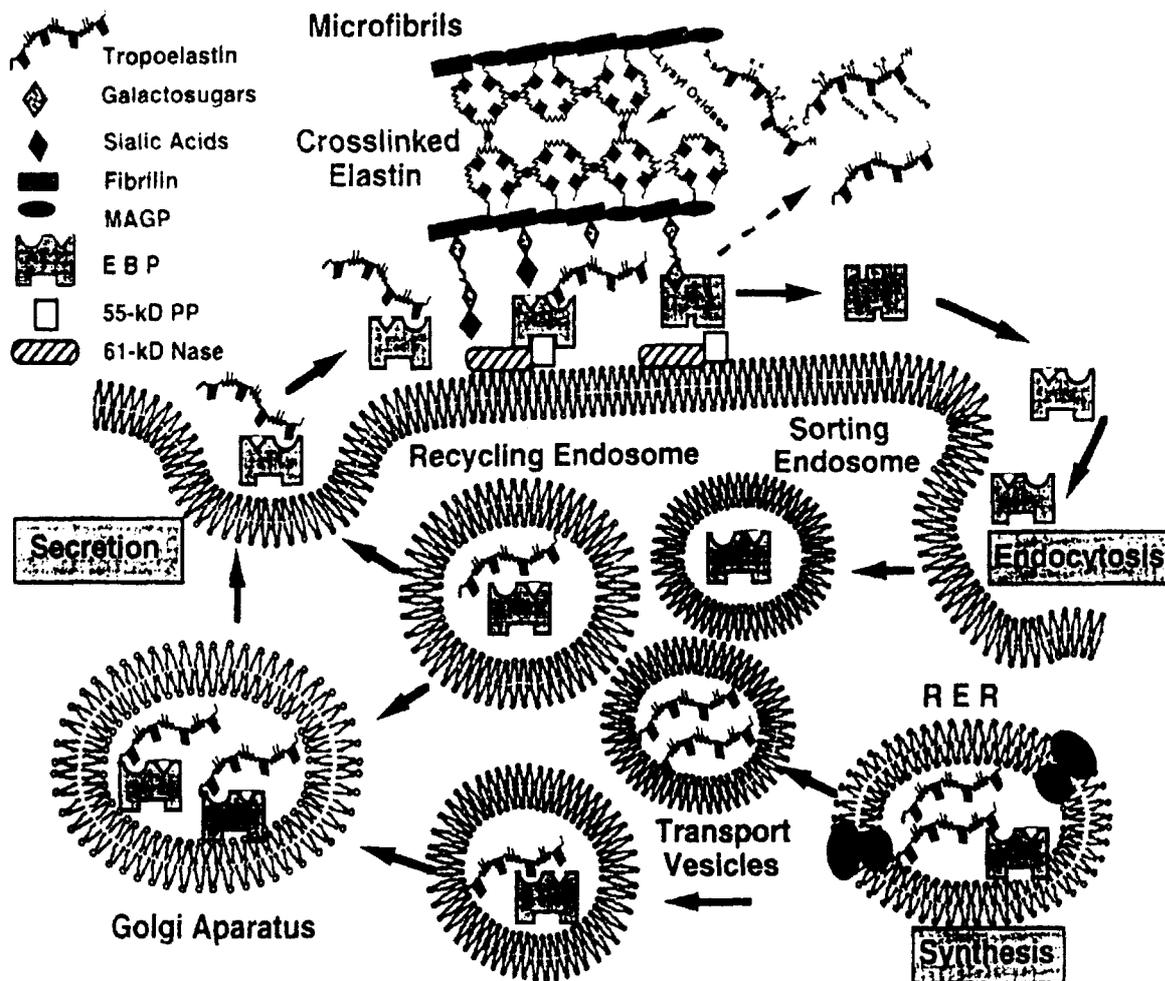


Figure 5: Description schématique de la synthèse de l'élastine (d'après Hinek, 1996).

La liaison de la tropoélastine à MAGP-1 requiert le domaine C-terminal de la tropoélastine et il est possible que la transglutaminase puisse lier de manière covalente ces deux protéines [Bashir et coll., 1994 ; Brown-Augsberger et coll. 1994].

La tropoélastine correctement alignée subit des modifications post-traductionnelles nécessaires à son pontage au niveau de certains de ses résidus lysyls. La réaction initiale est une désamination oxydative de lysine par catalysée une enzyme Cu^{2+} -dépendante, appelée lysyl-oxydase. L'allysine produite, également appelée α -amino adipique δ -semialdéhyde, se condense spontanément avec des résidus lysyls et allylsyls proches produisant des liaisons croisées bi-, tri- ou tétrafonctionnelles appelées allysine aldol, lysononorleucine, mérodesmosine, desmosines et isodesmosines [Reiser K. et coll., 1992]. Ces deux dernières sont caractéristiques de l'élastine.

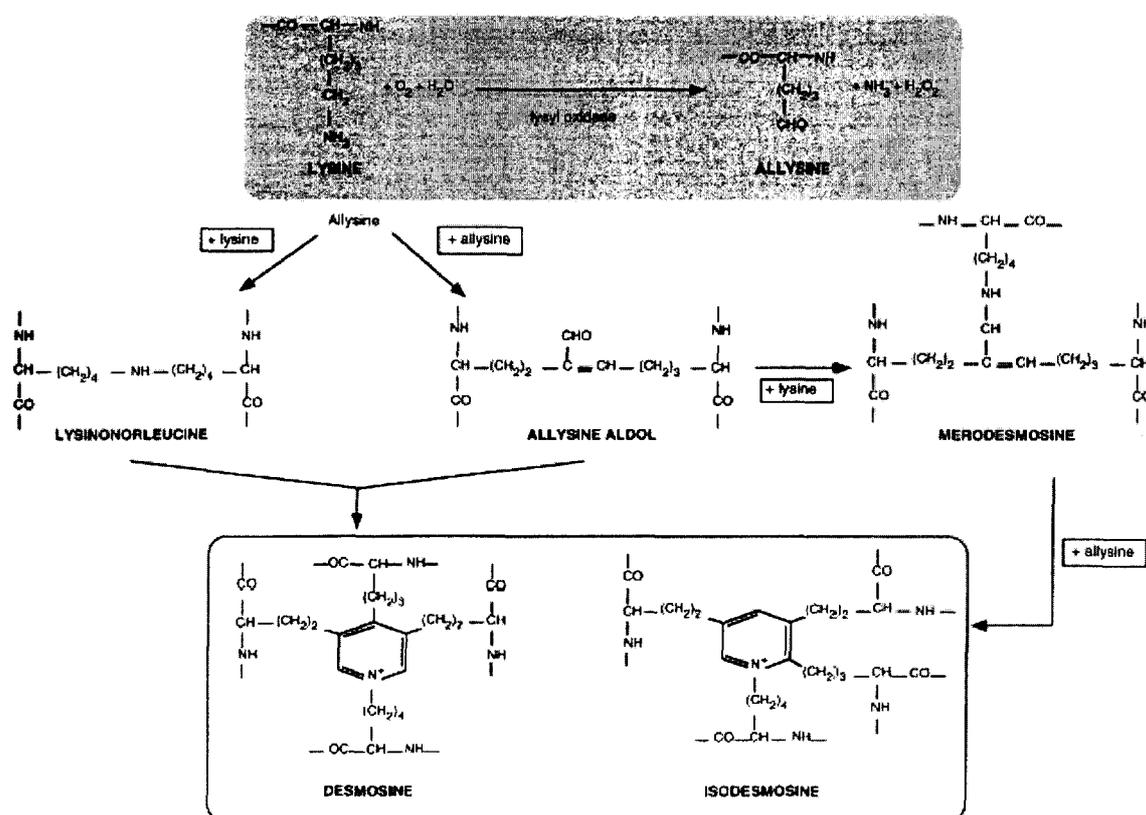


Figure 6: Structure et voie de synthèse des desmosines et isodesmosines (d'après Vrhovski et Weiss, 1998).

La lysyl-oxydase est une enzyme thermostable, pouvant fonctionner sur une large gamme de pH. Elle est responsable de la formation des liaisons croisées dans l'élastine mais aussi de celles trouvées dans le collagène [Kagan et Sullivan, 1982]. L'inhibition de cette enzyme provoque une baisse drastique du nombre de liaisons croisées au sein de l'élastine et une accumulation importante de tropoélastine au sein des tissus, démontrant le rôle fondamental de la lysyl-oxydase dans l'élastogénèse [Tinker et coll., 1990]. Des techniques immunologiques ont montré que cette enzyme est localisée dans les fibres élastiques matures. Elle peut donc être incorporée dans la fibre en construction [Kagan et coll., 1986].

I.5. Les peptides d'élastine

I.5.1. *Nature et Origine*

Le terme peptides d'élastine désigne à la fois des peptides produits naturellement par dégradation de l'élastine insoluble par des enzymes et ceux obtenus par dégradation chimique. Ces peptides peuvent également être obtenus par synthèse chimique et dans ce cas, l'avantage le plus important réside dans le fait que l'on peut contrôler la séquence des peptides produits. Dans le cas de l'obtention de peptides par dégradation chimique, plusieurs types peuvent être obtenus selon l'agent chimique utilisé : dans le cas de la dégradation de l'élastine insoluble par de l'acide oxalique, on obtient un mélange de peptides de masse moléculaire moyenne de 25 kDa appelé α -élastine (αE) [Partridge et coll., 1955]. Si l'élastine est dégradée par de la potasse, on obtient un mélange d'une masse moléculaire moyenne de 75 kDa appelé κ -élastine (κE) [Jacob et Hornebeck, 1985].

Le renouvellement de l'élastine est quasiment absent dans des conditions physiologiques normales. Cependant, de grandes quantités de ces peptides sont produits lors de divers processus pathologiques et physiopathologiques [Ntayi et coll., 2004, Hornebeck et coll., 2002 ; Pardo et Selman, 1999 ; Fülöp et Larbi, 2002] et sont retrouvés dans le sang [Fülöp et coll., 1990]. Plusieurs MMPs parmi lesquelles les gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9), la matrilysine (MMP-7) et la métalloélastase (MMP-12) sont des élastases efficaces et sont exprimées dans diverses pathologies associées à une forte dégradation de l'élastine [Hornebeck et coll., 2002 ; Pardo et Selman, 1999 ; Fulop et Larbi., 2002 ; Muiznieks et coll., 2003]. De plus, en situation inflammatoire associée ou non à une pathologie tumorale, la sécrétion d'élastase leucocytaire mène à une destruction dramatique de l'élastine [Pardo et

Selman., 1999]. D'autres protéases telles que la cathepsine G sont également capables de dégrader l'élastine conduisant ainsi à la production de peptides d'élastine [Hornebeck et coll., 2002].

Les peptides obtenus sont bien plus que de simples produits de dégradation matriciels. Ils possèdent de nombreuses activités biologiques, et comme nous allons le voir, peuvent agir sur de nombreux types cellulaires et répondent à la définition de matrikines.

I.5.2. Activités biologiques des peptides d'élastine

Dans un souci de clarté, les différentes activités biologiques attribuées aux peptides d'élastine et les cellules cibles qui ont été décrites ont été résumées dans le tableau 1.

Beaucoup des activités biologiques régulées par les peptides d'élastine peuvent être mises en relation directe avec le développement tumoral : leurs effets sur la prolifération cellulaire, le chimiotactisme et la synthèse de protéases sur de nombreux types cellulaires tumoraux mais aussi normaux impliqués dans la réaction stromale tels que les fibroblastes, ont été largement caractérisés. Ils sont de plus capables de stimuler l'angiogenèse des cellules HUVECS.

En plus de ces activités en relation avec le cancer, les peptides d'élastine sont également capables de réguler la vasorelaxation, de stimuler l'explosion respiratoire de cellules du système immunitaire ou encore d'induire l'apoptose à haute concentration.

Nature	Origine	Chimiotactisme						Prolifération				Synthèse de protéases						
		Monocytes	Neutrophiles	Fibroblastes	Cellules musculaires lisses	Cellules Endothéliales	Carcinomes 3LL-HM	Carcinomes pulmonaires M27	Mélanomes A2058	Lymphocytes	Fibroblastes	Cellules musculaires lisses	lignées cellulaires d'Astrocytomes	lignées cellulaires de Gliomes	Leucocytes	Fibroblastes	Fibrosarcomes HT-1080	Mélanomes MIDor et M3Da
kE ou α E	Elastine Bovine	[286] [147]			[217]		[282]	[318]		[229]	[148] [277] [89]	[198]	[140]	[108]	[102] [84]	[7] [31]	[33]	
kE coatée	Elastine Bovine																[211]	
Lysat Enzymatique	Elastine Bovine	[255] [100]		[191]			[318]	[191]							[31]			
VGVAPG	Elastine Humaine et Bovine	[256] [21] [100]		[256]	[175]		[23] [318] [24]			[148] [277]	[198]			[102]	[31]	[33]		
PGAIPG	Elastine Humaine et Bovine		[94]	[95]			[94]								[31]			
GFGVGAGVP	Elastine Humaine			[176]	[175]													
GLGVGAGVP	Elastine Humaine				[175]													
LREGDPSS	Elastine Humaine	[20]																
LGTIPG	Elastine Humaine			[191]				[191]							[31]			

Tableau 1 : Effets biologiques des peptides d'élastine en fonction de leur nature et des cellules cibles.
 Pour des raisons de présentation, les données bibliographiques indiquées dans ce tableau le sont par des numéros se rapportant aux publications citées dans la section Références.

Nature	Origine	Modifications de flux ioniques			Augmentation de la consommation d'oxygène		Vasorelaxation et libération de NO	Inhibition de la synthèse de cholestérol	Induction de l'apoptose	Induction de l'angiogenèse
		Fibroblastes	Cellules musculaires lisses	Monocytes	Monocytes	Leucocytes	Cellules endothéliales	Monocytes	Lymphocytes	HUVECS
kE	Elastine Bovine	[131]			[84]	[298]	[77]	[297]	[229]	A. Robinet, Thèse de Doctorat, 2003

Tableau 1 (suite) : Effets biologiques des peptides d'élastine en fonction de leur nature et des cellules cibles.
Pour des raisons de présentation, les données bibliographiques indiquées dans ce tableau le sont par des numéros se rapportant aux publications citées dans la section Références.

I.6. Maladies affectant les fibres élastiques.

Diverses maladies génétiques ou acquises affectent la structure, la distribution et l'abondance des fibres élastiques. Ces maladies n'impliquent pas toutes directement l'élastine mais elles affectent pourtant sévèrement l'intégrité de la fibre. Le syndrome de Marfan est par exemple caractérisé par une désorganisation des fibres élastiques due à des mutations affectant la fibrilline 1, protéine constitutive des microfibrilles [Uitto et Ryhänen, 1987 ; Vrhovski et Weiss, 1998].

Nous nous intéresserons ici à quelques maladies touchant l'élastine, affectant soit l'élastogénèse, telles que la sténose aortique supra-avalvulaire (SVAS) et le syndrome de Williams, soit la dégradation de la protéine [Vrhovski et Weiss, 1998]. Citons par exemple dans ce cas les anévrismes et l'emphysème [Jacob, 2003 ; Suki et coll., 2003].

La SVAS et le syndrome de Williams ont été directement reliés à des altérations du gène de l'élastine. La SVAS est décrite comme un obstacle à l'éjection du ventricule gauche. Trois types de mutations ont été identifiées dans le cas de la SVAS. Une met en jeu une délétion de 30 kb comprenant les exons 2 à 27, la seconde une délétion de la partie 3' terminal du gène résultant en une protéine tronquée de sa partie C-terminale depuis l'exon 28 [Olson et coll., 1995 ; Ewart et coll., 1994 ; Curran et coll., 1993]. La troisième implique des mutations ponctuelles dont la plupart résultent également dans la perte de la région C-terminale par introduction de codons stop ou par décalage du cadre de lecture [Li et coll., 1997 ; Tassabehji et coll. 1997].

Le syndrome de Williams est dû à une grande délétion de 114 kb impliquant la délétion du gène entier de l'élastine ainsi que d'autres gènes adjacents [Lowery et coll., 1995 ; Ewart et coll., 1993]. Williams a décrit en 1961 l'association syndromique d'une sténose aortique supra-avalvulaire, d'une dysmorphie faciale (visage d'elfe), d'un retard mental et d'un profil neuropsychologique particulier. Il semblerait que les deux derniers symptômes soient plutôt dus à la délétion du gène de la LIM-kinase adjacent à celui de l'élastine [Tassabehji et coll., 1996].

Il a par ailleurs été montré que des souris knock-out pour le gène de l'élastine avaient des artères anormalement obstruées, ceci étant le résultat de la prolifération de cellules musculaires lisses [Li et coll., 1998]. Ceci indique que l'élastine peut avoir un rôle insoupçonné et distinct de son rôle structural dans la morphogenèse normale des artères.

Certaines maladies acquises telle que l'emphysème pulmonaire, sont caractérisées par une dégradation accrue des fibres élastiques. Cette maladie est classiquement définie par la destruction du parenchyme pulmonaire. Les facteurs de déclenchement de l'emphysème incluent l'exposition à la fumée de cigarette, des facteurs génétiques et des polluants environnementaux. La perte de fonction du poumon observée dans l'emphysème est due en partie à la dégradation de l'élastine et certaines MMPs telles que la MMP-9 et la MMP-12 jouent un rôle essentiel dans ce processus [Suki et coll., 2003].

Les anévrismes aortiques abdominaux sont caractérisés par une dilatation progressive de la paroi aortique pouvant mener à sa rupture. Dans cette pathologie, le remodelage de la MEC est caractérisé par la disparition des lames élastiques en association avec une fibrose adventitielle inflammatoire. Les enzymes impliquées dans les anévrismes aortiques sont caractéristiques de ce processus et sont sécrétées par les cellules résidentes des aortes, mais aussi par des cellules infiltrantes impliquées dans la réaction inflammatoire associée. Certaines activités protéolytiques mises en évidence sont directement reliées à la dégradation de l'élastine. Citons par exemple, l'élastase des neutrophiles, la MMP-2, la MMP-9 et la MMP-12 [Jacob, 2003].

II. Le complexe récepteur de l'élastine

II.1. Présentation

En 1984, les travaux de Senior et collaborateurs sur le chimiotactisme de leucocytes et de fibroblastes induit par la tropoélastine et des peptides d'élastine, ont été à l'origine de l'hypothèse de l'existence d'un récepteur spécifique de l'élastine. Plus tard, Wrenn et collaborateurs [1988], ont confirmé cette hypothèse en démontrant la présence d'un récepteur de haute affinité ($K_d = 8 \text{ nM}$) chez des fibroblastes de ligaments en utilisant de la tropoélastine iodée. Son association à la tropoélastine était saturable et réversible. Des études ultérieures par chromatographie d'affinité ont permis de démontrer que des cellules produisant de l'élastine, incluant les fibroblastes, les chondroblastes, les myocytes vasculaires mais aussi les monocytes, neutrophiles et diverses cellules tumorales (mélanomes, pulmonaires et de sein) expriment à leur surface le complexe récepteur de l'élastine qui se compose de trois sous-unités [Hinek et coll., 1988]. Deux de ces sous-unités (55 kDa et 61 kDa) sont associées à la membrane plasmique, tandis que la troisième est une protéine périphérique de 67 kDa qui lie l'élastine [Mecham et coll., 1989a]. Cette dernière sous-unité fut appelée *Elastin Binding Protein* (EBP).

II.2. Sous-unités constitutives

II.2.1. *L'EBP*

L'hexapeptide VGVAPG, répété six fois au sein de l'exon 24 de la tropoélastine, a été identifié comme ligand de haute affinité pour l'EBP. Cependant, deux sites de liaison différents ont été mis en évidence sur cette protéine. Le premier permet la liaison de l'élastine (peptides, tropoélastine...), tandis que le second est un site galactectine, c'est à dire qu'il peut lier des oses ou des osides contenant des résidus galactosyls.

L'EBP peut ainsi être éluée d'une colonne d'affinité élastine par du lactose ou du galactose, mais pas par du glucose ou du fucose. Ceci suggère que l'interaction élastine-EBP est régulée allostériquement par des β -galactosides se liant sur un site différent du site de liaison à l'élastine, les deux sites étant exclusifs [Mecham et coll., 1989a ; Hinek et coll., 1988].

Le séquençage partiel de l'EBP isolée de cellules musculaires lisses de mouton [Hinek, 1996] a mis en évidence une forte homologie de séquence avec un variant d'épissage de la β -galactosidase [Morreau et coll., 1989]. Contrairement à la β -Galactosidase (β -Gal) active qui est adressée aux lysosomes, ce variant inactif est adressé à la membrane plasmique. Privitera et coll. [1998] ont démontré que l'EBP est identique à cette forme épissée et ont décrit le mécanisme impliqué de ce processus (Figure 7).

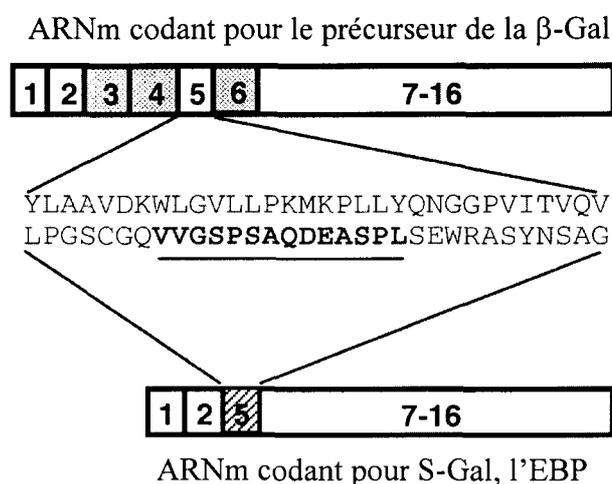


Figure 7: Schéma représentant l'épissage du transcrit primaire de la β -Gal générant la forme S-Gal (*Spliced Galactosidase*), correspondant à l'EBP. Dans ce dernier, les exons 3, 4 et 6 sont épissés et le cadre de lecture de l'exon 5 est décalé créant une région de 32 résidus différente de celle codée par la β -Gal (d'après Privitera et coll., 1998).

Avant l'établissement de cette preuve, Hinek [1996] avait supposé que l'EBP était identique à ce variant et que les sous-unités de 55 et 61 kDa composant le reste du complexe récepteur pouvaient correspondre à deux protéines interagissant avec la β -Gal dans les lysosomes, c'est à dire une neuraminidase (Nase) et une cathepsine A également appelée *Protective Protein* (PP). Cette hypothèse fut par la suite appuyée par des expériences montrant la présence de PP et de Nase à la surface de nombreuses cellules [Hinek, 1996 ; Lukong et coll., 2001b], ainsi que par la démonstration du fait que la neuraminidase lysosomale (Neu-1) et une des isoformes de Nase retrouvée à la surface des cellules, étaient les produits du même gène [Carrillo et coll., 1997].

Le complexe récepteur de l'élastine dériverait donc du complexe β -Gal / PP / Nase des lysosomes. Cette hypothèse a été confirmée très récemment [Malvagia et coll., 2004].

II.2.2. La Protéine Protectrice ou Cathepsine A

PP est synthétisée sous forme d'un zymogène de 54 kDa, qui, dans le lysosome, est clivé en deux sous-unités de 32 et 20 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures. Dans ce compartiment cellulaire, elle possède une activité sérine protéase. PP est ainsi nommée car elle semble protéger la neuraminidase et la β -Gal d'une digestion intralysosomale. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que son activité protectrice était indépendante de son activité protéase [Callahan, 1999]. PP empêche la dégradation de la neuraminidase lysosomale par le simple fait de son interaction avec cette dernière : des neuraminidases mutées sur des résidus constitutifs du domaine de liaison de Nase à PP (F260Y, L270F et A298V), sont rapidement dégradées à l'intérieur des lysosomes [Lukong et coll., 2001a].

II.2.3. La Neuraminidase

La neuraminidase lysosomale (Neu-1) est une préproenzyme de 45,5 kDa qui peut être glycosylée et devient mature par clivage protéolytique donnant une protéine de 48,3 kDa [Callahan, 1999]. En raison de son taux de glycosylation variable, elle peut apparaître à des masses moléculaires supérieures à 60 kDa [Achyuthan et Achyuthan, 2001]. Cette enzyme transmembranaire est responsable du clivage de résidus d'acide sialique en position terminale de parties glycanes portées par différents sialo-conjugués, protéiques ou lipidiques. Parmi les substrats préférentiels de Neu-1, on trouve certains gangliosides dont le GM3 [Seyrantepe et coll., 2003].

Un déficit en activité neuraminidase dû à des mutations au sein de son site actif ou dans son domaine de liaison à PP, est responsable de diverses maladies appelées sialidoses, caractérisées par un stockage lysosomal de divers oligosaccharides et glycopeptides, responsables de graves symptômes incluant des dystrophies squelettiques, une dégénérescence cérébrale ou encore un retard mental [Lukong et coll., 2001a]. De plus, pour que la Nase soit active dans les lysosomes, la β -Gal doit être exprimée et associée au

complexe Nase et PP. L'association PP-Nase ne génère qu'une très faible et instable activité Nase tandis que la présence de la β -Gal au sein du complexe stabilise cette activité [Van der Horst et coll., 1989]. Un déficit en β -Gal peut donc également être responsable de sialidoses.

Dans les cellules, PP et Nase sont trouvées à la fois dans les lysosomes et à la membrane plasmique. La distribution intracellulaire de Nase est contrôlée par un signal d'internalisation porté par sa partie cytoplasmique [Lukong et coll., 2001b]. Celui-ci est similaire à ceux trouvés au sein de récepteurs membranaires endocytés ou dans d'autres protéines de la membrane des lysosomes, transportés via des vésicules recouvertes de clathrine [Lukong et coll., 2001b]. Cette séquence, $^{412}\text{YGTL}^{415}$, pourrait représenter un site de fixation pour des complexes protéiques AP2 (*Adaptator Protein complex 2*), impliqué dans l'endocytose de protéines depuis la membrane plasmique jusqu'aux lysosomes.

En absence de phosphorylation de la ^{412}Y , la Nase est retrouvée en très grande majorité dans la membrane des lysosomes. Lorsqu'elle est phosphorylée, la quantité de Nase lysosomale diminue, augmentant au niveau de la membrane plasmique. Ceci est dû au blocage de l'interaction entre AP2 et le signal d'internalisation [Lukong et coll., 2001b].

Plusieurs études ont montré que Neu-1, en plus de son activité de catabolisme intralysosomal de glycoconjugués, possède un rôle important dans la signalisation cellulaire. En particulier, durant l'activation des cellules T, Neu-1 est exprimée à la surface de la cellule où elle participe à la désialylation de la chaîne lourde de classe I de la myosine, phénomène requis pour rendre les cellules T sensibles aux cellules présentatrices d'antigènes [Landolfi et Cook, 1986]. Elle est également responsable de la désialylation du ganglioside GM3, modulant ainsi la mobilisation de Ca^{2+} et la production d'IL-4 [Chen et coll., 2000].

II.3. Ligands identifiés de l'EBP

La spécificité de l'EBP n'est pas restreinte à VGVAPG ou à des séquences dérivées de l'élastine. En effet, il a été montré que la laminine se lie à l'EBP [Mecham et coll., 1989b]. La séquence responsable de la fixation de la laminine est LGTIPG, une séquence hydrophobe trouvée au sein du domaine V de la chaîne B1 de la laminine. De plus, le domaine 7S du collagène de type IV s'est révélé être chimiotactique pour des neutrophiles au travers de sa

liaison à un récepteur de 67 kDa possédant une séquence d'acides aminés très semblable à celle de l'EBP [Senior et coll., 1989]. De plus, des études plus poussées ont permis de déterminer que l'EBP lierait en réalité des peptides présentant la séquence consensus XGXXPG, car ils possèderaient une structure particulière en coude β de type VIII [Brassart et coll., 2001].

Ceci suggérerait fortement que le complexe récepteur de l'élastine pourrait avoir un panel de ligands très étendu.

Le tableau 2 résume les constantes de dissociation et le nombre de récepteurs pour différents types de peptides d'élastine et divers types cellulaires.

Type cellulaire	Type d'élastine	Kd (M)	Nombres de récepteurs	Références
Fibroblastes dermiques humains	kE	3.10^{-9}	21 000	B. Brassart, Thèse de Doctorat, 2000
Fibroblastes de ligaments de nuque de boeuf	Tropoélastine	8.10^{-9}	2.10^6	Wrenn et coll., 1988
Monocytes humains	kE	$0,18.10^{-9}$		Varga et coll., 1988
Polymorphonucléaires neutrophiles humains	kE	$0,47.10^{-9}$		Varga et coll., 1988
Carcinomes pulmonaires de Lewis (HPM)	kE	$1,3.10^{-9}$	366 000	Timar et coll., 1991
Carcinomes pulmonaires de Lewis (lignée 27)	VGVPAG	$2,7.10^{-9}$	52 000	Blood et coll., 1988

Tableau 2 : Constantes de dissociation déterminées pour différents peptides d'élastine vis à vis de leur récepteur et nombre de récepteurs par cellule établi pour divers types cellulaires.

II.4. Rôles du complexe récepteur de l'élastine

II.4.1. *Rôle dans la synthèse des fibres élastiques*

Le complexe récepteur de l'élastine semble jouer un rôle fondamental dans la synthèse des fibres élastiques. Dans le schéma proposé par Hinek [1996], l'EBP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et s'associe directement avec la tropoélastine néosynthétisée, jouant ainsi le rôle de protéine chaperonne qui va l'accompagner tout au long du processus de sécrétion (Figure 5). Quand le complexe est sécrété, il s'associe au reste du récepteur, PP et Nase. Cela permettrait alors à la Nase de cliver un acide sialique terminal provenant des

chaînes glycanes d'une protéine constitutive des microfibrilles, afin de mettre à jour un résidu galactosyl. Ce dernier, en se fixant sur le site galactoelectine de l'EBP, diminuerait alors l'affinité de la tropoélastine vis à vis de son récepteur, la libérant localement et lui permettant ensuite de s'associer à la fibre en cours de synthèse par le processus décrit précédemment dans la partie I. 4.4. *Sécrétion et assemblage*. Cependant, il est important de noter que le rôle de la Nase reste hypothétique et n'a pas été démontré.

Il existe toutefois une seconde fonction imputable au complexe récepteur de l'élastine : sa capacité à fonctionner en tant que récepteur impliqué dans la transduction du signal. C'est à cette seconde fonction que nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans cette étude.

II.4.2. *Rôle dans la signalisation cellulaire*

Peu de choses sont actuellement connues concernant la transduction du signal du complexe récepteur de l'élastine. Toutefois, certains renseignements peuvent être dégagés des quelques études ayant eu lieu dans le domaine, et notamment que les voies de signalisation induites par le récepteur de l'élastine semblent être dépendantes du type cellulaire.

Les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine régulant le chimiotactisme induit par ces derniers ont été principalement étudiées dans les monocytes. Cependant, l'implication d'une protéine kinase C (PKC) a été démontrée dans la réponse chimiotactique des cellules de carcinomes pulmonaires M27 [Blood et Zetter, 1989].

Les premières études concernant les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine ont montré que la kE induit, dans les monocytes, une augmentation du taux intracellulaire d'adénosine 3',5'- monophosphate cyclique (AMPc), de guanosine 3',5'- monophosphate cyclique (GMPc), de calcium ainsi qu'une stimulation de l'explosion respiratoire [Fülöp et coll., 1986]. Ces auteurs avaient alors suggéré que l'augmentation de GMPc pouvait être à l'origine du chimiotactisme des monocytes induit par les peptides d'élastine. Uemera et Okamoto (1997) ont confirmé cette hypothèse et l'activation d'une protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) a été démontrée chez ces mêmes cellules [Kamisato et coll., 1997]. Cependant, l'inhibition des PKC n'avait aucun effet sur le chimiotactisme de ces cellules, et les auteurs n'avaient pas relevé d'augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire.

Ces résultats illustrent le fait que le chimiotactisme induit par les peptides d'élastine fait intervenir des voies de signalisation différentes en fonction du type cellulaire stimulé.

La signalisation induite par les peptides d'élastine a également été étudiée dans les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNn), apportant des renseignements supplémentaires. La stimulation de telles cellules par la kE permet d'induire une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et une activation de l'explosion respiratoire. Cependant, il a été également démontré que le complexe récepteur de l'élastine pouvait être couplé à une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTX), et que de l'inositol 3, 4, 5 trisphosphate (IP_3) était formé à partir de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($PI(4,5)P_2$) [Varga et coll., 1989 ; Varga et coll., 1990]. De plus, dans les cellules endothéliales, les peptides d'élastine induisent une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire en activant des canaux calciques [Faury et coll., 1998].

L'ensemble de ces données permet de dresser le schéma récapitulatif suivant :

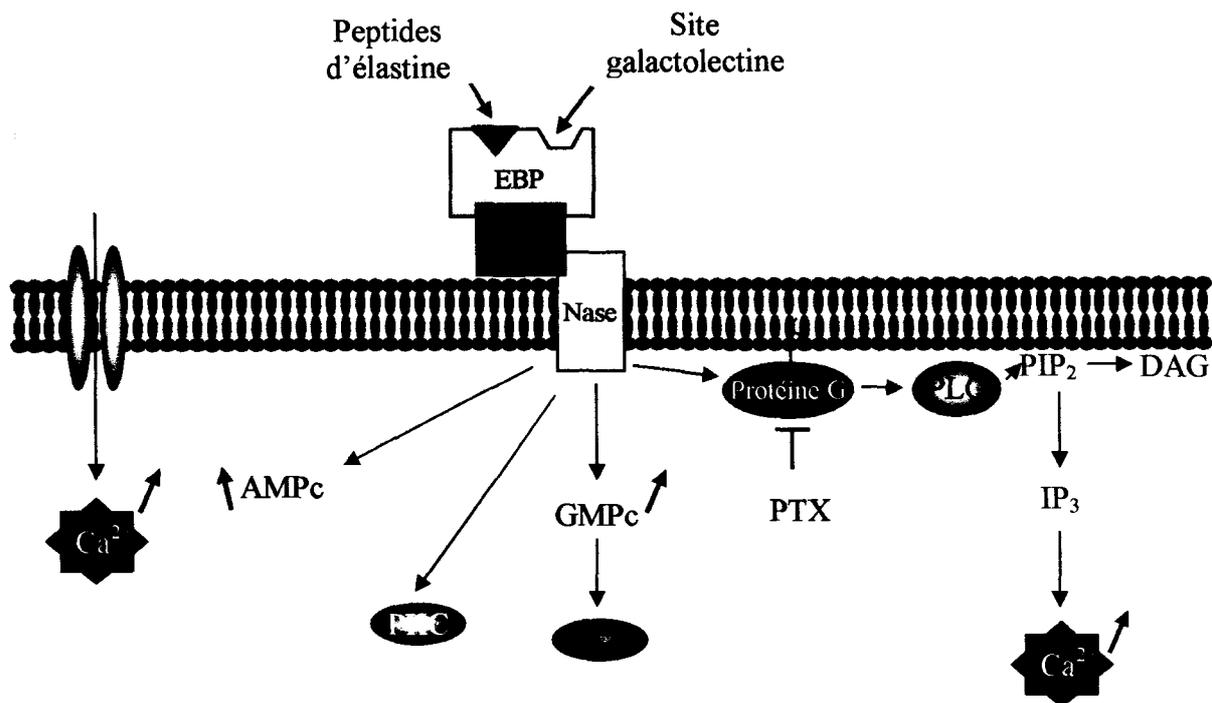


Figure 8 : Résumé des données de la littérature concernant les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine. DAG, diacylglycérol ; EBP, elastin binding protein ; PKC, protéine kinase C ; PKG, protéine kinase G ; PLC, phospholipase C ; PP, Protéine Protectrice ; PTX, toxine pertussique ; Nase, neuraminidase.

Jusqu'à maintenant, aucune étude détaillée de la signalisation induite par le complexe récepteur de l'élastine n'a été entreprise. De plus, les travaux menés n'avaient trait principalement qu'au chimiotactisme de cellules impliquées dans la réaction inflammatoire.

Les peptides d'élastine semblent jouer un rôle prépondérant dans le développement tumoral [Hornebeck et coll., 2002] et particulièrement par leur action sur l'expression de MMPs. Cependant, aucune étude n'a été menée pour déterminer le mécanisme de signalisation par lequel les peptides d'élastine induisent l'expression des MMPs.

III. Les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs)

La MEC est perpétuellement dégradée et renouvelée. Les enzymes protéolytiques responsables de sa dégradation sont des endopeptidases, divisées en quatre groupes en fonction de leur mécanisme enzymatique [Nagase, 1997]:

- les protéases à acide aspartique
- les protéases à sérine
- les protéases à cystéine
- les métalloprotéases

Au sein du groupe des métalloprotéases, une trentaine de familles ont été décrites [Bode et coll, 1992]. Une de ces familles est celle des zincines, appelées ainsi à cause de l'ion Zn^{2+} constitutif de leur site actif. La séquence consensus HEXXH caractéristique de cette famille est retrouvée dans la moitié des enzymes la constituant [Hooper, 1994]. Ce motif fondamental pour la fonction de l'enzyme contient deux des trois résidus histidyl impliqués dans la fixation de l'ion Zn^{2+} et un résidu d'acide glutamique participant au mécanisme catalytique de l'enzyme.

La famille des métalloprotéinases matricielles (*Matrix Metalloproteinases* ou MMPs) appartient à la famille des zincines [Gomis-Rüth, 2003]. Ces enzymes jouent un rôle fondamental dans le renouvellement physiologique de la MEC, ainsi que dans les dégradations matricielles physiopathologiques, comme celles observées lors de l'invasion

tumorale [Westermarck et Kähäri, 1999]. Les métalloprotéinases matricielles constituent ainsi des cibles de premier ordre en thérapie anti-cancéreuse.

III.1. Classification

A l'heure actuelle, plus de 24 membres appartenant à la famille des MMPs ont été identifiés [Egeblad et Werb, 2002]. Ce sont des endopeptidases spécialisées dans la dégradation des molécules de la MEC mais possédant également des substrats non matriciels.

Les MMPs sont définies par des propriétés communes :

- elles dégradent au moins un composant de la MEC
- elles comportent un ion Zn^{2+} au sein de leur site actif
- elles sont sécrétées sous formes latentes et nécessitent une activation correspondant à la protéolyse de leur pro-domaine situé à l'extrémité N-terminale de l'enzyme
- elles sont inhibées par des inhibiteurs spécifiques appelés TIMPs (*Tissue Inhibitor of MetalloProteinases*)

Historiquement, les MMPs ont été divisées en différentes classes (Tableau 3) appelées collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines et métallo-élastase sur la base de leur spécificité de substrats matriciels. Il existe de plus des MMPs associées à la membrane plasmique appelées *Membrane Type Metalloproteinases* (MT-MMPs).

Cependant, avec la découverte de nouveaux substrats non matriciels, une nouvelle classification basée sur la structure de ces protéases a été créée (Figure 9).

En effet, les MMPs participent à la libération de précurseurs membranaires de facteurs de croissance incluant le TGF- α [Peschon et coll., 1998]. De plus, des récepteurs aux facteurs de croissances ont également été décrits parmi les substrats des MMPs. Par exemple, le FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) est clivé par la MMP-2 tandis que HER2 et HER4, deux membres de la famille du récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) ainsi que le récepteur à l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) c-MET sont substrats de MMPs ou d'ADAMs (*A Desintegrin And Metalloproteinase*) non identifiées [Codony-Servat et coll., 1999 ; Vecchi et coll., 1998 ; Nath et coll., 2001].

Famille	Nom	N°	Substrats Matriciels	Autres Substrats
Collagénases	Collagénase intersticielle	MMP-1	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X, gélatine, entactine, agrégannes	Amyloïde A sérique (SAA 3), Serpins
	Collagénase des neutrophiles	MMP-8	Collagènes I, II, III, V, VII, VIII, X, gélatine, fibronectine, agrégannes	Serpins
	Collagénase-3	MMP-13	Collagènes I, II, III, IV, V, X, XI, XIV, gélatine, fibronectine, laminine, téna-scine agrégannes, perlécannes	PAI-2
	Collagénase-4 (Xé-nopus)	MMP-18	Collagène I	
Gélatinases	Gélatinase A	MMP-2	Gélatines, collagènes IV, V, VII, X et XI, élastine, fibronectine, laminine, décorine, entactine	Galectine-3, IL1 β , plasminogène, FGFR1
	Gélatinase B	MMP-9	Gélatines, collagènes IV, V, XIV, fibronectine, élastine	Galectine-3, IL1 β , plasminogène
Stromélysines	Stromélysine-1	MMP-3	Gélatines, fibronectine, laminine, collagènes III, IV, IX, X, vitronectine, protéoglycane	SAA 3, substance P, serpins, IL1 β
	Stromélysine-2	MMP-10	Fibronectine, collagène I, III, IV, V, X, laminine, gélatine	caséine
	Stromélysine-3	MMP-11	Fibronectine, laminine, collagène IV, gélatine	caséine, α 2-macroglobuline, cadhérine-E
	Enamélysine	MMP-20	Amelogénine	
Matrilysines	Matrilysine	MMP-7	Fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, protéoglycannes	chaîneB de l'insuline, caséine, TNF α , plasminogène, cadhérine-E
	Matrilysine 2 (Endométase)	MMP-26	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, gélatine, collagène I, IV	Inhibiteur de protéinase α -1
Métalloélastase	Métalloélastase	MMP-12	Elastine, fibronectine, collagène IV, gélatine, entactine, vitonectine	plasminogène
MMPs de type membranaire	MT1-MMP	MMP-14	Collagènes I, II, III, fibronectine, laminine, vitronectine	Caséine, intégrine α v, CD44
	MT2-MMP	MMP-15	Gélatine, fibronectine, laminine, collagène I, III, nidogène, tenascine, agrégane, perlécan	Caséine
	MT3-MMP	MMP-16	Collagène III, fibronectine, gélatine	Caséine
	MT4-MMP	MMP-17	Gélatine	
	MT5-MMP	MMP-24	Non connu	
	MT6-MMP (Leukolysine)	MMP-25	Collagène IV, gélatine, fibronectine, fibrine	
Autres	Non nommée	MMP-19	Non connu	
	xMMP	MMP-21	Non connu	
	cMMP	MMP-22	Caséine	
	Non nommée	MMP-23	Non connu	
	Epilysine	MMP-28	Caséine	

Tableau 3 : Récapitulatif des Métalloprotéinases Matricielles et de leurs substrats.

Certaines molécules d'adhésion sont également des substrats de MMPs. Le clivage de la cadhérine-E par la matrilysine ou la stromélysine 3 et celui du CD44 par la MMP-14, augmentent le pouvoir invasif des cellules [Noe, 2001 ; Kajita, 2001]. Par ailleurs, le clivage du précurseur de l'intégrine α_v par la MMP-14 stimule la migration des cellules tumorales [Deryugina, 2002].

Enfin, les MMPs clivent et activent leur propres formes zymogènes ainsi que des inhibiteurs de sérine protéases appelées Serpins (*Serine proteases inhibitors*) [Sternlicht, 2001]. Une liste plus exhaustive des substrats matriciels et non matriciels est indiquée dans le tableau 3.

III.2. Structure

Les MMPs peuvent être subdivisées en huit groupes structuraux distincts : cinq correspondent à des MMPs sécrétées et trois à des MMPs membranaires. Cette subdivision correspond à la classification des MMPs basée sur la structure de ces protéases (Figure 9).

Le domaine minimal des MMPs contient une séquence signal amino-terminale (Pre) qui les dirigent vers le reticulum endoplasmique, un propeptide (Pro) contenant un groupement thiol (SH) interagissant avec un ion Zn^{2+} maintenant le zymogène inactif, et un domaine catalytique possédant un site de fixation pour le zinc (Zn).

En plus de ces domaines trouvés dans les MMPs appartenant au groupe des MMPs à domaine minimal (*Minimal-domain MMPs*), les MMPs contenant un domaine hemopexine simple (*single hemopexin-domain-containing MMPs*) possèdent un domaine homopexine-like (connecté au domaine catalytique par une charnière (H)) qui gouverne les interactions avec les TIMPs, avec certaines molécules associées à la surface cellulaire et avec leurs substrats. La première et la dernière répétition du domaine hemopexine-like sont reliées par un pont disulfure (S-S).

Les MMPs liant la gélatine (*Gelatin-binding MMPs*) contiennent des inserts ressemblant aux répétitions de type II de la fibronectine liant le collagène (Fi).

Les MMPs sécrétées et activées par la Furine (*Furin-activated secreted MMPs*), contiennent un motif de reconnaissance pour des protéases à sérine de type Furine (Fu) trouvé entre leur propeptide et leur domaine catalytique permettant leur activation intracellulaire.

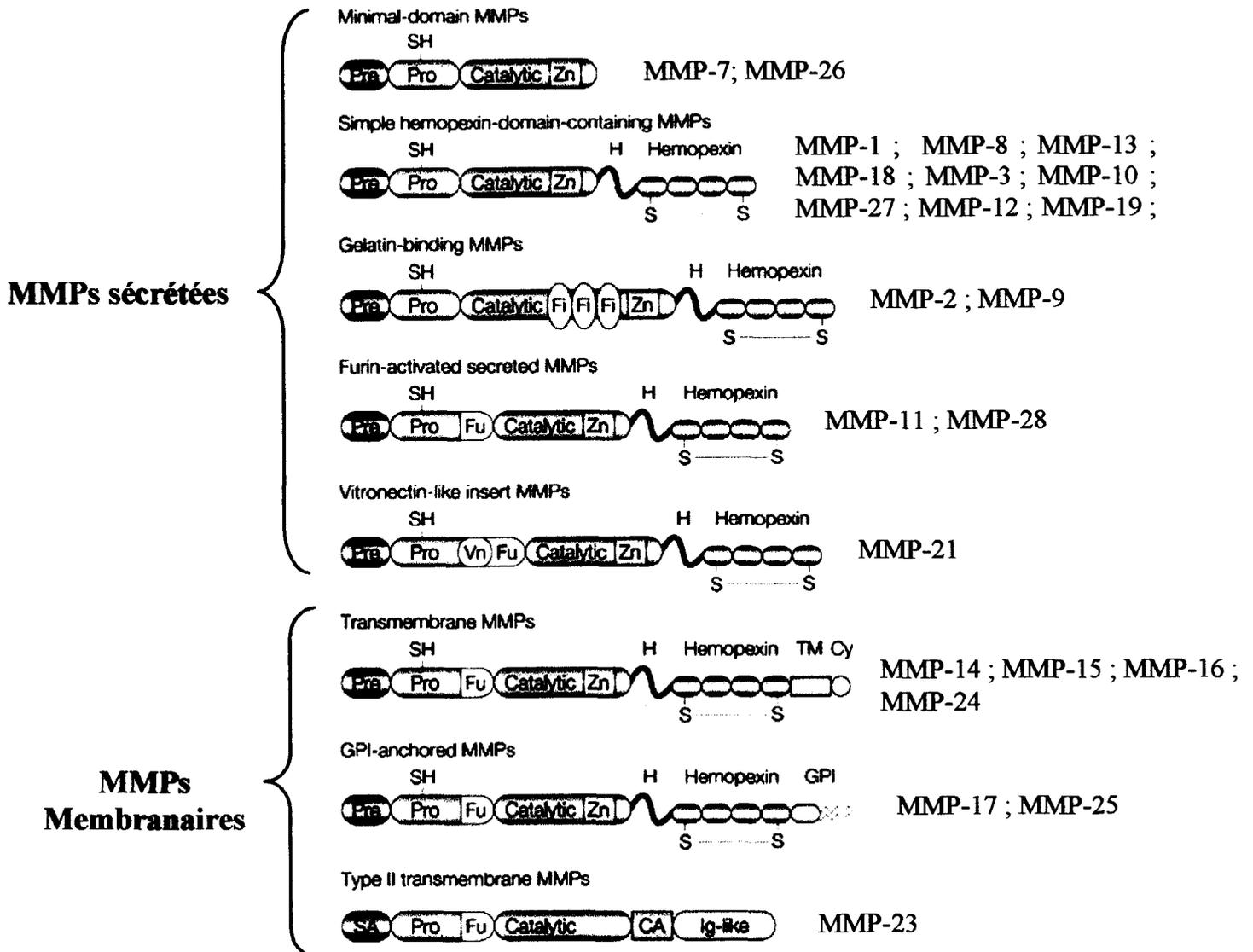


Figure 9 : Organisation modulaire des MMPs.

Pre = Pré-peptide ; Pro = Pro-peptide ; Catalytic = domaine catalytique ; Hemopexin = domaine similaire à l'hémopexine ; Fu = domaine de reconnaissance des sérine protéases à furine intracellulaire ; Vn = domaine similaire à la vitronectine ; Fi = domaine similaire aux séquences répétées de type II de la fibronectine ; H = région charnière ; SH = groupement thiol ; Zn = site de fixation du zinc ; TM = domaine transmembranaire ; Cy = domaine cytoplasmique ; GPI = Glycosylphosphatidylinositol ; CA = domaine riche en cystéine ; Ig-like = domaine similaire à l'Immunoglobuline (d'après Egeblad et Werb, 2002).

Ce motif est également trouvé au sein des MMPs possédant un insert de type vitronectine (*vitronectin-like insert MMPs*) et au sein des MMPs membranaires (*MT-MMPs*).

Ces dernières possèdent un domaine transmembranaire simple (TM), et un domaine cytoplasmique très court (Cy). Les MMPs ancrées au GPI (*GPI-anchored MMPs*) appartiennent au groupe des MMPs membranaires. MMP-23 représente la troisième classe de MMPs membranaires. Elle possède un signal d'ancrage N-terminal (SA) qui l'adresse à la membrane plasmique, et la définit comme MMP transmembranaire de type II. Cette MMP est également caractérisée par son domaine riche en cystéine (CA) et son domaine immunoglobuline-like (Ig).

III.3. Régulation

La régulation des MMPs s'effectue à trois niveaux principaux : au niveau transcriptionnel, au niveau de leur activation par clivage protéolytique du prodomaine et au niveau de leur activité par inhibition de l'enzyme active. D'autres mécanismes de contrôle impliquent la régulation de la stabilité des ARNm, l'efficacité de la traduction, la compartimentalisation et la sécrétion de l'enzyme, le ciblage du substrat ou encore le recrutement et l'internalisation cellulaires.

Il est à noter que contrairement aux oncogènes classiques, la participation accrue des MMPs au développement tumoral n'est pas due à une amplification des gènes ou à des mutations créant des enzymes actives. Les deux seules altérations génétiques observées chez des cellules tumorales sont la translocation du gène de la MMP-23 dans des neuroblastomes [Gururajan et coll., 1998] et l'amplification du gène de la MMP-24 [Llano et coll., 1999].

III.3.1. *Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle*

La plupart des MMPs sont exprimées à faible niveau dans les tissus et ne voient leur expression augmenter que lorsque le remodelage de la MEC est requis ou lors de physiopathologies caractérisées par une forte dégradation matricielle. Une forte conservation d'éléments régulateurs est observée dans les régions promotrices de divers gènes de MMPs tels que MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12 et MMP-13 (Figure10). Leur expression est induite par divers facteurs de croissances (EGF, PDGF), des cytokines (TNF- α , IL-1) et par des facteurs environnementaux tels que le contact avec la MEC [Kähäri et

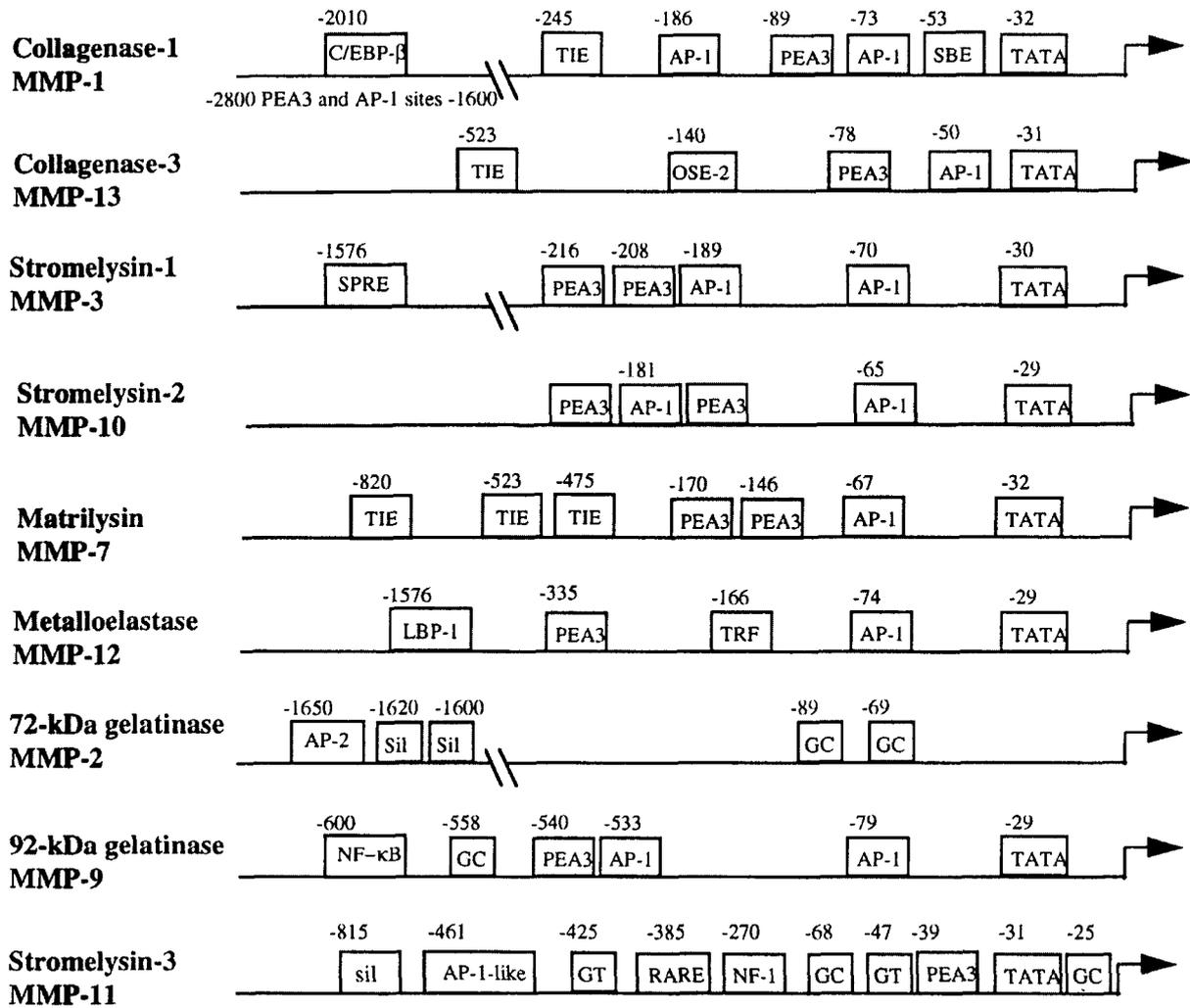


Figure 10 : Éléments de régulation des régions promotrices de quelques MMPs. Ce schéma met en évidence la grande conservation de certains sites de fixation pour des facteurs de transcription tels que AP-1 ou PEA3 au sein des différents promoteurs. AP-1, activator protein-1; PEA3, polyoma enhancer A binding protein-3; TIE, TGF- β inhibitory element; GC, Sp-1 binding site; SBE, STAT binding element; C/EBP- β , CCAAT/enhancer binding protein- β ; OSE-2, osteoblast-specific element-2; SPRE, stromelysin-1 PDGF-responsive element; TRF, octamer binding protein; Sil, silencer sequence; NF- κ B, nuclear factor-kappa Binding ; NF-1, nuclear factor-1; RARE, retinoic acid responsive element (d'après Westermarck et Kähäri, 1999).

Saarialho-Kere, 1997 ; Shapiro, 1998 ; Woessner, 1998 ; Vincenti et coll., 1996 ; Benbow et Brinckerhoff, 1997].

Le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) induit l'expression de MMP-1 et MMP-3 dans de nombreux types cellulaires mais inhibe l'expression de la MMP-2 par les fibroblastes humains normaux et par les cellules tumorales. L'analyse du promoteur de la MMP-2 révèle l'absence de sites de liaison pour des facteurs de transcription de type AP-1 (*Activator Protein -1*) responsables de l'induction de la transcription de nombreuses MMPs, ainsi que l'absence de sites PEA3 (*Polyoma Enhancer Activator 3* ; sites de fixation de facteurs de transcription de la famille ETS) également impliqués dans l'expression d'un grand nombre de MMPs.

Les mécanismes post-traductionnels influencent également la synthèse de MMPs. Les ARNm codants pour la MMP-1 et la MMP-3 sont stabilisés par les esters de phorbols et l'EGF, tandis que les transcrits de MMP-13 sont stabilisés par le PDGF et les glucocorticoïdes, et déstabilisés par le TGF- β [Delany et coll., 1995 ; Vincenti, 2001]. La stabilité de l'ARNm de la MMP-1 est apparemment contrôlée par des séquences AU présentes dans la région 3' non traduite et des séquences semblables peuvent également réguler la stabilité des ARNm d'autres MMPs.

Bien que la plupart des MMPs soient sécrétées après leur traduction, il existe pour certaines d'entre elles un contrôle au niveau de leur sécrétion. Les MMP-8 et MMP-2 sont synthétisées par les granulocytes en différenciation dans la moelle osseuse puis stockées dans des granules spécifiques des neutrophiles circulants avant d'être relargués suite à l'activation de ces cellules par des médiateurs inflammatoires [Hasty et coll, 1990].

Dans le cadre de la thérapie anti-tumorale, il est essentiel de noter que les MMPs sont principalement exprimées par les fibroblastes du stroma, les cellules vasculaires et les cellules inflammatoires infiltrants les tumeurs plutôt que par les cellules tumorales elles mêmes [Bissell et Radisky, 2001].

III.3.2. Régulation de l'activation

Le pro-peptide permet de maintenir les pro-MMPs dans un état inactif (Figure 11). Un groupement thiol provenant d'un résidu cystéyl trouvé à l'intérieur du motif consensus PRCGXPDV dans le domaine pro-peptide lie l'atome de zinc du site actif de l'enzyme, prévenant ainsi l'activation de la pro-MMP. Le processus d'activation des MMPs (Figure 11) est un mécanisme en deux étapes : la première étape correspond au clivage peptidique à l'intérieur du pro-domaine par d'autres MMPs déjà activées ou par certaines sérine protéinases. La cystéine va alors réagir avec une molécule d'eau permettant la rupture de la liaison cystéine/Zn. Cette étape initiale est suivie par un clivage protéolytique du côté C-terminal du site PRCGXPDV par des enzymes activatrices ou par clivage autolytique conduisant à une perte irréversible du résidu cystéine [Nagase et coll., 1999 ; Nagase, 1997 ; Sternlicht et Werb, 2001].

Une autre alternative à l'étape initiale correspond à la rupture de la liaison cystéine/Zn par des méthodes physiques ou chimiques (SDS, NaSCN, les métaux lourds tels que Au(I) ou Hg(II), les composés organo-mercuriques, les oxydants tels que NaOCl, les composés disulfures tels que le glutathion (GSSG) et les agents alkylants le résidu SH tels que l'urée et le NEM (N-éthylmaléimide)).

Cependant, les mécanismes précis d'activation des MMPs *in vivo* restent à élucider puisque les protéases impliquées dans les différentes étapes d'activation des MMPs sont mal connues. Actuellement, seul le mécanisme d'activation de la MMP-2 est bien décrit [Hornebeck et coll., 2002].

III.3.3. Régulation de l'activité

La régulation de l'enzyme active peut se faire par l'inhibition de l'activité de l'enzyme. Outre l'inhibiteur non spécifique α 2-macroglobuline [Travis et Salvesen, 1983], les inhibiteurs physiologiques spécifiques des MMPs sont constitués par la famille des TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) [Lambert et coll., 2004].

A ce jour, quatre TIMPs ont été identifiés et caractérisés chez l'homme :

- TIMP-1, glycoprotéine de 28,5 kDa [Carmichael et coll., 1986]

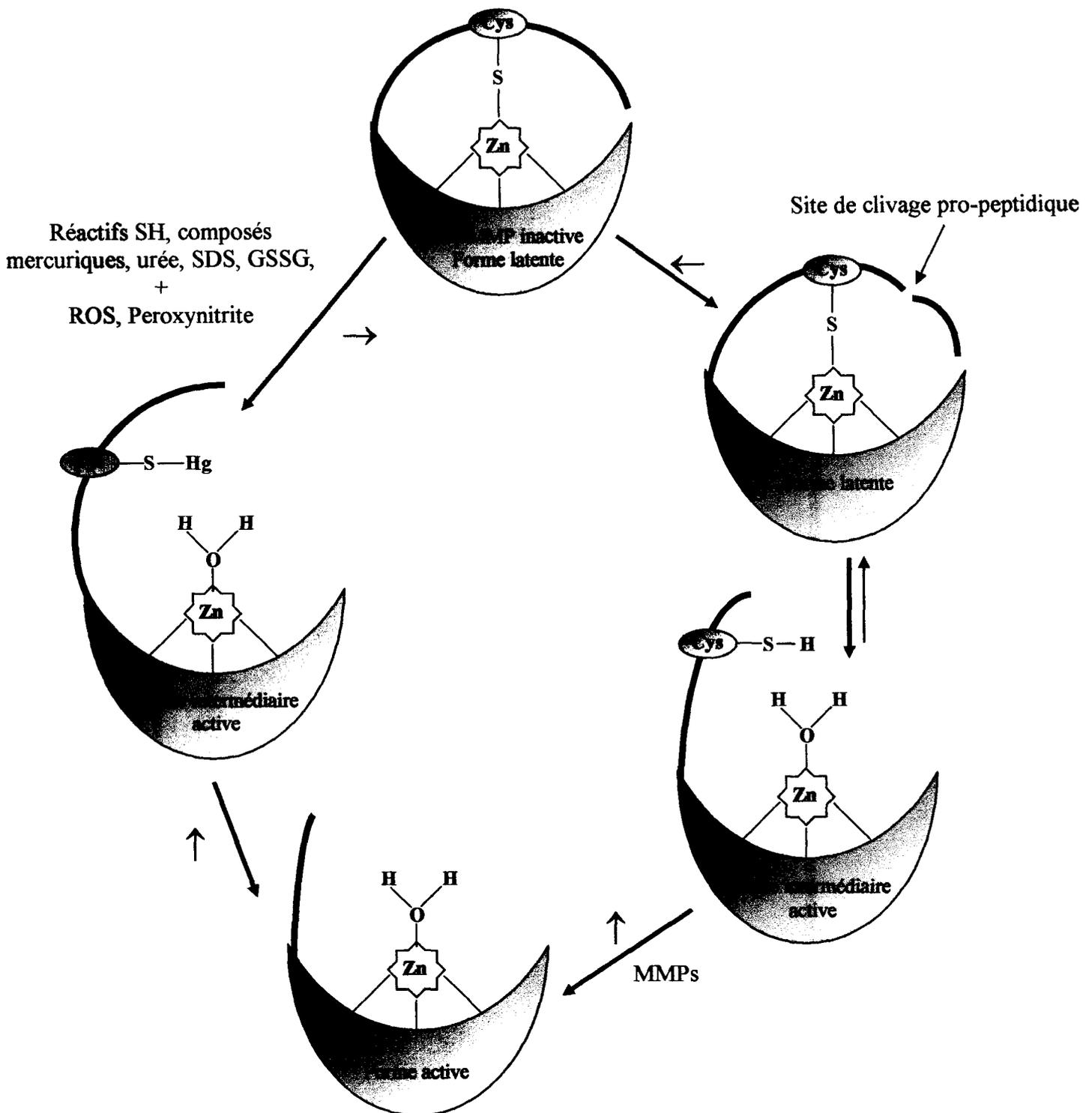


Figure 11: Schéma d'activation des pro-MMPs. ← Clivage enzymatique protéolytique du pro-peptide réalisé par d'autres MMPs actives ou par des sérine protéases pour générer la forme intermédiaire. La cystéine va alors réagir avec une molécule d'eau permettant la rupture de la liaison cystéine/Zn. ↑ Dans une seconde étape, la forme intermédiaire peut être clivée par l'action de MMPs (MMP-3, MMP-1) pour générer la forme pleinement active de MMP. → D'une manière alternative, les réactifs qui réagissent avec le groupement SH peuvent aussi activer la pro-MMP (d'après Novotna et Herget, 2002).

- TIMP-2, non glycosylé, 21 kDa [Stetler-Stevenson et coll, 1989]
- TIMP-3, possédant un site de glycosylation à son extrémité C-terminale [Apte et coll, 1994]
- TIMP-4, non glycosylé, de 22 kDa [Greene et coll., 1996]

En plus de ces inhibiteurs spécifiques, d'autres molécules capables d'inhiber les MMPs ont été décrites récemment. Le TFPI2 (*tissue-factor pathway-inhibitor-2*), inhibiteur de serine protéases peut également agir comme un inhibiteur de MMPs [Herman et coll, 2001]. Le clivage du PCPE (*Procollagen-C-terminal proteinase enhancer protein*), par la plasmine conduit à la libération d'un fragment C-terminal similaire au domaine inhibiteur de TIMPs possédant une activité inhibitrice des MMPs [Mott et coll, 2000]. De la même façon, des inhibiteurs de MMPs structurellement similaires aux TIMPs peuvent être trouvés dans les domaines NC1 du collagène de type IV ainsi que dans le domaine de fixation de l'agrine à la laminine [Netzer et coll, 1998 ; Stetefeld et coll, 2001].

Une autre manière de contrôler l'activité des MMPs consiste à réguler leur endocytose. Par exemple, la thrombospondine-2 peut se lier à la MMP-2 dans un complexe facilitant l'endocytose médiée par le récepteur LRP (*LDL receptor-Related Protein*) [Sid et coll., 2004].

III.4. Rôle des MMPs dans la dégradation de la MEC

III.4.1. *Renouvellement physiologique de la MEC*

Le renouvellement de la MEC est le résultat d'un phénomène dynamique dont le bon déroulement repose sur l'équilibre de trois événements principaux : la dégradation de ses constituants par des protéases spécifiques, la modulation de l'activité de ces enzymes par des inhibiteurs et la néosynthèse des protéines matricielles.

Dans la peau, les fibroblastes dermiques, cellules du stroma, ont pour principale fonction le remodelage tissulaire. Ces cellules synthétisent de nombreuses protéines de la MEC comme la tropoélastine, les collagènes de type I et III, des protéoglycannes ou encore la fibronectine mais synthétisent également les MMPs impliquées dans le catabolisme de ces

constituants telles que la MMP-1, la MMP-2 et la MMP-3. Ils expriment également leurs inhibiteurs, TIMP-1 et TIMP-2.

La résorption de la MEC est initiée par les MMPs permettant ensuite l'intervention de protéinases moins spécifiques. Le contrôle de l'activité protéasique est assuré par la sécrétion cellulaire d'inhibiteurs de ces protéases, ou par leur libération de la matrice comme c'est le cas pour le TIMP-3 [Leco et coll, 1994]. L'équilibre entre ces protéases et leurs inhibiteurs, et donc particulièrement l'équilibre MMPs/TIMPs, détermine le niveau de protéolyse matricielle [Liotta et coll, 1991].

Dans certains cas, l'expression et la sécrétion de MMPs est largement excédentaire par rapport aux TIMPs. Ceci est particulièrement observé dans le cadre de la pathologie tumorale, favorisant ainsi le développement de la tumeur primaire et la formation de métastases.

III.4.2. *L'invasion tumorale et la formation des métastases*

Les métastases, contrairement aux tumeurs primaires, sont responsables de la plupart des décès. Fort de ce constat, il apparaît que l'utilisation de thérapies basées sur le blocage de leur formation offre une approche de premier ordre dans le cadre de la thérapie anti-tumorale [Chambers et coll., 2002].

Dans ce but, la compréhension détaillée des mécanismes complexes impliqués dans l'invasion tumorale est requise. La participation du stroma à un tel phénomène, et particulièrement des cellules stromales que sont les fibroblastes, est fondamentale.

L'invasion tumorale est un évènement multifactoriel dans lequel la motilité cellulaire est associée à une protéolyse matricielle et implique des interactions entre les cellules tumorales et la MEC. Durant ce processus, les cellules malignes se détachent de la tumeur primaire, migrent et envahissent les tissus en passant au travers de barrières structurales, la MEC stromale et les membranes basales [Johansson et coll., 2000 ; Johansson et Kähäri, 2000]. Elles se retrouvent dans la circulation sanguine et créent des métastases dans des organes distants [Chambers et coll., 2002] (Figure 12).

Les MMPs jouent un rôle important dans ce processus aux différentes étapes que sont la croissance tumorale, l'invasion et la formation des métastases.

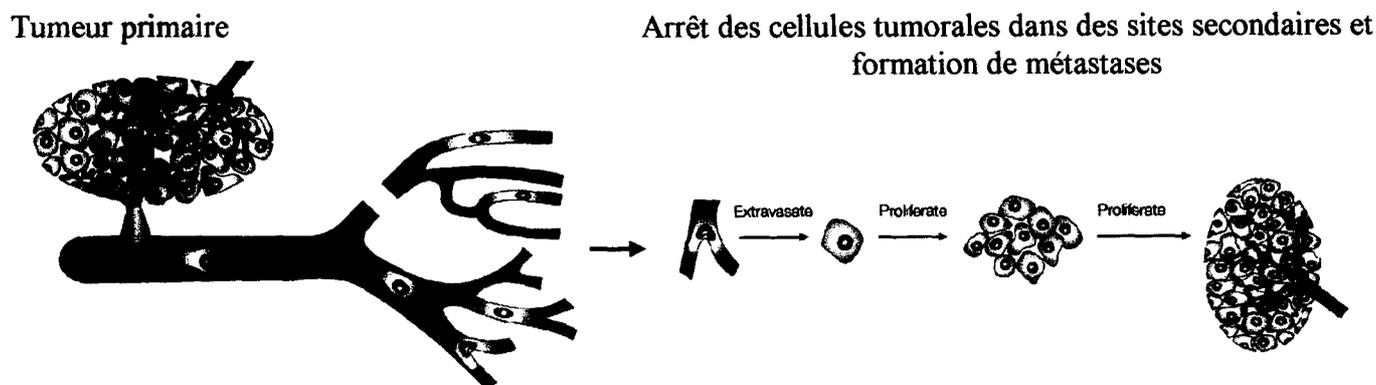


Figure 12 : L'invasion tumorale. *Une cellule quitte la tumeur primaire et se fraie un passage au travers du stroma et de la membrane basale de l'endothélium vasculaire pour se retrouver dans la circulation sanguine. Elle effectue ensuite ces étapes dans l'ordre inverse, prolifère et forme des métastases au sein du nouveau tissu hôte (d'après Chambers et coll, 2002).*

Mais, de nombreuses études ont également démontré l'importance fondamentales des interactions cellules tumorales – cellules stromales durant ces processus et plus particulièrement l'importance des fibroblastes [Noël et coll., 1994].

Le remodelage de la MEC péritumorale est associé à de multiples mécanismes dans lesquels les fibroblastes interviennent essentiellement : surproduction d'éléments de la MEC, prolifération de ces cellules et production importante de MMPs dont la collagénase intersticielle (MMP-1) (Figure 13).

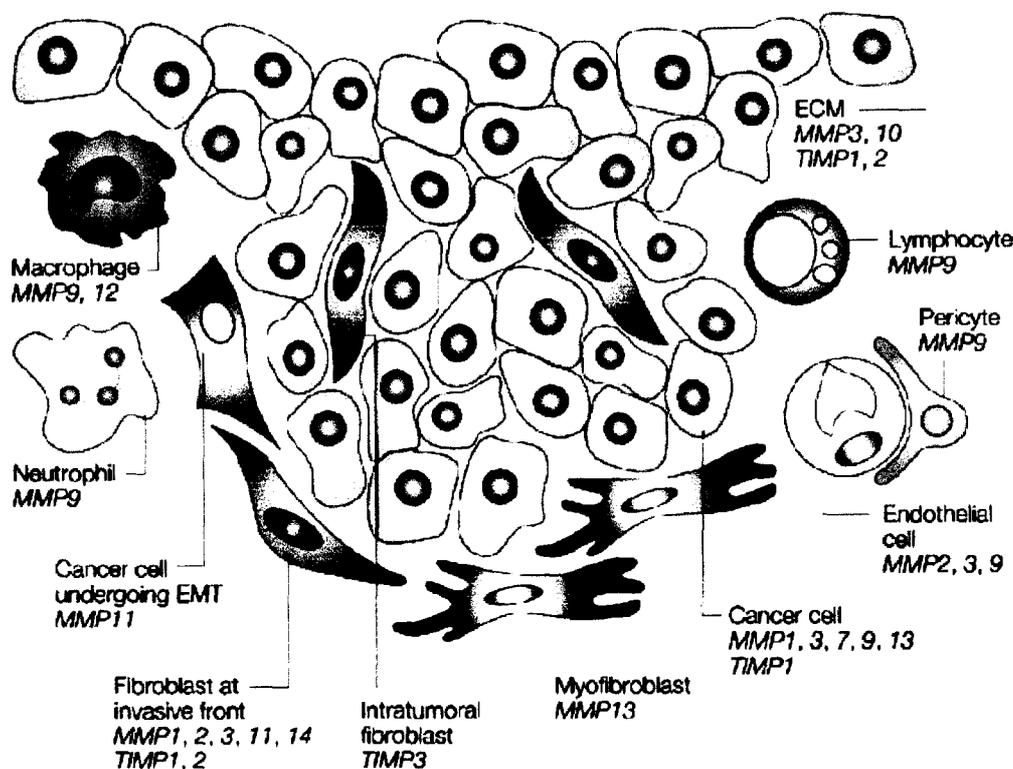


Figure 13 : Expression des MMPs et des TIMPs lors de l'invasion tumorale. De nombreux types cellulaires participent au développement tumoral en sécrétant différents types de MMPs. Cette figure illustre la participation essentielle des fibroblastes dans l'expression des MMPs cruciales au développement de la tumeur. Il est à noter que la composante inflammatoire associée au cancer est ici bien représentée (d'après Egeblad et coll., 2002).

La MMP-1 est la principale protéase exprimée par les fibroblastes capable de dégrader les collagènes fibrillaires dont les collagènes I, II et III. Son expression est corrélée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de tumeurs malignes [Murray et coll., 1996 ; Inoue et coll., 1999 ; Ito et coll., 1999]. Elle constitue, par ce fait, une cible de choix dans la thérapie anti-cancer basée sur la participation du stroma au développement tumoral, appelée réaction stromale.

IV. Voies de signalisation

Des études préalables réalisées au sein de notre laboratoire ont permis de démontrer que les peptides d'élastine, et particulièrement la kE, induisent l'expression de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques humains. L'utilisation de lactose a mis en évidence que la production de cette MMP met en jeu l'EBP, et qu'en présence de plasmine, cette métalloprotéase est activée et dégrade fortement le collagène de type I [Brassart et coll, 2001].

Les fibroblastes et la MMP-1 sont cruciaux pour le développement tumoral, et la participation probable des peptides d'élastine dans ce processus s'impose de plus en plus (tableau 1 ; voir paragraphe I. 6.2. *Activités biologiques des peptides d'élastine*). Les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine sont, comme nous l'avons vu précédemment, peu connues et aucune étude détaillée n'a jusqu'à présent été menée.

Le promoteur de la MMP-1 et certaines voies de signalisation régulant son activité sont connus [Westermarck et Kähäri, 1999]. Ces différents éléments vont nous permettre de caractériser certaines cibles de la transduction du signal de l'EBP afin (i) de mieux comprendre la signalisation induite par ce récepteur, (ii) d'étudier comment les peptides d'élastine régulent l'expression de la MMP-1, afin de proposer certaines cibles potentiellement intéressantes dans des stratégies thérapeutiques ayant pour but de limiter la participation de la dégradation de l'élastine à la progression tumorale.

IV.1. Promoteur du gène de la MMP-1 et facteurs de transcription

Le promoteur de la MMP-1 possède de nombreux sites de régulation :

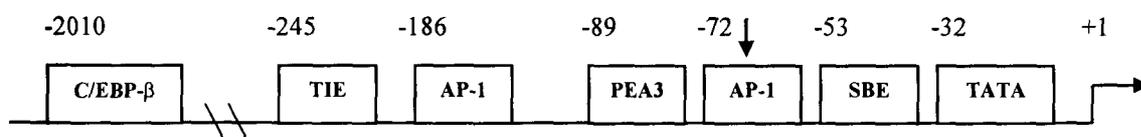


Figure 14: Sites de fixation pour des éléments de régulation présents dans le promoteur du gène de la MMP-1. AP-1, activator protein-1 ; PEA3, polyoma enhancer A binding protein-3 ; TIE, TGF- β inhibitory element ; SBE, STAT binding element ; C/EBP- β , CCAAT/enhancer binding protein β . Le site PEA3 fixe les facteurs de transcription de la famille ETS. L'élément AP-1 situé entre les positions -72 et -66 pb est indiqué par la flèche. Il est à noter qu'un site PEA3 et un site AP-1 sont présents respectivement à -2800 et -1600 pb (d'après Westermarck et Kähäri, 1999).

Diverses études ont montré que l'augmentation de l'expression de la MMP-1 observée suite à l'action de facteurs de croissance, de cytokines ou d'agents promoteurs de tumeurs est le fait de liaison de facteurs de transcription AP-1 et ETS adjacents et présents au niveau de son promoteur [Westermarck et Kähäri, 1999]. Les facteurs de transcription de la famille AP-1 jouent un rôle majeur dans cette régulation, notamment en se fixant sur l'élément AP-1 situé entre les positions -72 pb et -66 pb. En effet, la mutation de cet élément bloque presque totalement l'activité basale du promoteur et sa réponse aux stimuli externes [Lee et coll., 1996 ; Doyle et coll., 1997 ; Westermarck et coll., 1997]. Ce site est donc un élément crucial de la régulation de l'expression de la MMP-1.

Les facteurs de transcription de la famille AP-1 sont des dimères possédant une structure *leucine zipper* et se lient à l'ADN sur une séquence consensus 5'-TGA G/C TCA-3' [Karin et coll., 1997 ; Eferl et Wagner, 2003]. Trois membres principaux de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD) ont été identifiés et intensément étudiés. Quatre membres de la famille Fos (cFos, Fra-1, Fra-2 et FosB) ont été caractérisés. Les membres de la famille Jun peuvent lier l'ADN en tant qu'homodimères Jun/Jun ou d'hétérodimères Jun/Fos. Les protéines de la famille Fos ne forment pas d'homodimères et peuvent se lier à l'ADN en absence de Jun (Figure 15). Les différents dimères AP-1 se lient à l'ADN avec différentes affinités, mécanismes en partie responsable des divers effets biologiques des complexes AP-1.

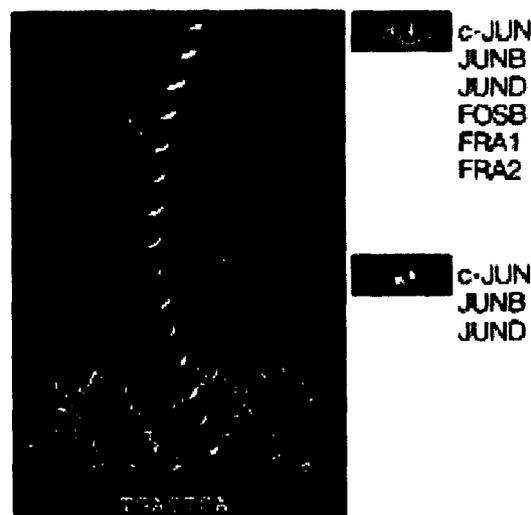


Figure 15 : Représentation d'un dimère c-Fos/c-Jun lié à l'ADN. Les différentes combinaisons d'associations Jun/Fos sont indiquées (d'après Eferl et Wagner, 2003).

Plusieurs études de cotransfections ont montré que la surexpression de protéines de la famille Jun et Fos augmentent l'activité du promoteur de la MMP-1, tandis que l'expression d'un ADNc antisens de c-Jun bloque l'augmentation de l'expression de ce gène.

Il a de plus été montré que l'induction simultanée des ARNm de c-Jun et JunB par plusieurs types de stimuli précède l'expression de la MMP-1 [Kähäri et Saarialho, 1997 ; Vincenti et coll., 1996 ; Benbow et Brinckerhoff, 1997].

L'élément PEA3 adjacent au site AP-1 sur le promoteur de la MMP-1 lie les facteurs de transcription de la famille ETS. Les protéines ETS possèdent un motif hélice-boucle-hélice reconnaissant la séquence consensus riche en purine A/C GGA A/T [Sharrocks et coll, 1997]. Cependant, bien qu'il ait été montré que des protéines de la famille ETS puissent transactiver des promoteurs artificiels ne contenant que des éléments PEA3, les facteurs de transcriptions ETS ne se lient pas seuls à l'ADN. Ils forment des complexes avec d'autres facteurs de transcriptions et particulièrement AP-1. Les protéines ETS jouent donc le rôle de coactivateurs en augmentant l'activité des facteurs de transcriptions AP-1 [Sharrocks et coll., 1997 ; Carrere et coll., 1998].

IV.2. Les voies de signalisation MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

Les capacités de liaison à l'ADN et de transactivation de facteurs de transcriptions AP-1 sont régulées par la famille des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK), sérine-thréonine kinases qui médient des signaux provenant de récepteurs membranaires activés par divers facteurs de croissance, cytokines, hormones, ainsi que par les contacts cellules-cellules et cellules-matrice [Minden et Karin, 1997 ; Robinson et Cobb., 1997 ; Lewis et coll., 1998].

Trois voies MAPK ont été caractérisées en détail :

- la voie ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase 1/2*)
- la voie JNK1/2 / SAPK (*c-Jun N-terminal Kinase 1/2 / Stress Activated Protein Kinase*)
- la voie p38

D'autres MAPKs activées préférentiellement par le stress, ERK5 et ERK6, ont été récemment caractérisées [Robinson et Cobb, 1997 ; Lewis et coll, 1998].

L'unité de base des MAPKs est composé d'un noyau de trois kinases, s'activant par cascade de phosphorylation (Figure 16) :

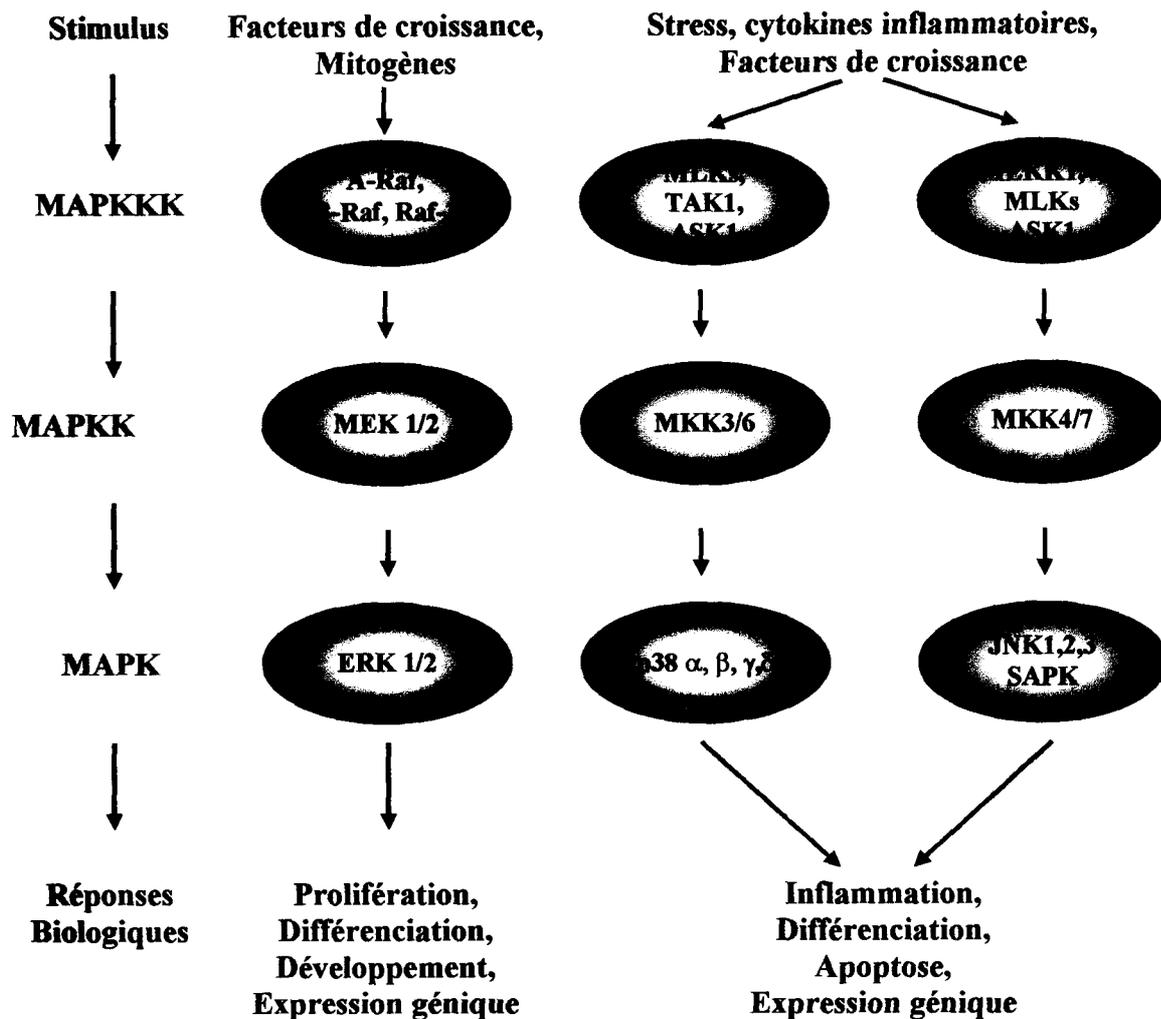


Figure 16 : Cascades de signalisation MAPKs.

Les abréviations utilisées sont : ASK, Apoptosis Signal-regulated Kinase ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; JNK/SAPK, c-jun N-terminal kinase / Stress Activated Protein Kinase ; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase ; MAPKK, MAPK kinase ; MAPKKK, MAPK kinase kinase ; MEK, MAPK/ERK kinase ; MEKK, MAPK/ERK kinase kinase ; MLK, Mixed Lineage Kinase ; MKK, MAPK kinase kinase ; TAK, TGF- β Activated Kinase (d'après Garrington et Johnson, 1999).

L'activité transcriptionnelle de c-Jun et sa stabilité sont augmentées par phosphorylation des serines 63 et 73 par JNK1/2 tandis que la phosphorylation des thréonines 91 et 93 augmentent son activité de liaison à l'ADN [Minden et Cobb, 1997]. L'activation de ERK1/2 induit l'activation de c-Jun par phosphorylation sur la sérine 247 [Eferl et Wagner, 2003], et augmente son expression [Leppä et coll., 1998]. Bien que p38 ne phosphoryle pas directement c-Jun, elle contribue à augmenter l'activité d'AP-1 par l'activation de facteurs de transcriptions (ATF-2, MEF2C, Elk-1, SAP-1) qui augmentent l'expression des gènes de c-Fos et c-Jun [Minden et Cobb, 1997].

La phosphorylation de c-Fos par ERK2 stabilise la protéine et augmente ses capacités de transactivation. De plus, l'activité de liaison à l'ADN de SAP-1 et Elk-1, qui participent à l'augmentation de l'expression de c-Fos au travers d'éléments de réponses au sérum, est régulée par les voies ERK1/2, p38 et JNK1/2 [O'hagan et coll., 1996].

Dans les fibroblastes dermiques humains, l'expression de la MMP-1 induite par différents agonistes est sous le contrôle de diverses voies MAPK et d'AP-1. La stimulation de ces cellules par l'IL-1 β induit la formation de céramides responsables de l'activation des voies ERK1/2, p38 et JNK1/2, toutes trois impliquées dans l'expression de MMP-1 [Reunanen et coll., 1998]. Ces trois groupes de MAPK sont également requis pour l'expression de cette MMP par l'acide okadaïque [Westermarck et coll., 1998].

De plus, il a été montré que l'augmentation d'expression de la MMP-1 obtenue suite à l'activation de ERK1/2 par transfection d'un mutant constitutivement actif de MEK1 dans des fibroblastes dermiques humains est due à l'augmentation d'expression de c-Jun, c-Fos et JunB et à l'activation des complexes AP-1. Au contraire, l'activation de p38 ne joue pas sur l'augmentation d'expression du gène mais sur la stabilité de l'ARNm [Reunanen et coll. 2002].

Cependant, le rôle majeur de la voie ERK1/2 dans l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes a été mis en avant par l'utilisation de mutants actifs des voies MAPK précitées. L'activation de la voie ERK1/2 par transfection de mutants dominants positifs de Ras et de Raf-1 ainsi que l'utilisation d'esters de phorbols, permet d'augmenter de manière importante l'activité du promoteur de la MMP-1 et l'expression de son ARNm. A l'opposé, l'activation des voies p38, et JNK1/2 par TAK1, MKK3 et MKK6 ou le traitement par de l'anisomycine ou de l'arsenite n'augmentent que très faiblement l'expression de MMP-1. L'activation de la

cascade MKK3-p38 α bloque l'activation de la voie ERK1/2 et l'expression de MMP-1 par activation des phosphatases PP1 et PP2A qui déphosphorylent et inactivent MEK1/2, illustrant le rôle ambivalent de p38 dans l'expression de la MMP-1 [Westermarck et coll., 2001].

IV.2.1. La voie p38

La voie de signalisation p38 joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus cellulaires incluant l'inflammation, la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose. L'isoforme p38 α (MM = 38 kDa) a été la plus étudiée. Son activation a lieu lors de la stimulation des cellules par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α par exemple), divers ligands de récepteurs couplés à des protéines G, des facteurs de croissance tels que l'IGF, le PDGF ou le VEGF ou encore les chocs thermiques [Ono et Han, 2000]. En plus de p38 α , trois autres isoformes (β , γ , δ) ont été découvertes chez les mammifères. p38 α et p38 β sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que p38 γ est principalement exprimée dans les muscles squelettiques, et p38 δ dans les testicules, les poumons, les reins, le pancréas et l'intestin court [Kumar et coll., 1997].

Bien que p38 β , γ et δ aient été clonées (respectivement 39, 43, 40 kDa), il n'y a que très peu d'informations concernant leur activation et les conditions dans lesquelles elles sont activées. La famille p38 est activée par des MAP kinases kinases spécifiques, les MKKs. Ces kinases activent p38 par double phosphorylation sur thréonine et tyrosine sur un motif conservé TGY [English et Cobb, 2002] et montrent des préférences vis à vis des isoformes qu'elles activent. Ainsi, MKK6 peut activer toutes les isoformes de p38 tandis que MKK3 active préférentiellement p38 α , β et δ [Keesler et coll., 1998]. Les JNK kinases MKK4 et MKK7 pourraient également activer p38. En effet, l'activation de p38 α et p38 γ par MKK4 ainsi que l'activation de p38 δ par MKK7 ont été montrées [Jiang et coll., 1996 ; Hu et coll., 1999].

La spécificité de substrat des MKKs pourrait être une raison au fait que ces différentes kinases ont des fonctions biologiques distinctes. Ainsi, MKK6 est un inducteur d'apoptose des cellules Jurkat plus puissant que MKK3 [Huang et coll., 1997].

Plusieurs kinases activatrices des MKKs ont été recensées, expliquant pourquoi la voie p38 peut être activée par de nombreux stimuli. Elles incluent MLK2, MLK3, ASK1 et TAK1 [Ono et Han, 2000] qui phosphorylent MKK3 et MKK6 sur le motif conservé SVAKT. Il a été montré que la surexpression de MLK3 et ASK1 permet d'activer JNK et p38, ceci pouvant expliquer pourquoi ces deux voies sont souvent co-activées.

Considérant le rôle important que la petite protéine G Ras peut jouer dans l'activation de la voie ERK1/2 (cf IV.2.3. *La voie ERK1/2*), de nombreux groupes se sont intéressés à la régulation de la voie p38 par les protéines de bas poids moléculaires liant le GTP. Grâce à l'utilisation de techniques de cotransfection, il a été montré que les petites protéines G Rac et Cdc42 jouent un rôle critique dans la régulation de cette voie [Zhang et coll., 1995 ; Bagrodia et coll., 1995]. MLK2 et 3, par exemple, possèdent un domaine de liaison à Rac/Cdc42, renforçant le rôle de ces petites protéines G dans l'activation de la voie p38 [Tibbles et coll., 1996 ; Nagata et coll., 1998]. De plus, l'implication des sérine-thréonine kinases de la famille PAK (*p21-activated kinase*), activées par liaison à Cdc42 ou Rac, semblent jouer un rôle important dans l'activation de la voie p38 par ces petites protéines G et par l'IL-1 β [Ono et Han, 2000].

Les protéines G hétérotrimériques peuvent également activer la voie p38. Ainsi, l'interaction entre les chimiokines fMetLeuPhe (fMLP) et PAF (*Platelet Activating Factor*) avec leurs récepteurs respectifs couplés à des protéines G peut induire l'activation de cette voie.

IV.2.2. *La voie JNK*

La famille JNK (JNK1, 2 et 3), également nommées *Stress Activated Protein Kinase* (SAPK), représentent un groupe d'enzyme activées par des cytokines telles que le TNF- α ou l'IL1- β et par divers stress (osmotique, UV, redox). Ces MAPKs sont requises pour la morphogénèse de l'embryon et contribuent particulièrement à l'induction de l'apoptose [Davis, 2000].

JNK1 et JNK2 sont exprimées de manière ubiquitaire tandis que JNK3 est principalement exprimée dans le cerveau, le cœur et les testicules. L'activation des JNKs est obtenue par double phosphorylation sur thréonine et tyrosine sur un motif conservé TPY

[English et Cobb, 2002] par deux MKKs, MKK4 et MKK7. MKK4, également appelée SEK1 (*SAPK/ERK kinase1*) se lie à l'*actin-binding protein 280* (ABP-280) et cette interaction apparaît essentielle pour l'activation de JNK par MKK4 [Marti et coll., 1997]. MKK7 est la seconde kinase activatrice de JNK. La présence chez les mammifères de deux activateurs de JNK indique que soit MKK4, soit MKK7, peuvent activer JNK en répondant à des stimuli distincts.

Pour être activées, MKK4 et 7 sont phosphorylées respectivement sur les motifs SIAKT et SKAKT [English et Cobb, 2002]. De nombreuses kinases phosphorylant et activant MKK4 et 7 ont été décrites. Elles incluent MEKK1, MEKK4, des protéines de la famille MLKs, ASK1 et TAK1. PAK, la *germinal center kinase* (GCK) et l'*hematopoietic progenitor kinase* (HPK) peuvent également activer la voie JNK, mais le mécanisme impliqué est inconnu [Ip et Davis, 1998].

Les petites protéines G de la famille Rho sont d'importants intermédiaires des voies de signalisation conduisant à l'activation des JNKs. Initialement, la famille PAK était suspectée d'être responsable des effets de la famille Rho sur l'activation de la voie JNK. Cependant, il a été démontré que ceci pourrait plutôt être dû aux MLKs [Whitmarsh et Davis, 1996 ; Gallo et Johnson, 2002].

IV.2.3. La voie ERK1/2

La voie ERK1/2 fut la première cascade MAPK à être caractérisée. C'est probablement une des voies de signalisation les plus connues, au regard des différentes fonctions biologiques importantes qu'elle régule telles que la prolifération, la différenciation cellulaire, et la survie. Beaucoup de stimuli différents, incluant de nombreux facteurs de croissance, des cytokines, l'infection virale, divers ligands de récepteurs couplés aux protéines G et les agents transformants tel que le TPA activent cette voie [Johnson et Lapadat, 2002].

ERK1 (44 kDa, également appelée p44) et ERK2 (42 kDa, également appelée p42) sont activées par phosphorylation sur thréonine et tyrosine sur le motif consensus TEY par MEK1 (44 kDa) et MEK2 (45 kDa) qui sont elles mêmes activées par phosphorylation sur les sérines du motif conservé SMANS par des kinases appelées Raf [English et Cobb, 2002].

Chez les mammifères, la famille Raf comprend Raf-1 (également nommé c-Raf), homologue cellulaire de l'oncogène viral v-Raf, B-Raf et A-Raf. Raf-1 est exprimé de manière ubiquitaire tandis que A-Raf et B-Raf possèdent un profil d'expression beaucoup plus restreint, et sont respectivement exprimées à un niveau élevé dans le tissu urogénital et dans le cerveau [Hagemann et Rapp, 1999]. Nous nous intéresserons ici uniquement à Raf-1 et B-Raf.

IV.2.3.1. La kinase Raf-1

Raf-1 est une kinase de 74 kDa typiquement activée par la petite protéine G Ras, elle-même typiquement activée par des récepteurs à tyrosine kinase (RTK). L'implication de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et de différentes isoformes de PKC dans son activation ont été décrites [Dhillon et Kolch, 2002].

L'activation de Raf-1 requiert la phosphorylation de la sérine 338 et de la tyrosine 341. La phosphorylation de S338 est cruciale dans l'activation de la kinase car sa mutation en alanine empêche totalement son activation [Diaz et coll., 1997 ; Barnard et coll., 1998 ; Mason et coll., 1999]. Cependant, il est à noter que même si la phosphorylation de Raf-1 sur S338 est essentielle à son activation, son analyse n'est pas suffisante pour conclure que Raf-1 est activée [Mason et coll., 1999 ; Chiloeches et coll., 2001].

Diverses études ont suggéré que la PI3K participe à la phosphorylation et à l'activation de Raf-1 [Chaudary et coll., 2000 ; Sun et coll., 2000 ; Mansat-De Mas et coll., 2003].

Trois classes de PI3K ont été caractérisées [Anderson et Jackson, 2003] en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrat. Les PI 3-kinases possèdent un domaine catalytique (PI3Kc) qui est retrouvé dans les PI 4-kinases [Wymann et coll., 1998 ; Vanhaesebroeck et coll., 2001]. Les PI 3-kinases présentent également un site d'homologie avec la PKC (C2) et les PI 3-kinases I et II possèdent un site de fixation à la petite protéine G Ras (domaine RasB) (Figure 17).

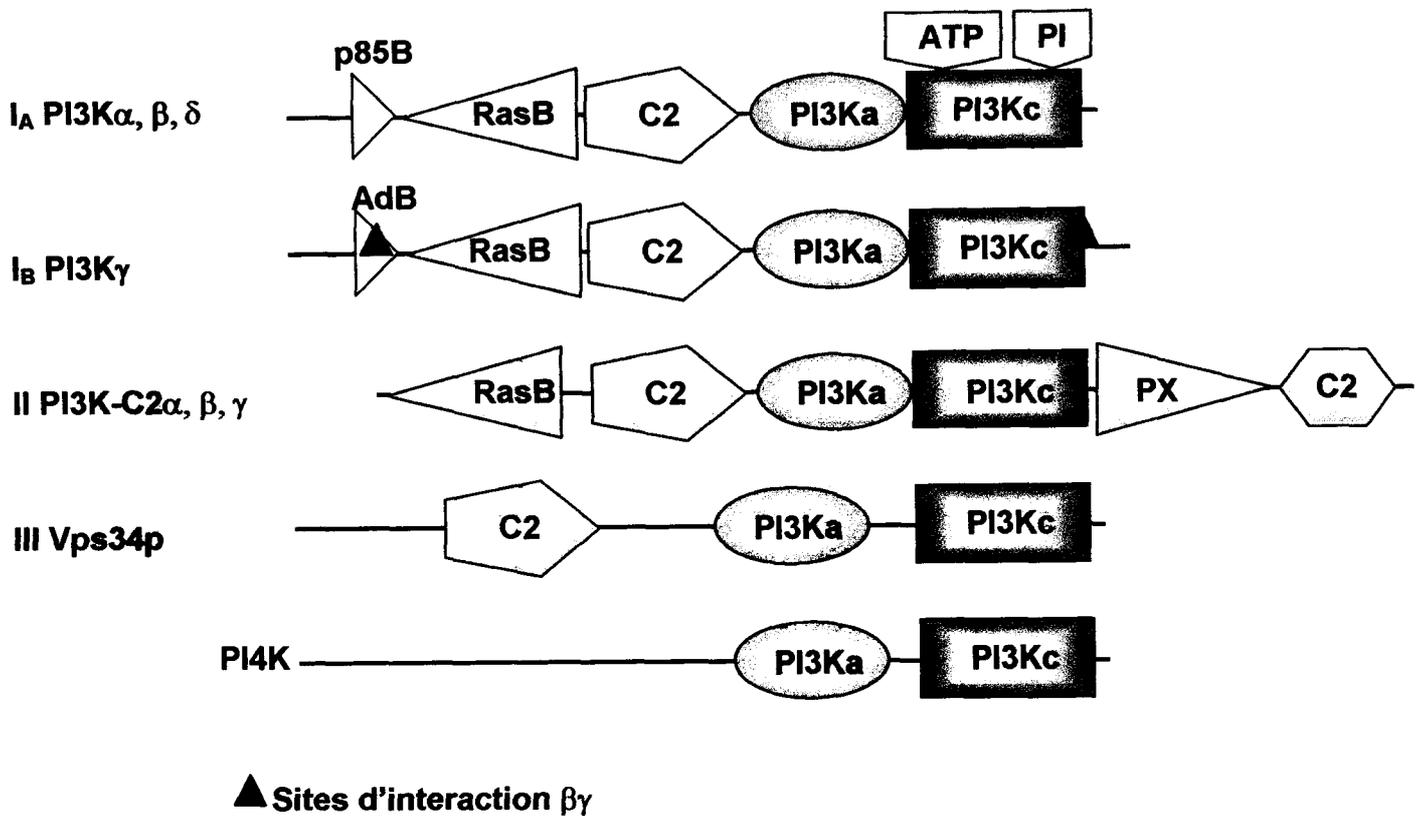


Figure 17 : PI 3-kinases et protéines présentant des homologies avec les PI 3-kinases.

p85B : domaine de fixation à la p85 ; *RasB* : domaine de fixation à la protéine Ras ; *C2* : domaine d'homologie à la PKC ; *PI3Ka* : domaine accessoire ; *PI3Kc* : domaine catalytique ; *AdB* : site de fixation de la p101 ; *PX* : domaine Phox ; *ATP* : site de liaison de l'ATP ; *PI* : site de liaison du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.

Suite à leur activation par Ras ou divers récepteurs de surfaces, les PI3K de classe I (I_A et I_B) phosphorylent le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) en phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃). Ce lipide permet le recrutement membranaire de diverses protéines de signalisation avec pour conséquence leur relocalisation à la membrane et/ou en modulant leur activité catalytique, comme c'est le cas pour la sérine-thréonine kinase Akt et ses activateurs, PDKs (*phosphoinositide-dependent kinases*) [Rameh et coll., 1999 ; Leever et coll., 1999]. Ces kinases phosphorylent de nombreux substrats impliqués dans la prolifération cellulaire et la survie. D'autres cibles des produits lipidiques des PI3K sont les PKC atypiques telle que la PKCζ [Toker et Cantley, 1997].

En plus de leur activité lipide kinase, les sous unités catalytiques PI3K de cette classe possèdent une activité protéine kinase intrinsèque qui joue un rôle de régulateur de l'activité

lipide kinase [Hunter, 1995 ; Vanhaesebroeck et coll., 1999]. Cette activité protéine kinase peut, dans le cas de la p110 γ , activer la voie ERK1/2 en permettant la phosphorylation de MEK1/2. Cependant, le substrat protéique de p110 γ reste à découvrir [Bondeva et coll., 1998].

Les PI3K de classe I sont des hétérodimères contenant une sous unité catalytique de 110 kDa associée à une sous-unité régulatrice (p85 ou p101). Quatre isoformes de la sous-unité catalytique ont été caractérisées (p110 α , β , γ et δ) et divisées en deux sous-classes, I_A et I_B, en fonction du type de sous-unité régulatrice qui y est associée.

La classe I_A inclue p110 α , β et δ qui sont associées à une sous-unité régulatrice de type p85 contenant des domaines SH2 (*Src Homology 2*). Les hétérodimères p110/p85 sont ainsi activés en aval de tyrosine kinases lorsque les domaines SH2 de p85 s'associent à des motif YXXM phosphorylés trouvés au sein de récepteurs ou de protéines adaptatrices [Yart et coll., 2002]. Elles peuvent également être activées par Ras [Anderson et Jackson, 2003]. p110 α et β sont exprimées de manière ubiquitaire tandis que p110 δ est exprimée dans les leucocytes [Wetzker et Rommel, 2004].

La classe I_B ne possède qu'un seul représentant constitué de la sous-unité catalytique p110 γ associée à la sous-unité régulatrice p101 qui ne possède pas d'homologie connue avec d'autres protéines. p110 γ a la capacité unique au sein des PI3K d'être activée directement par les sous unités $\beta\gamma$ dérivées des protéines G hétérotrimériques, constituées d'une sous unité α et d'un hétérodimère $\beta\gamma$ (Tableau 4). Ces protéines sont typiquement activées par des RCPG (récepteurs couplés aux protéines G, Figure 18). De plus, la sensibilité de p110 γ aux $\beta\gamma$ semble dépendre de la présence de p101 [Stephens et coll., 1997]. Des résultats récents démontrent que les deux sous unités jouent des rôles distincts et complémentaires : p101 permet le recrutement membranaire par interaction avec $\beta\gamma$ puis p110 γ est activée suite à son interaction directe avec les mêmes sous-unités [Brock et coll., 2003]. A l'instar des PI3K de classe I_A, p110 γ peut également être activée par Ras [Suire et coll., 2002]. p110 γ est principalement exprimée dans les leucocytes, plaquettes et les cardiomyocytes [Wetzker et Rommel, 2004].

IV.2.3.2. La kinase B-Raf

B-Raf est exprimée sous la forme de nombreux variants d'épissage dont la taille varie entre 67 et 99 kDa, mais possède deux isoformes majeures de 68 et 95 kDa. Ceci est dû à

<i>Sous-unités</i>	<i>Cibles</i>
$G_{\alpha s}$ $G_{\alpha olf}$	Adénylyl Cyclase RGS-PX1 Canaux calciques c-Src
$G_{\alpha t}$ $G_{\alpha gust}$	Phosphodiesterase du GMPc Phosphodiesterase (amertume, douceur)
$G_{\alpha i1,2,3}$ $G_{\alpha 0}$ $G_{\alpha z}$	↓Adénylyl Cyclase, c-Src GAP1 de Rap1
$G_{\alpha q}, G_{\alpha 11}, G_{\alpha 14, 15, 16}$	Phospholipase C LARG (RhoGEF)
$G_{\alpha 12}, G_{\alpha 13}$	p115 Rho GEF, PDZ Rho GEF, LARG Rho GEF (activation de Rho, formation de fibres de stress) E-Cadhérine
$G_{\beta\gamma}$	GRKs Adénylyl Cyclases (ACII, ACIV) Phospholipases (PLC $\beta 1, \beta 2, \beta 3$) PI3K γ

Tableau 4 : Sous-unités des protéines G hétérotrimériques et quelques unes de leurs cibles. Chez les mammifères, 16 sous-unités α , 5 β et 14 γ ont été clônées. La variété des dimères $\beta\gamma$ pouvant être formés contribue à la grande diversité des protéines G et peut être un autre mécanisme de régulation de la spécificité d'un récepteur couplé à une telle protéine.

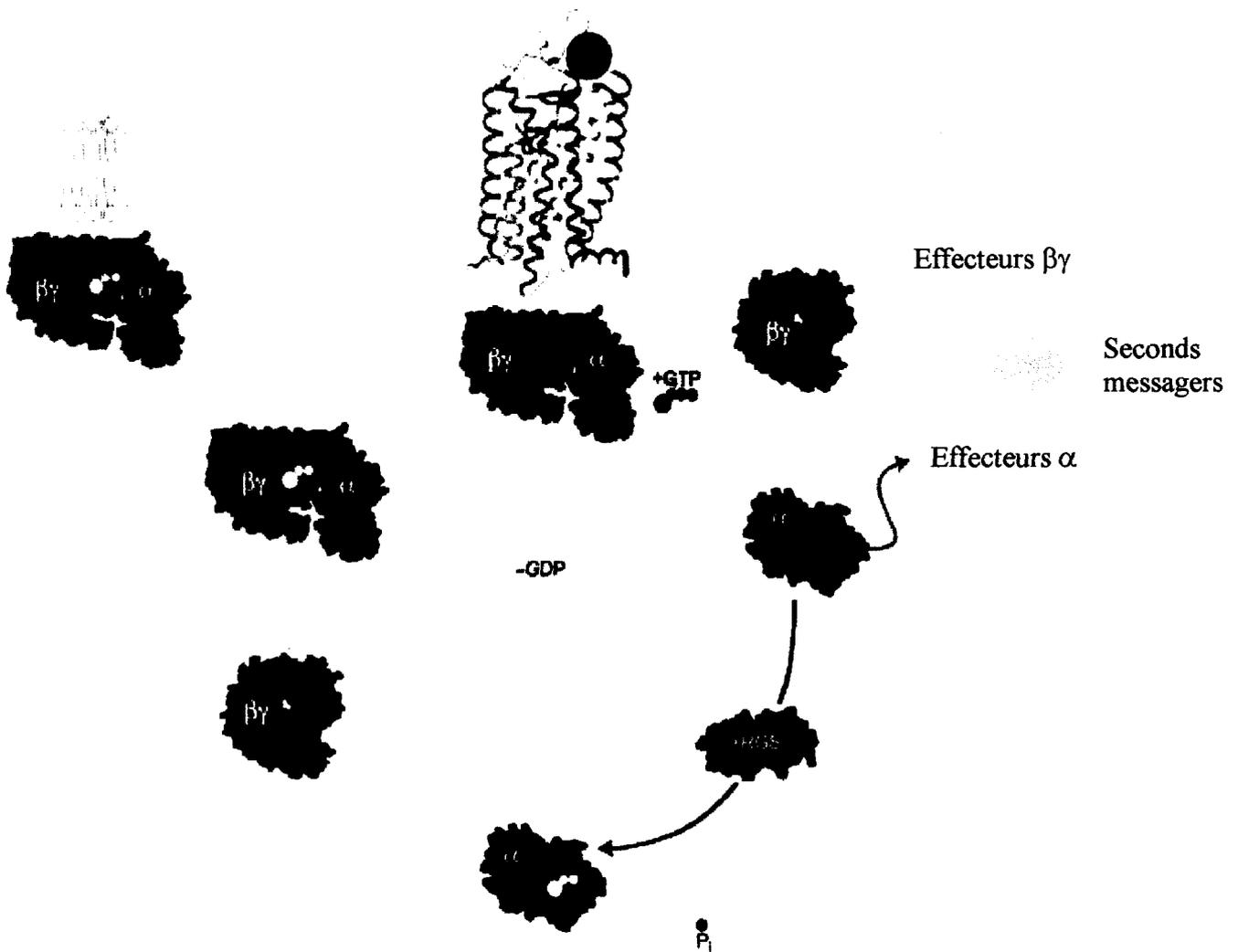


Figure 18 : Cycle d'activation et de désactivation des protéines G hétérotrimériques (d'après Preinerger et Hamm, 2004). Ces protéines sont des hétérotrimères composées d'une sous-unité α et d'un dimère $\beta\gamma$. L'hétérotrimère est associé à la membrane plasmique par le groupe isoprényle de γ et par les groupements lipidiques associés à α . Lorsque l'agoniste se fixe à son récepteur, il y a libération du GDP associé à la sous-unité α . Cette dernière lie alors du GTP résultant en un changement de conformation menant à la séparation de la sous-unité α du reste du complexe ($\beta\gamma$). α et $\beta\gamma$ modulent ensuite l'activité de leurs cibles spécifiques. Le signal est arrêté par hydrolyse du GTP en GDP, permettant à α et $\beta\gamma$ de se réassocier. L'activité GTPase de la sous-unité α est facilitée par les protéines RGS (Regulator of G protein Signaling).

l'épissage alternatif des exons 8b (portion de 36 pb entre les exons 8 et 9) et 10a (portion de 120 pb comprise entre les exons 9 et 10), mais aussi à la présence de deux domaines N-terminaux différents. Il n'est pas clair si la présence de ces deux domaines possibles est le fait de promoteurs différents, de divers sites d'initiation de la transcription ou d'un épissage alternatif. L'activité basale de B-Raf envers MEK1/2 est plus importante que celle de Raf-1 et B-Raf est l'activateur le plus puissant de la voie ERK parmi la famille Raf. Le mode d'activation de B-Raf est différent de celui de Raf-1 : à la position équivalente à Y341 de Raf-1, on trouve pour B-Raf un résidu d'acide aspartique (D448). En raison de la charge négative apportée, ce résidu peut mimer la phosphorylation sur Y341 et en conséquence, B-Raf ne nécessite pas de phosphorylation sur tyrosine pour être activé. B-Raf possède également une sérine équivalente à S338 (S445). Cependant, elle est constitutivement phosphorylée sur B-Raf. S445 et D448 contribuent à la haute activité basale de B-Raf [Mercer et Pritchard, 2003]. Néanmoins, il a été montré que l'activation de B-Raf nécessitait la phosphorylation de T598 et S601 [Zhang et Guan, 2000].

Tout comme Raf-1, B-Raf peut être activé par Ras. Cependant, et contrairement à Raf-1, il permet l'activation de la voie ERK1/2 par l'AMPc. Vossler et coll. [1997], ont montré que l'AMPc, second messenger produit par la cyclisation de l'ATP par un groupe d'enzymes nommées adénylyl cyclase activées principalement par la sous-unité α_s de la protéine G_s , peut activer la voie ERK1/2 dans les cellules qui expriment l'isoforme de 95 kDa. Au contraire, l'AMPc inhibe cette activation dans des fibroblastes NIH 3T3 ne la possédant pas. De plus, l'activation de l'isoforme de 68 kDa par l'AMPc a été observée dans des cellules CHO, démontrant que les deux isoformes majeures de B-Raf peuvent être activées par ce second messenger [Seidel et coll., 1999].

L'activation de B-Raf par l'AMPc peut faire intervenir deux mécanismes différents impliquant soit le récepteur de l'AMPc Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*, un facteur d'échange de nucléotides guanyliques), soit la protéine kinase activée par l'AMPc, nommée PKA [Houslay et Kolch, 2000]. Dans les deux cas, PKA et Epac induisent l'activation de la petite protéine G Rap-1. Cette protéine a été initialement identifiée comme étant un suppresseur de la transformation cellulaire par Ras, en raison du fait qu'elle peut séquestrer et inhiber Raf-1. Quand Rap-1 est activée, elle se lie à B-Raf et l'active (Figure 19).

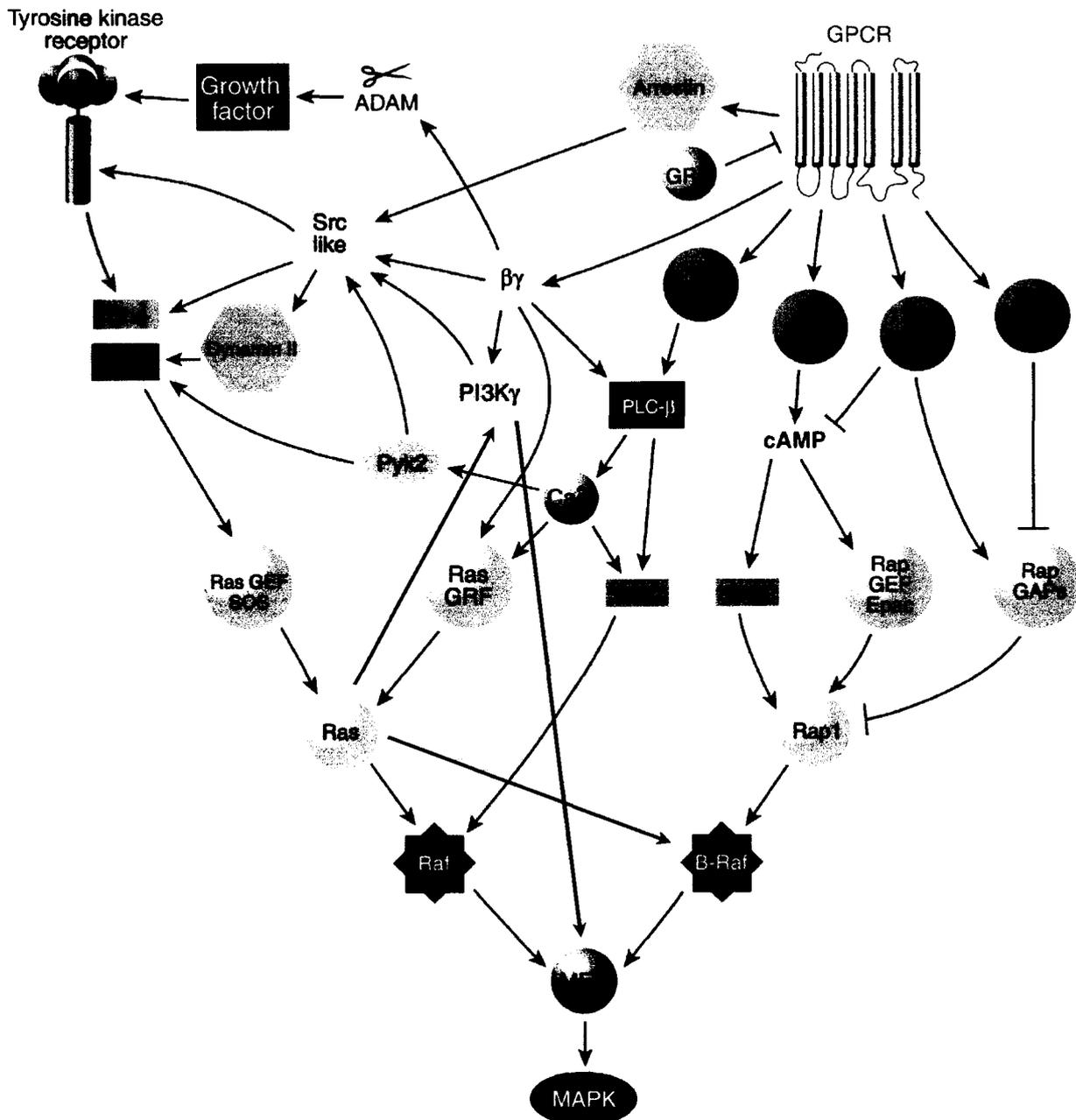


Figure 19 : Voies d'activations des MAPK ERK1/2 par Raf-1 et B-Raf illustrant les différents mécanismes d'activation de Raf-1 et B-Raf et la possibilité d'activer la voie ERK1/2 par les récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) activent typiquement la voie ERK1/2 par Ras : suite à leur autophosphorylation sur tyrosine, Shc peut s'associer par son domaine SH2 à une tyrosine phosphorylée. Grb2 s'associe à Shc et induit l'activation de SOS qui permet le remplacement du GDP lié à la forme inactive de Ras par du GTP, conduisant à son activation. La cascade Raf-1 / MEK1/2 / ERK1/2 est alors activée. B-Raf peut également être activé par Ras mais aussi par des récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques induisant une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. L'activation de PKA ou de Epac permet alors l'activation de B-Raf par Rap-1 (d'après Gudking, 2000).

IV.3. Les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines de la membrane plasmique résistants aux détergents de type Triton X-100 qui possèdent une composition lipidique et protéique particulière. Ils sont trouvés à la membrane plasmique de la plupart, sinon de toutes les cellules de mammifères. Une grande quantité de molécules impliquées dans la signalisation cellulaire est concentrée dans les radeaux lipidiques, qui se comportent comme des plateformes de signalisation [Paratcha et Ibanez, 2002].

Les radeaux lipidiques sont riches en cholestérol, en sphingolipides et en glycosphingolipides. On y trouve plus particulièrement des gangliosides, glycosphingolipides anioniques portant, en plus d'autres résidus de sucres, un ou plusieurs résidus d'acide sialique. Les cavéoles correspondent à des radeaux lipidiques contenant de la cavéoline et sont caractérisées morphologiquement par des invaginations observées à la surface cellulaire. La nomenclature de Simons et Toomre [2000] définit ainsi sous le terme générique de raft des assemblages dynamiques riches en cholestérol dispersés dans une phase fluide et désordonnée de la bicouche lipidique.

Le feuillet externe d'un raft est composé de cholestérol, de sphingolipides et de glycosphingolipides. La présence de chaînes carbonées saturées au sein de sphingolipides permet au cholestérol d'être étroitement intercalé au sein du feuillet.

Le feuillet interne est probablement riche en phospholipides possédant des acides gras saturés et en cholestérol, mais sa caractérisation est encore incomplète [Fridriksson et coll., 1999]. Le mode de couplage du feuillet interne et du feuillet externe n'est pas bien connu. Une possibilité serait que de longs acides gras saturés des sphingolipides du feuillet externe relient les deux feuillets par interdigitation. Des protéines transmembranaires pourraient également intervenir [Simons et Toomre, 2002].

La membrane trouvée autour des radeaux lipidiques est plus fluide car elle est principalement composée de phospholipides possédant des chaînes d'acides gras insaturés. Les radeaux lipidiques peuvent donc être décrits comme des phases liquides ordonnées au sein de la bicouche lipidique, dispersées dans une matrice liquide désordonnée de glycérolipides insaturés.

La distribution des radeaux lipidiques à la surface cellulaire dépend du type cellulaire. Dans les cellules épithéliales polarisées et les neurones, les radeaux lipidiques s'accumulent

respectivement à la membrane plasmique du pôle apical et axonal. Pour les lymphocytes et les fibroblastes, les radeaux lipidiques sont distribués sur la surface cellulaire sans polarité évidente. Bien que les radeaux lipidiques soient plus abondants à la membrane plasmique, ils sont également trouvés dans des vésicules de sécrétion et d'endocytose.

Le nombre de protéines dans chaque raft est probablement compris entre 10 et 30. Des clusters de 15 protéines identiques ont été observés dans le même raft [Varma et Mayor, 1998 ; Friedrichson et Kurzchiala, 1998] suggérant que certaines protéines ne sont pas distribuées de manière aléatoire dans les radeaux lipidiques mais plutôt regroupées au sein de radeaux lipidiques spécialisés. Ceci soulève la question importante de savoir s'il existe un ou plusieurs types de radeaux lipidiques à la surface d'une cellule.

IV.3.1. *Rôle des radeaux lipidiques en signalisation cellulaire*

Il existe des preuves de l'implication des radeaux lipidiques dans de nombreux processus cellulaires incluant l'internalisation de toxines, bactéries et virus [Parton et coll. 1994 ; Fivaz et coll., 1999 ; Shin et coll., 2000], le transport de cholestérol [Smart et coll., 1996], l'homéostasie du calcium [Isshiki et Anderson, 1999], et la signalisation cellulaire.

L'analyse biochimique de la composition protéique de radeaux lipidiques purifiés provenant d'un grand nombre de types cellulaires différents montre une concentration frappante en molécules impliquées dans la signalisation (Tableau 5). Suite à ces observations, de nombreuses études ont montré le rôle crucial des radeaux lipidiques dans la transduction du signal [Simons et Toomre, 2002].

Les radeaux lipidiques peuvent moduler la signalisation cellulaire par plusieurs mécanismes regroupés en deux modèles : (1) activation de la signalisation dans un raft isolé et (2) activation par clustering de radeaux lipidiques (Figure 20).

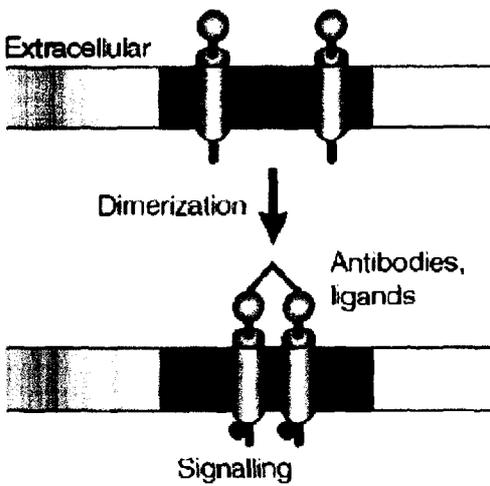
Dans le modèle 1a, le récepteur est un résident constitutif des radeaux lipidiques. La signalisation qu'il induit est donc initiée depuis ce site où sont localisés tous les composants spécifiques et nécessaires à la transduction du signal. La translocation du récepteur dans et hors du raft peut également être un moyen d'initier le signal (modèle 1b). De plus, la localisation différentielle des molécules de signalisation trouvées dans les radeaux lipidiques et celles trouvées en dehors de ces derniers peut contrôler l'accès des différentes molécules entre elles. Ainsi, une protéine activée par phosphorylation peut être séquestrée à l'intérieur d'un raft, empêchant ainsi son interaction avec une phosphatase pouvant la désactiver et se trouvant hors du raft. Il est à noter que le récepteur entier peut

Protéines/Lipides
<p>Récepteurs transmembranaires</p> <p>EGFR Récepteur B2 de la bradykinine Récepteurs de la famille Eph TCR BCR Fc RI Intégrines β1</p>
<p>Molécules de signalisation lipidique</p> <p>Sphingomyéline Céramide Phosphoinositides Diacylglycérol</p>
<p>Protéines liées au GPI</p> <p>CD59 uPAR EphrinA5</p>
<p>Effecteurs de signalisation</p> <p>Gα1, Gα2, Gα3 kinases de la famille Src Ras PKC Shc Adénylyl cyclase eNOS PLC PI3K SHIP</p>

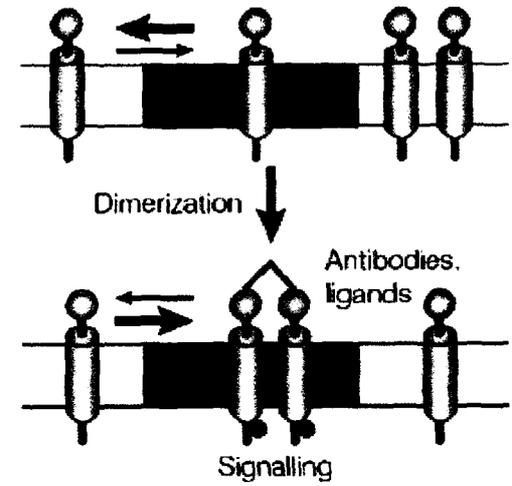
Tableau 5 : Protéines et lipides impliqués dans la signalisation cellulaire trouvés dans les radeaux lipidiques (d'après Zajchowski et Robbins, 2002).

A Modèle 1

a Activation dans un radeau lipidique



b Translocation dans un radeau lipidique



B Modèle 2

Le clustering des radeaux lipidiques induit la signalisation

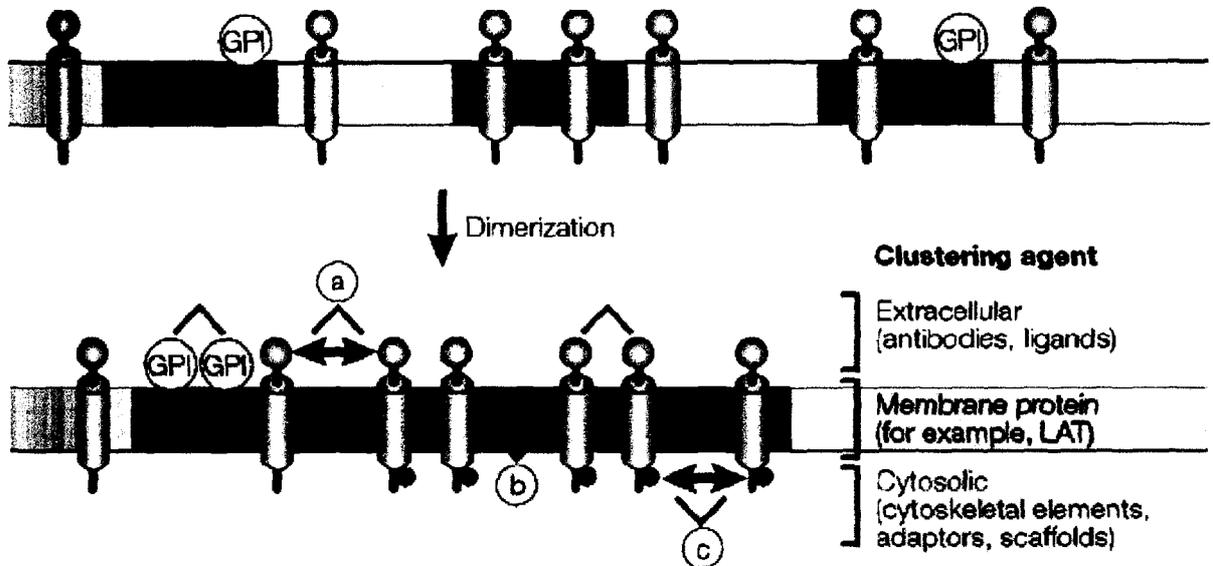


Figure 20 : Mécanismes d'induction de la signalisation cellulaire dans les radeaux lipidiques
(d'après Simons et Toomre, 2000).

également être transloqué à l'intérieur du raft. Le récepteur de type tyrosine kinase représenté sur le schéma n'est qu'un exemple et les différents modèles d'activation présentés peuvent être étendus à d'autres classes de récepteurs.

Le second modèle d'activation (modèle 2) implique le clustering des radeaux lipidiques. Différents types de radeaux lipidiques pourraient être présents à la membrane plasmique, et posséder des compositions protéiques distinctes (en orange, bleu et violet sur la figure 20). Le clustering des radeaux lipidiques entraînerait une nouvelle composition protéique au sein du raft créé (en rouge). Le clustering peut se réaliser par le biais de mécanismes extracellulaires, intramembranaires ou dans le cytosol (respectivement a, b et c sur la figure 20). Il peut également avoir lieu par le biais de protéines ancrées au GPI (glycosylphosphatidylinositol), soit en réponse primaire à la stimulation, soit en réponse co-stimulatoire.

Il est important de noter que les modèles 1 et 2 ne sont pas obligatoirement exclusifs : par exemple, un signal extracellulaire peut augmenter l'affinité d'une protéine pour un raft, induisant ainsi sa translocation dans ce dernier, où elle va être activée. Cette protéine peut alors recruter d'autres, telle que LAT (*Linker for Activation of T cells*), ce qui entraînerait le clustering de plusieurs radeaux lipidiques.

IV.3.2. Rôle des gangliosides en signalisation cellulaire

Les gangliosides sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie lipidique de type céramide reliée à une chaîne oligosaccharidique de longueur et de complexité variable. Ils font partie de la famille des glycosphingolipides et se distinguent par la présence d'un ou plusieurs résidus d'acide sialique (Figures 21 et 22).

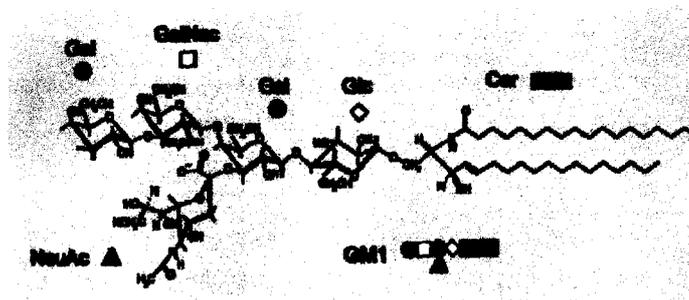


Figure 21 : Structure développée d'un ganglioside, le GM1.
(d'après Miljan et Bremer, 2002). Cer : céramide ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; NeuAc : acide N-acétylneuraminique.

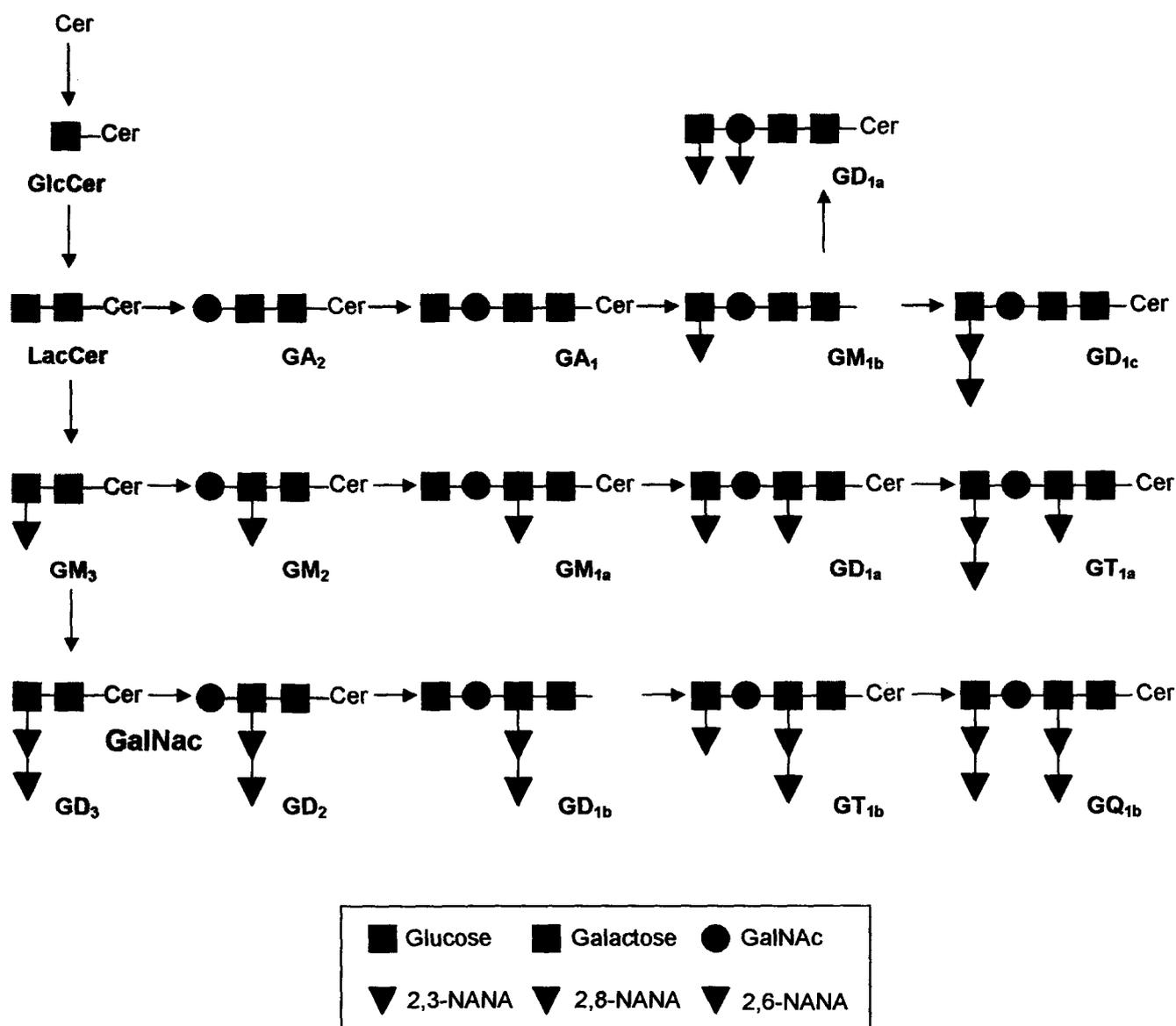


Figure 22 : Structures et voies de biosynthèse des gangliosides

(d'après Allende et Proia, 2002). Dans la nomenclature des gangliosides : G = ganglioside ; M = monosialo- ; D = disialo- ; T = trisialo-. GalNac : N-acétylgalactosamine ; NANA : acide N-acétylneuraminique (acide sialique).

Suite à leur biosynthèse dans l'appareil de Golgi, les gangliosides sont acheminés à la membrane plasmique et se retrouvent particulièrement dans les radeaux lipidiques [Allende et Proia, 2002]. Les gangliosides GM1 et GM3 sont d'ailleurs des marqueurs lipidiques de radeaux lipidiques [Zajchowski et Robbins, 2002]. Etant donné la proximité physique des gangliosides et des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire au sein des radeaux lipidiques, le rôle probable de ces glycosphingolipides dans la transduction du signal a été évoqué.

Les gangliosides modulent la signalisation cellulaire par deux modes différents : la modulation de l'activation de RTK et l'enrichissement membranaire en gangliosides.

Le premier mécanisme, le plus étudié et le mieux compris, implique la modulation de l'activation de divers récepteurs de type RTK incluant le récepteur de l'EGF (REGF), le récepteur de FGF (RFGF) ou encore le récepteur du PDGF (RPDGF) [Miljan et Bremer, 2002]. La modulation de l'activité du REGF par le GM3 a été mise en évidence (Figure 23). L'inhibition de ce récepteur par ce ganglioside est dû au blocage de sa dimérisation, phénomène essentiel pour son activation [Bremer, 1994]. Il est tout de même important de noter que la déplétion de GM3 n'induit pas une activation spontanée du récepteur [Meuillet et coll., 1999 ; Meuillet et coll., 2000].

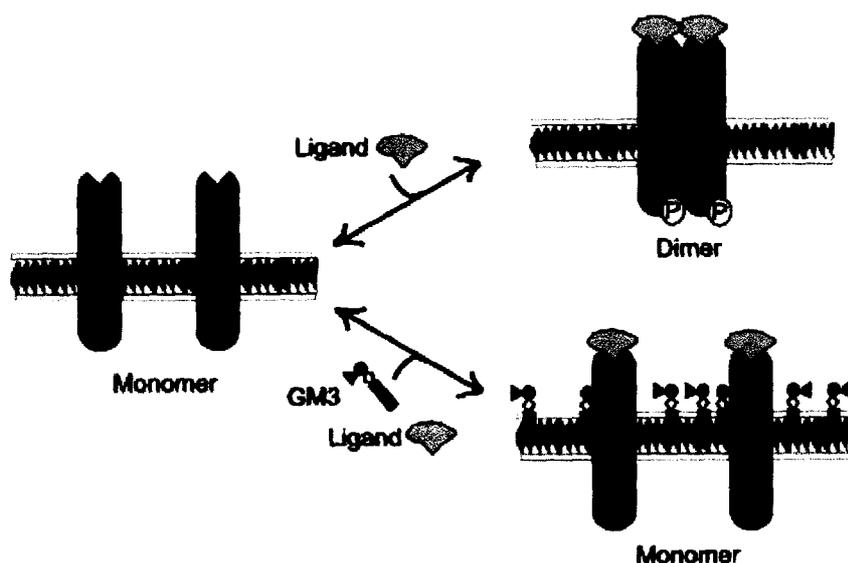


Figure 23 : Mécanisme de l'inhibition du REGF par le GM3. La liaison du GM3 au REGF stabilise l'état monomérique du récepteur et empêche sa dimérisation. En absence de GM3 et suite à la liaison de l'EGF à son récepteur, ce dernier peut se dimériser, s'autophosphoryler, et transduire son signal (d'après Miljan et Bremer, 2002).

Un tel type de régulation est également observé pour le RPDGF. Dans ce cas, c'est le GM1 qui est plus particulièrement impliqué bien que GM2, GD1a, GD1b, GD3 et GT1b puissent également inhiber sa dimérisation [Van Brocklyn et coll., 1993].

Dans le cas du RFGF, la modulation de son activité par le GM1 met en jeu un mécanisme différent (Figure 24).

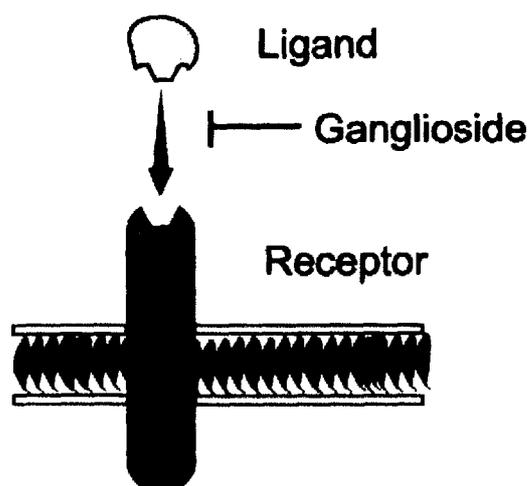


Figure 24 : Mécanisme d'inhibition du récepteur du FGF par le GM1 (d'après Miljan et Bremer, 2002). L'inhibition semble être due à l'interaction directe entre le GM1 et le FGF, empêchant ainsi son interaction avec son récepteur [Rusnati et coll., 1999].

L'enrichissement membranaire par addition de gangliosides exogènes permet également de moduler la signalisation cellulaire. Kim et coll. [2002] ont montré que l'ajout d'un mélange de gangliosides à des microglia de rat et à des cellules microgliales BV2 de souris active JAK1 et JAK2, induit la phosphorylation de STAT1 et STAT3, et active ERK1/2 ainsi que p38. Cela conduit à l'augmentation d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation tels que la NO synthase, ICAM-1 et MCP-1.

Par ailleurs, l'addition de GD1a à des fibroblastes dermiques humains permet d'activer Src, Ras et ERK1/2 [Li et coll., 2002].

Le GD3, à faible concentration, permet la synthèse d'ions superoxyde par activation des NADPH et NADH oxydase, active ERK1 et induit la prolifération de cellules musculaires lisses d'aorte humaine. A haute concentration, il conduit à la production d'oxyde nitrique

(NO) qui, réagissant avec les ions superoxide, crée des radicaux peroxynitrite qui induisent l'apoptose de ces cellules [Bhunia et coll., 2002].

Le lactosylcéramide, précurseur du GM3 lors de sa biosynthèse et produit de sa désialylation, est également trouvé dans les radeaux lipidiques [Iwabuchi et Nagaoka, 2002]. Il induit la prolifération des cellules musculaires lisses d'aorte humaine en stimulant l'activation de la voie Ras / Raf-1 / MEK1/2 / ERK1/2 lorsqu'il est ajouté à de telles cellules en culture [Bhunia et coll., 1996 et 1997]. Le rôle de second messager de ce glycosphingolipide a été mis en évidence par la stimulation de cellules endothéliales avec du TNF α . Cette cytokine induit la synthèse de lactosylcéramide qui, en retour, permet l'expression de ICAM-1 et de NF- κ B en activant la NADPH oxydase [Bhunia et coll., 1998 ; Chatterjee, 1998]. Très récemment, il a été montré que le lactosylcéramide induit l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales par l'activation des PKC α et ϵ et de la PLA2 [Gong et coll., 2004].

Cependant, les mécanismes par lesquels tous ces glycosphingolipides, présents dans le feuillet externe de la membrane plasmique, activent leurs cibles intracellulaires, restent encore mal connus.

But du travail

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Biochimie de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims, appartenant à l'UMR CNRS 6198 "Matrice Extracellulaire et Régulation Cellulaire". La thématique développée dans l'Unité est l'étude des interactions Matrice Extracellulaire-Cellules dans les conditions physiopathologiques. Une des équipes du Laboratoire de Biochimie étudie le rôle des peptides d'élastine dans la progression tumorale, et plus particulièrement les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine régulant l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques humains.

L'élastine est une protéine de la matrice extracellulaire responsable de l'élasticité des tissus. Cependant, la dégradation de ce polymère durant des processus physiopathologiques tels que le cancer génère des peptides bioactifs. Des études antérieures réalisées au sein de l'Unité [Brassart et coll., 2001] ont montré que ces peptides, et particulièrement la kE, induisent l'expression de MMP-1 par les fibroblastes dermiques humains. La production de cette métalloprotéinase matricielle par les fibroblastes est un phénomène fondamentalement impliqué dans le développement tumoral [Noël et coll, 1994 ; Murray et coll, 1996 ; Inoue et coll, 1999 ; Ito et coll ; 1999].

Les voies de signalisation induites par le récepteur de l'élastine ont été très peu étudiées et sont par conséquent très mal connues. Compte tenu du rôle important de ce récepteur dans la dégradation matricielle pathologique, la connaissance de sa transduction du signal permettrait d'apporter des renseignements importants dans la conception de stratégies thérapeutiques visant à limiter la participation de la dégradation de l'élastine à la progression tumorale.

Le but de notre travail est d'identifier les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine régulant la production de pro-MMP-1, et de comprendre comment ce système récepteur particulier transmet son signal depuis la face extracellulaire de la membrane plasmique jusqu'à ses effecteurs.

Matériels et Méthodes

I. Modèle cellulaire utilisé

Dans notre étude, nous avons utilisé des fibroblastes dermiques humains (FDH).

D'une manière générale, le fibroblaste, cellule différenciée d'origine mésenchymateuse, présente de longs prolongements cytoplasmiques. Sa richesse en organites cytoplasmiques témoigne de sa grande activité métabolique. Les fibroblastes s'apparentent à des cellules de type inflammatoire par leur capacité à migrer, proliférer, à s'attacher, à modifier leur phénotype, à synthétiser et à dégrader les molécules du tissu conjonctif, et à maintenir l'intégrité tissulaire. Toutes ces propriétés dépendent de l'environnement du fibroblaste, matriciel et cellulaire, et permettent d'influencer les populations cellulaires partageant leur territoire, principalement grâce aux cytokines.

Les fibroblastes prédominent dans les tissus conjonctifs, synthétisent les éléments de la MEC incluant la tropoélastine, les collagènes de type I et III, des protéoglycannes, la thrombospondine, la fibronectine, etc... : cette matrice leur permet de maintenir leur caractère différencié. Ils synthétisent également les protéases intervenant dans le catabolisme et le renouvellement des constituants matriciels dont de nombreuses MMPs.

Les fibroblastes se distinguent de beaucoup de types cellulaires par leur capacité à conserver sa morphologie leur culture. A confluence, le phénomène d'inhibition de contact contraint les fibroblastes en culture à limiter leur prolifération et à constituer une monocouche cellulaire, caractéristique des fibroblastes normaux [Adolphe et Barlovatz-Meimon, 1988].

Les fibroblastes sont des cellules essentielles dans le développement de la réaction stromale associée au cancer. Les interactions cellules tumorales – fibroblastes sont cruciales durant les processus d'invasion tumorale, ces cellules stromales étant les principales responsables de la production de MMPs, indispensables au développement de la tumeur [Bissel et Radisky, 2001 ; Noël et coll., 1994]. En particulier, ils synthétisent la MMP-1, principale protéase exprimée par les fibroblastes capable de dégrader les collagènes fibrillaires dont les collagènes I, II et III et dont la présence est associée à un mauvais pronostic [Murray et coll, 1996 ;Inoue et coll, 1999 ; Ito et coll ; 1999].

II. Préparation de la kappa-élastine (κ E)

L'élastine fibreuse insoluble extraite du ligament de la nuque de bœuf peut être solubilisée par la potasse en milieu éthanolique ; cette méthode d'hydrolyse génère des peptides d'élastine solubles en milieu aqueux appelés kappa-élastine (κ E).

Le ligament (1 g) est mis en solution dans 100 mL d'un mélange éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1M. Le mélange est agité pendant 1 h à 37°C. Cette température favorise la solubilisation de l'élastine. Le surnageant est récupéré par centrifugation (10 min / 12500 g / 4°C). Le culot d'élastine fibreuse non hydrolysée est soumis à un nouveau cycle d'hydrolyse organo-alcaline avec une nouvelle solution éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1M. Toutes les heures, le surnageant obtenu est neutralisé par de l'acide perchlorique puis décanté pendant la nuit à 4°C. Après centrifugation, les sels de perchlorate formés qui ont sédimenté au fond du tube sont éliminés. Le surnageant contenant la κ E est dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Les peptides ainsi générés présentent une grande hétérogénéité de masse moléculaire. Ils sont fractionnés en fonction de leur masse moléculaire par chromatographie d'exclusion-diffusion (gel de Séphadex G-100). La fraction homogène majoritaire de masse moléculaire de 75 kDa a été retenue pour nos différentes expérimentations.

III. Culture Cellulaire

III.1. Obtention de fibroblastes dermiques à partir d'explants de peau

Tous les réactifs utilisés pour la culture cellulaire, sauf notification, proviennent de Gibco BRL, distribué par Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

Les fibroblastes sont isolés à partir de biopsies de peau de patients sains âgés de 17 à 49 ans, après obtention de leur consentement. Les explants de peau sont placés dans du PBS stérile, et débarrassés de leur couche adipeuse avant d'être réduits en petits fragments. Les morceaux de peau obtenus sont ensuite placés dans une flasque de culture de 75 cm² et sont recouverts de milieu de culture composé de milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle*

Medium) contenant du Glutamax® comme source de glutamine supplémenté de 20% de sérum de veau fœtal (SVF, acheté chez PAN-Biotech-GmbH, distribué par Dutscher, Brumath, France) et de 200 UI/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Les cultures sont maintenues sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est changé deux fois par semaine. Au bout de 4 semaines environ, les premières cellules sortent des explants et arrivent rapidement à confluence. Les cellules sont alors trypsinisées pour être réensemencées.

III.2. Obtention de sous-culture par trypsinisation

Quand les cellules atteignent un état de confluence, elles subissent "un passage". Elles sont rincées dans du PBS (phosphate ; 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl pH 7,4 ; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) puis détachées de la flasque de culture par incubation pendant 5 min à 37°C en présence de trypsine (0,05 % p/v). Pour stopper l'action de la trypsine, du milieu DMEM à 10 % de SVF est ajouté. Les cellules sont centrifugées à 375 g pendant 10 min puis diluées dans du DMEM contenant 10 % de SVF et les antibiotiques précédemment cités.

Après numération des cellules grâce à une cellule de Thomas, le nombre de cellules désiré est ensemencé dans les flasques ou plaques de cultures adéquates. Les FDH utilisés dans les différentes expériences sont issus à des passages compris entre le 3^{ème} et le 10^{ème}. Toutes les cultures cellulaires sont effectuées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

Dans le cas des flasques d'entretien, le milieu est changé deux fois par semaine.

III.3. Mise au repos des cellules

La mise au repos correspond à une privation en facteurs de croissance permettant d'une part d'éteindre les voies de signalisation induites par ces derniers et d'autre part de synchroniser les cellules au même stade du cycle cellulaire, afin que celles-ci répondent de manière coordonnée à une stimulation par un agoniste.

Les FDH, cultivés dans les conditions précédemment décrites et ayant atteint un taux de confluence d'environ 90 %, sont lavés deux fois avec du PBS stérile (pH 7,4) thermostaté à 37°C afin d'éliminer le SVF résiduel. Les cellules sont ensuite mises en présence de DMEM comprenant 0,5 % de SVF, pendant 18 h à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

III.4. Stimulation des cellules

Après la mise au repos, les cellules sont lavées une fois avec du PBS stérile (pH 7,4) thermostaté à 37°C. Dans le cas de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, ces derniers sont incubés de 1h à 3h en fonction de l'inhibiteur dans du milieu DMEM avant de stimuler les cellules. Dans les expériences réalisées avec la toxine pertussique (PTX, Sigma) l'incubation a lieu pendant la mise au repos. Les FDH sont ensuite stimulés pendant différents temps avec 50 µg/mL de kappa-élastine (κE). La réaction est stoppée par ajout de PBS glacé contenant 50 µM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄), un inhibiteur de protéine tyrosylphosphatase [Gordon, 1991].

IV. Transfection des fibroblastes dermiques humains

IV.1. Plasmides utilisés

IV.1.1. *pEGFP-C1*

Ce plasmide (Clontech, distribué par Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) permet l'expression du mutant GFPmut1 [Cormack et coll., 1996] de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) qui a été optimisé pour une fluorescence plus intense et un niveau d'expression plus important dans les cellules de mammifères (maximum d'excitation = 488 nm; maximum d'émission = 507 nm.). Après transfection, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse TE300 utilisant un filtre B2 possédant une bande passante de longueurs d'onde d'excitation comprises entre 450 et 490 nm. Les cellules apparaissant en vert ont effectivement été transfectées avec ce vecteur et l'efficacité de la transfection est établie en déterminant le pourcentage de cellules GFP-positives.

IV.1.2. *pRK5-βARK1-CT*

Cette construction comprend le plasmide pRK5 codant pour le fragment G495-L689 correspondant à la partie C-terminale de la *β-adrenergic receptor kinase 1* (βARK1). Ce fragment agit comme un "scavenger" de sous-unités βγ dérivées de protéines G hétérotrimériques [Koch et coll., 1994]. En effet, lors de l'activation d'une telle protéine, les sous-unités βγ se désolidarisent de α. Une de leur cible est βARK1, qui une fois activée, joue un rôle dans l'arrêt du signal du récepteur qui a activé la protéine G.

pRK5-βARK1-CT exprimant le domaine d'interaction βγ-βARK1, permet ainsi de détourner βγ de ses cibles physiologiques et de déterminer sa participation dans un processus biologique. pRK5-βARK1-CT nous a été gracieusement fourni par le Dr. R.J. Lefkowitz (Durham, USA).

IV.1.3. *pECE-HA-ERK1*

Cette construction permet l'expression de ERK1 fusionnée à un tag hémagglutinine (HA). La protéine de fusion ERK1-HA est insérée au niveau des sites Hind III et Eco R1 du vecteur pECE.

Ce vecteur est un don du Dr. F. Schweighoffer (Chatenay-Malabry, France).

IV.1.4. *pSV₂-RasN17*

Ce vecteur exprime un dominant négatif de Ras contenant une mutation de la sérine en position 17 en asparagine. Ce mutant bloque la signalisation dépendante de Ras en inhibant l'action des Ras-GEFs (*Ras-guanine nucleotide exchange factors*) essentiels pour l'action de la petite protéine G. Cette forme inactive de Ras est insérée dans le plasmide pSV₂ au niveau des sites HindIII et Kpm1. pSV₂-RasN17 nous a été gracieusement donné par le Dr. J. Pouyssegur (Nice, France).

IV.1.5. *pDC516*

Ce plasmide, de taille comparable à celle des différents vecteurs décrits ci-dessus, correspond au vecteur vide utilisé comme contrôle dans les différentes expériences de transfection.

IV.2. Transfection transitoire de fibroblastes dermiques humains

La technique utilisée est celle de lipofection. Celle-ci a été optimisée pour les FDH et s'est révélée efficace. Le réactif utilisé est la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). La lipofectamine est une émulsion lipidique polycationique associée à des lipides neutres. Ces derniers vont former des liposomes unilamellaires en milieu aqueux dont la surface est chargée positivement. Les constructions d'ADN présentes vont s'associer à la surface de ces structures par des liaisons de type électrostatique et pourront ainsi être internalisées lors de la fusion des liposomes avec la membrane plasmique.

La formation des complexes ADN-lipofectamine se déroule de la manière suivante : dans le cas de transfection en plaques 6 puits ($5 \cdot 10^5$ cellules / puits), 100 μ L de DMEM sont ajoutés à 2 μ L de lipofectamine™ 2000 et le même volume de DMEM est ajouté à 2 μ g d'ADN total (667 ng de pSV₂-RasN17 + 667 ng de pECE-HA-ERK1 + 667 ng de pEGFP-C1 ou dans les contrôles, 667 ng de pDC516 + 667 ng de pECE-HA-ERK1 + 667 ng de pEGFP-C1). Après incubation pendant 40 min à température ambiante, les tubes ADN et lipofectamine sont mélangés ensemble. Après 15 min d'incubation, les complexes ADN-lipofectamine formés sont ajoutés à 800 μ L de DMEM et placés sur les cellules à un taux de confluence d'environ 90 % pendant 16 h. Le milieu de transfection est éliminé et remplacé par du milieu DMEM contenant 10 % de SVF pendant 24 h. Les cellules sont ensuite mises au repos et stimulées comme décrit précédemment.

Dans le cas de transfection en flasque 150 cm² (environ $7 \cdot 10^6$ de cellules à 90 % de confluence), 40 μ L de lipofectamine sont ajoutés à 1,6 mL de DMEM et parallèlement, 40 μ g d'ADN (27 μ g de pRK5- β ARK1-CT ou de pDC516 + 13 μ g de pEGFP-C1) sont dilués dans le même volume de DMEM. La formation des complexes ADN-lipofectamine est réalisée de la manière décrite ci-dessus, puis les complexes sont dilués dans 16,8 mL de DMEM et placés

au contact des cellules. Les conditions de transfection sont identiques à celle décrites précédemment.

V. Méthodes d'analyse des protéines

V.1. Obtention d'extraits cellulaires

Après arrêt de la stimulation par ajout de PBS glacé contenant 50 μM de Na_3VO_4 , les cellules (1.10^6) sont lavées une fois dans le même tampon et sont décollées de leur support par grattage dans du tampon de lyse (PBS pH 7,4 ; 0,5 % (v/v) Triton X-100 ; 80 mM β -glycérophosphate ; 50 mM EGTA ; 15 mM MgCl_2 ; 1 mM Na_3VO_4 et un mélange d'inhibiteurs de protéases dilué au 1/1000^{ème} provenant de chez Sigma (réf. P8340)). Les FDH sont ensuite soumis à sonication trois fois 10 ss dans ce tampon et placés à 4°C pendant 20 min. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation 20 000 g / 30 min / 4°C. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube neuf.

V.2. Western-blot (immunodétection des protéines)

Les extraits cellulaires sont soumis à un dosage de protéines [kit de dosage Pierce (distribué par Interchim, Montluçon, France) basé sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique, ou BCA]. Une quantité égale de protéines est diluée dans du tampon échantillon 5X [0,5 M Tris/HCl pH 6,8 ; 0,5 % Bleu de Bromophénol (p/v) ; 10 % SDS (p/v) ; 20 % saccharose (p/v) ; 25 % β -mercaptoéthanol (v/v)]. Dans le cas de l'analyse de la production de pro-MMP-1 et de sa sécrétion, les milieux de culture contenant cette MMP sont tout d'abord concentrés sur membrane Microcon YM10 (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) avant d'être analysés par Western-Blot.

Les échantillons protéiques sont ensuite chauffés 5 min à 100°C et analysés par SDS-PAGE. La migration s'effectue une nuit sous une tension constante de 50V dans un tampon de migration [25 mM Tris pH 8,3 ; 192 mM glycine ; 0,1% de SDS (p/v)]. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert Bio-Rad (Marne la Vallée, France). Le transfert est effectué dans un tampon de transfert [20 mM

Tris ; 150 mM glycine ; 20 % méthanol (v/v)] pendant 1h30, sous une tension constante de 70 V et à 4°C. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration pendant 5 min de la membrane avec une solution de rouge ponceau S 0,2% (p/v) dans de l'acide trichloroactétique 3 % (p/v) dilué dans de l'eau distillée, permettant de visualiser les protéines. La membrane est ensuite saturée pendant 1 h à température ambiante dans une solution de blocage composée de 5 % (p/v) de lait non gras dilué dans du TBST [50 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 0.1 % Tween 20 (v/v)]. Les anticorps primaires sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation dans la solution de blocage à la concentration optimale d'utilisation de l'anticorps.

Le lendemain, après 5 lavages de 5 min au TBST, la membrane est incubée une heure à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase adapté à l'anticorps primaire (Tableau 6) dilué dans du lait à 5 % (p/v) avec du TBST. Après 5 lavages de 5 min au TBST suivis de 2 lavages de 10 min au TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM de NaCl), les protéines sont révélées par chimiluminescence (kit ECL, Amersham Biosciences, Saclay, France).

Lorsque cela est nécessaire, les anticorps sont découplés de la membrane par incubation à 55°C pendant 30 min dans une solution composée de 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7 ; 2 % SDS (p/v) et 100 mM β -mercaptoéthanol. Cinq lavages de 1h avec du TBST contenant 0,02 % NaN_3 (p/v) permettent d'éliminer le β -mercaptoéthanol. La membrane est ensuite saturée avec la solution de blocage et incubée avec les anticorps selon le protocole décrit précédemment.

Tableau 6 : Anticorps utilisés en western-blot (WB) et immunoprécipitation (IP)

<i>Anticorps</i>	<i>Caractéristiques</i>
Anti-MMP-1 (WB)	Anticorps polyclonal de mouton Ab-3 reconnaissant les formes pro- et active de la MMP-1 humaine (Oncogene réf. PC311, distribué par VWR Int., Strasbourg, France).
Anti-phospho ERK1/2 (T202/Y204) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique phospho T202/Y204 correspondant aux résidus trouvés à proximité de T202/Y204 de ERK1/2 humaines (Cell Signaling réf. 9101, distribué par Ozyme). Détecte les formes actives de ERK1 et ERK2.
Anti-phospho p38 (T180/Y182) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique phospho T180/Y182 correspondant aux résidus trouvés à proximité de T180/Y182 de p38 humaine (Cell Signaling, réf. 9211). Détecte les formes actives de p38.
Anti-phospho JNK1/2 (T183/Y185) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique phospho T183/Y185 correspondant aux résidus trouvés à proximité de T183/Y185 de JNK1/2 humaine (Cell Signaling, réf. 9251). Détecte les formes actives de JNK1/2.
Anti-phospho MEK1/2 (S217/S221) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin reconnaissant MEK1/2 phosphorylé sur S217/S221 (Cell Signaling, réf. 9121). Détecte les formes actives de MEK1/2.

Anti-phospho Raf-1 (S338) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un phospho-peptide synthétique sur correspondant aux résidus trouvés à proximité de S338 de Raf-1 humaine (Cell Signaling, réf. 9121).
Anti-ERK1/2 (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique dérivé de la séquence de ERK2 de rat. Détecte les formes totales de ERK1/2 (Cell Signaling, réf. 9102)..
Anti-p85 (IP)	Anticorps polyclonal produit au laboratoire par immunisation d'un lapin avec les protéines recombinantes correspondantes aux domaines SH2 N- et C- terminaux de la sous-unité p85 de la PI 3-kinase fusionnée à une GST.
Anti-p110 γ (WB et IP)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 331-530 de la p110 γ humaine (Santa-Cruz Biotechnology, réf. sc-7177).
Anti-B-Raf (WB et IP)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant aux 19 derniers acides aminés de B-Raf humaine (Santa-Cruz Biotechnology, réf. sc-166, distribué par Tebu, Le Perray en Yvelines, France).
Anti-Raf-1 (IP)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant aux 12 derniers acides aminés de Raf-1 humaine (Santa-Cruz Biotechnology, réf. sc-166).

Anti- β -actine (WB)	Anticorps monoclonal dérivé de l'hybridome AC15 produit par la fusion de cellules de myélomes murines avec des splénocytes d'une souris immunisée avec un peptide trouvé en position N-terminale de la β -actine (Sigma, réf. A5441).
Anti-HA (IP)	Anticorps monoclonal dérivé de l'hybridome 12CA5 produit par la fusion de cellules de myélomes murines avec des splénocytes d'une souris immunisée avec un peptide YPDYVPDYA dérivé de la protéine hémagglutinine du virus Influenza humain. (Molecular Biochemicals réf. 1 666 606, Meylan, France).
Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (WB)	Anticorps secondaire permettant la détection en ECL (Cell Signaling, réf. 7074).
Anti-IgG de mouton couplé à la peroxydase (WB)	Anticorps secondaire permettant la détection en ECL (Sigma, réf. A3415).
Anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (WB)	Anticorps secondaire permettant la détection en ECL (Amersham Biosciences réf. NA931).

V.3. Immunoprécipitation

Après stimulation et arrêt de la réaction, les cellules sont lavées une fois avec du PBS glacé contenant 50 μM Na_3VO_4 , récupérées par grattage dans le même tampon puis centrifugées 375 g / 10 min / 4°C. Les cellules sont alors lysées pendant 15 min à 4°C avec 250 μL de tampon de lyse 1 % [(1 % (v/v) Brij98 (Sigma) ; 10 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 10 % glycérol (v/v)] contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases précédemment cité et 1 mM Na_3VO_4 . Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation (20000 g / 20 min / 4°C). Les concentrations protéiques des surnageants sont déterminées à l'aide du kit BCA, et une même quantité de protéine est incubée avec une quantité adéquate d'anticorps spécifiques pendant 1 heure à 4°C. Les complexes antigène-anticorps ainsi formés sont précipités par incubation avec 40 μL de protéine G couplées à des billes de sépharose pendant une heure sous agitation rotative. Les complexes protéine G-antigène-anticorps sont alors lavés une fois avec du tampon de lyse 1 %, puis trois fois avec du tampon de lyse 0,1 % (0,1 % (v/v) Brij98 ; 10 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 10 % (v/v) glycérol ; 1 mM Na_3VO_4). L'utilisation de Brij98, détergent ionique doux, permet de conserver les liaisons inter-moléculaires, et ainsi de co-immunoprécipiter les protéines liées à la protéine cible de l'anticorps utilisé. Les protéines immunoprécipitées sont solubilisées dans du tampon échantillon 5X puis portées à ébullition 5 min. Après centrifugation (10000 g, 1 min, 4°C), les protéines décrochées des billes sont conservées à -80°C avant analyse.

V.4. Test d'activité PI3K

Les cellules (8.10^6) sont traitées comme décrit précédemment (voir paragraphe V. 3. *Immunoprécipitation*) et une quantité égale de protéines est incubée avec 10 μL d'anticorps anti-p85 préparés dans notre laboratoire ou 2,5 μg d'anti-p110 γ . Dans le cas de la mesure d'activité p110 γ , les cellules ont été préalablement transfectées avec pRK5- β ARK1-CT comme décrit dans le paragraphe IV.2. *Transfection transitoire de fibroblastes dermiques humains*. Les complexes protéine G-antigène-anticorps sont alors lavés une fois avec du tampon de lyse 1 %, deux fois avec du tampon de lyse 0,1 % [(0,1 % Brij98 (v/v), 10 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 10 % (v/v) glycérol, 1 mM Na_3VO_4)] et enfin deux fois avec du tampon d'activité PI 3-kinase (100 mM NaCl ; 50 mM MgCl_2 ;

25 mM Hépes ; 200 μ M adénosine ; pH 7,4). Un volume d'une solution de phosphatidylinositol (PI) (10 mg/ml) est mélangé avec un volume de solution de PS (10 mg/ml) puis sont évaporés sous N_2 . 500 μ L d'une solution d'ATP (2,5 μ M) préparée extemporanément dans le tampon PI 3-kinase sont ensuite ajoutés au mélange PI et PS évaporé. Ce mélange est ensuite soumis à sonication trois fois 10 secondes dans la glace afin de former des micelles PI-PS. Sur le culot de complexes protéine G-antigène-anticorps, 70 μ L de solution de micelles additionné de 10 μ Ci ATP[γ - 32 P] (Amersham Biosciences, Saclay, France) sont ajoutés et incubés pendant 15 min à 30°C. La réaction est arrêtée par ajout de 100 μ L HCl 1N et de 350 μ L $CHCl_3/CH_3OH$ (1/1, v/v). Les échantillons sont ensuite mélangés et centrifugés (2 min, 1000 g). Après élimination de la phase supérieure, la phase inférieure chloroformique contenant les phospholipides est lavée deux fois avec 200 μ L CH_3OH/HCl 1N (1/1, v/v), prélevée (110 μ L), puis évaporée sous azote. Les phospholipides sont dilués dans 30 μ L de mélange $CHCl_3/CH_3OH$ (95/5, v/v) et déposés à l'aide d'une seringue Hamilton sur une plaque de silice pré-activée par pulvérisation avec de l'oxalate de potassium 2 % (v/v) et incubation 45 min à 120°C. La migration est réalisée dans le solvant $CHCl_3/CH_3OH/C_3H_6O/CH_3COOH/H_2O$ (40/13/15/12/7, v/v/v/v/v). Les phospholipides sont tout d'abord révélés par saturation des doubles liaisons avec l'iode, et le PIP radioactif est révélé par autoradiographie.

V.5. Test d'activité protéine kinase (Raf-1 et B-Raf)

La préparation des échantillons et les immunoprécipitations sont réalisées comme décrit dans le paragraphe V.3. *Immunoprécipitation*. Des quantités égales de protéines sont soumises à une immunoprécipitation avec 2,5 μ g d'anti-Raf-1 ou d'anti-B-Raf. Les complexes protéine G-Anticorps sont lavés une fois avec du tampon de lyse 1%, deux fois avec du tampon de lyse 0,1%, puis deux fois avec du tampon d'activité Raf-1 et B-Raf (20 mM Hepes pH 7,2 ; 10 mM de $MgCl_2$; 10 mM de $MnCl_2$). Pour la réaction kinase, les culots de complexes protéine G-anticorps sont resuspendus dans 50 μ L de tampon de réaction contenant 10 μ Ci ATP[γ - 32 P], 2,5 μ M d'ATP et 1 μ g de MEK1 (Santa-Cruz Biotechnology, réf. Sc-4025). La réaction est réalisée pendant 30 min à 30°C puis stoppée par ajout de 12,5 μ L de tampon échantillon 5X et les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés 1 min / 10000 g et le surnageant est analysé en gel SDS-PAGE. Après la migration, le gel est fixé pendant 30 min dans une solution adéquat

(TCA 11,4% (p/v) ; alcool absolu 5%) puis incubé 30 min dans la solution de séchage (méthanol 5% ; glycérol 5%). Le gel est ensuite séché pendant 2h avec un sécheur de gel Bio-Rad puis les produits de la réaction sont révélés par autoradiographie.

V.6. Détermination de l'état d'activation de HA-ERK1

Les FDH (1.10^6) sont préalablement co-transfectés avec pECE-HA-ERK1 et pSV₂-RasN17 ou pSV₂-RasK12. Les cellules sont traitées comme décrit précédemment (paragraphe V.3. *Immunoprécipitation*) et une quantité égale de protéine est soumise à une immunoprécipitation avec 3 µg d'anti-HA. A la fin de l'immunoprécipitation, les extraits sont déposés sur gel SDS-PAGE et analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho ERK1/2 et anti-ERK1/2.

V.7. Extraction des protéines nucléaires

Après stimulation et arrêt de la réaction, les cellules (2.10^6) sont lavées une fois avec du PBS glacé contenant 50 µM Na₃VO₄, récupérées par grattage dans le même tampon puis centrifugées 375 g / 10 min / 4°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans 0,4 ml de tampon A [10 mM Hépès (pH 7,8) ; 10 mM KCl ; 2 mM MgCl₂ ; 0,1 mM EDTA ; 0,2 mM NaF] contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases cité et 1 mM Na₃VO₄. Après incubation pendant 15 min dans la glace, 25 µL de tampon B (10 % Nonidet P40 (v/v) dans de l'eau distillée stérile) sont ajoutés afin de rompre la membrane plasmique. Le mélange est homogénéisé pendant 15 secondes. Après centrifugation (10000 g / 30 s / 4°C), le surnageant est congelé à -80°C et le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 50 µL de tampon C [50 mM Hépès (pH 7,8), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 % (v/v) glycérol, 0,2 mM NaF] contenant des inhibiteurs de protéases et 1 mM Na₃VO₄. Après 20 min d'incubation en homogénéisant toutes les 5 min et centrifugation (10000 g / 5 min / 4°C), le surnageant contenant les protéines nucléaires est collecté et conservé à -80°C avant analyse.

V.8. Gel-shift (ou retard sur gel)

Tous les réactifs utilisés ont été achetés chez Promega (Charbonnières, France). Cette technique permet d'étudier l'activation de facteurs de transcription en mettant en évidence leur liaison à l'ADN. Pour cela, une sonde d'ADN double brin correspondant au site consensus de liaison à l'ADN du facteur de transcription étudié est synthétisée et diluée à une concentration de 1,75 pmoles/ μ L dans de l'eau distillée stérile contenant du diéthylpyrocarbonate 0,2 % (v/v) (DEPC, un inhibiteur de DNase). Cette sonde est marquée avec du phosphore radioactif à son extrémité 5' en utilisant la T4-polynucléotide kinase en présence d'ATP[γ - 32 P]. Dans le cas des facteurs de transcription de la famille AP-1, l'oligonucléotide utilisé est 5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'. Le marquage s'effectue dans 10 μ L : 3,5 pmoles de cette sonde sont mis en présence de 1 μ L de T4-polynucléotide kinase (10 000 U/mL), de 10 μ Ci d'ATP[γ - 32 P], de 1 μ L de tampon de réaction 10X, et de 5 μ L d'H₂O DEPC. La réaction est effectuée pendant 10 min à 37°C puis est stoppée par ajout de 0,5 μ L d'EDTA 0,5M. Le milieu réactionnel est ensuite dilué en ajoutant 45 μ L de Tris-EDTA (Tris 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM). 2 μ g de protéines nucléaires sont incubés pendant 30 min à température ambiante dans un volume final de 20 μ L de tampon de liaison (4 μ L de tampon de liaison 5X [50 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 500 mM KCl ; 2,5 mM MgCl₂ ; 40 % glycérol (v/v)] ; 4 μ L de DTT 25 mM ; 0,1 μ L de polydIdC à 2 mg/mL ; 1 μ L de la sonde préparée précédemment ; qsp à 20 μ L avec H₂O DEPC). Les échantillons sont ensuite déposés sous tension (25 V) sur un gel de polyacrylamide 4 % contenant du TBE 1X et la migration s'effectue dans du TBE 0,5X. A la fin de la migration, le gel est séché puis les complexes ADN-protéines sont révélés par autoradiographie.

Dans les expériences de compétition permettant de déterminer la spécificité de liaison du facteur de transcription à l'ADN, un oligonucléotide froid double brin est mis en excès (100 fois) dans le tampon de liaison. Il est incubé 10 min à température ambiante puis la sonde radioactive est ajoutée dans les conditions précédemment décrites. Pour déterminer la spécificité de liaison de la sonde AP-1, deux oligonucléotides différents sont utilisés, en plus de la sonde AP-1 froide : un correspondant à la séquence consensus de liaison à l'ADN du facteur NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3') n'ayant pas la capacité de se lier aux facteurs de transcriptions AP-1, et un autre correspondant à la séquence consensus de liaison de CREB (*cAMP-Response Element Binding Protein* ; 5'-AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG-3') pouvant s'associer faiblement à certains dimères AP-1.

V.9. Mesure d'activité Neuraminidase *in vivo*

Après la mise au repos, les fibroblastes (5.10^5) sont lavés une fois avec du PBS stérile thermostaté à 37°C. Les cellules sont stimulées avec 1 mL de tampon de réaction [20 mM CH_3COONa pH 6,5 ; 0,4 mM d'acide 4-méthylumbelliferyl-N-acetyl- α -D-neuraminique (Muf-NANA,, substrat pour neuraminidase), Sigma] contenant 50 $\mu\text{g/mL}$ de κE . A la fin de la période d'incubation, 400 μL de tampon de réaction sont prélevés et ajoutés à 3,6 mL de tampon 0,4 M Glycine pH 10,4. Le Muf-NANA est clivé en NANA et Muf sous l'action d'une neuraminidase. Le Muf ainsi libéré est mis en évidence à l'aide d'un fluorimètre : il émet une lumière de longueur d'onde égale à 445 nm lorsqu'il est excité à 365 nm.

VI. Dosage Radioimmunologique de l'AMPc

Après la mise au repos, les cellules sont lavées une fois avec du tampon PBS puis soumises à une stimulation à 37 °C pendant 5 min, soit avec de la kE dans les conditions précédemment décrites, soit avec de la forskoline (10^{-4} M), molécule activatrice de l'adénylyl cyclase. La réaction a lieu en présence de 1 mM de 3-isobutyl-1-méthylxanthine, afin d'inhiber les phosphodiesterases qui pourraient dégrader l'AMPc. L'incubation est stoppée par ajout d'un volume de HClO_4 10 N nécessaire pour obtenir une concentration finale de 1 N, puis les puits sont grattés. Après centrifugation du milieu d'incubation pendant 5 min à 3000 g, le culot est utilisé pour doser les protéines par la méthode de Lowry [Lowry et coll., 1951] alors que le surnageant est utilisé pour le dosage de l'AMPc proprement dit.

150 μL de surnageant sont prélevés puis 600 μL de HClO_4 1 N et 150 μL de KOH 9 N y sont ajoutés. Après centrifugation à 14 000 g pendant 5 min, l'AMPc est acétylé avec 30 μL d'anhydride acétique et 2,25 mL de tampon citrate sont ajoutés par tube. On prélève ensuite 150 μL de chaque échantillon auxquels on ajoute 150 μL d'anticorps anti-AMPc dilué au $1/20000^{\text{ème}}$ (gracieusement fourni par l'Institut Pasteur de Paris) et 75 μL d'un dérivé radioactif d'AMPc, le 2'-O-monosuccinyladenosine 3':5'-cyclic monophosphate tyrosyl methyl ester marqué à l' ^{125}I (100 000 cpm/75 μL). Après une nuit d'incubation à 4 °C, le complexe antigène/anticorps est précipité dans 2 mL de polyéthylène glycol à 20 % et 200 μL de γ -globulines bovines (2,5 mg/mL). Le surnageant est aspiré et le culot compté grâce à un

compteur à scintillation solide . Le taux d'AMPc produit est déterminé grâce à une gamme de quantité d'AMPc préalablement préparée.

VII. Extraction et analyse des gangliosides

VII.1. Extraction des glycolipides

Après stimulation et arrêt de la réaction, les cellules ($15 \cdot 10^6$) sont lavées une fois avec du PBS glacé, récupérées par grattage dans le même tampon puis centrifugées à $375 \text{ g} / 10 \text{ min} / 4^\circ\text{C}$. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 mL de PBS, puis soumis à sonication trois fois 10 ss. Après un dosage de protéines et ajustement à la même concentration protéique dans 1mL de PBS, 3,75 mL de Chloroforme/Méthanol (2 :1 v/v), 1,25 mL de Chloroforme et 1,25 mL d'eau distillée sont ajoutés.

Le mélange est vortexé, puis centrifugé 5 min à 4°C à 3000 g . La phase inférieure (phase organique) est prélevée puis évaporée sous N_2 .

Les échantillons évaporés sont dissous dans $100 \mu\text{L}$ de chloroforme/méthanol 2 :1 puis déposés sur une colonne contenant 300 mg de Silice 200. La séparation des divers lipides est effectuée en trois étapes :

- Une première élution avec 5 mL de chloroforme/acide acétique (100 : 1, v/v). La fraction éluée contient les lipides neutres.
- Une s élution avec 11,25 mL d'acétone/méthanol (19 : 1, v/v). La fraction récupérée contient les glycolipides autres que les gangliosides.
- Une troisième élution avec 7,5 mL de méthanol permet de récupérer les gangliosides et les phospholipides.

Les éluions 2 et 3 sont rassemblées et évaporées sous N_2 .

VII.2. Analyse par HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*)

Les plaques utilisées pour l'HPTLC, sont des plaques de chromatographie sur couche mince permettant, comparativement à la TLC (*Thin Layer Chromatography*), une meilleure

séparation des composés grâce à une fine granulométrie et au fractionnement très fin de la silice. Les temps de migration sont également plus faibles et la sensibilité de détection est accrue. Les échantillons précédemment obtenus sont dilués dans 30 μL de chloroforme/méthanol 2 :1 puis sont déposés en bandes avec une seringue Hamilton sur une plaque d'HPTLC utilisant de la Silice 60 comme phase stationnaire (Merck Biosciences, VWR, Strasbourg, France). 50 μg d'un mélange de lactosylcéramide, GM3 et GD3 sont déposés et sont utilisés comme standards de migration (Matreya, distribué par Biovalley, Marne-la-Vallée, France). Les gangliosides sont séparés par migration sur la plaque grâce au solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CaCl}_2$ 0,02% (55/45/10, v/v/v). Ils sont révélés par incubation de la plaque préalablement pulvérisée avec du réactif de Bial (Orcinol 0,55%, FeCl_3 0,9%, H_2SO_4 5,5 % dans EtOH 90%) pendant 5 min à 110°C.

VIII. Analyse de la colocalisation EBP-radeaux lipidiques par immunocytochimie

VIII.1. Immunomarquage de l'EBP à la surface des fibroblastes

Des lamelles de microscope sont stérilisées par trempage dans un bain d'alcool à 70% (v/v) et par passage à la flamme, puis sont placées dans les puits d'une plaque 6 puits. Celle-ci sera ensemencée avec des fibroblastes à raison de 200 000 cellules par puits et incubée 48 heures dans du milieu DMEM à 10% de SVF et 1% d'antibiotiques, à 37°C sous 5% de CO_2 . Les cellules sont ensuite mises au repos pendant 18 heures dans du milieu DMEM contenant 0,5% de SVF et 1% d'antibiotiques. Après stimulation et arrêt de la réaction, les cellules sont lavées 3 fois au PBS glacé puis elles sont fixées pendant 15 min à 4°C à l'aide de paraformaldéhyde à 4% (p/v) dilué dans du PBS. Après 3 lavages de 5 min avec du PBS, la couche cellulaire est saturée pendant 30 min à température ambiante grâce à une solution de BSA à 3% (p/v) dilué dans du PBS (PBS/BSA 3%). Sur les lamelles correspondantes, un anticorps de lapin dirigé contre l'EBP dilué au 1000^{ème} dans du PBS/BSA 3%, ou du sérum préimmun servant de contrôle de spécificité utilisé à la même dilution, sont incubés pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules subissent ensuite 5 lavages de 5 min avec du PBS, puis un anticorps anti-IgG de lapin couplé à de la biotine dilué au 150^{ème} dans du PBS/BSA 3% est incubé pendant 30 min. A nouveau, 5 lavages de 5 min au PBS sont réalisés puis une incubation de 30 min à l'obscurité avec de l'AlexaFluor 568 couplé à de la

streptavidine dilué dans du PBS est opérée. Après 5 lavages de 5 min au PBS, le marquage des radeaux lipidiques est effectué.

VIII.2. Marquage des radeaux lipidiques

Un des constituants spécifiques des radeaux lipidiques est le ganglioside GM1 [Zajchowski et Robbins, 2002]. C'est sur celui-ci que se fixe la sous-unité B de la toxine du choléra lors de l'infestation de la cellule par cette toxine. Nous utiliserons donc cette caractéristique pour marquer sélectivement les radeaux lipidiques sur la membrane plasmique des FDH.

Les lamelles précédemment utilisées pour le marquage de l'EBP sont incubées à l'obscurité avec la sous-unité B de la toxine du choléra marquée à l'Alexafluor 488, diluée à raison de 1 µg/mL dans du PBS. Cette solution est incubée 10 min à 4°C avec les cellules. A nouveau, 3 lavages de 5 min avec du PBS sont réalisés, puis ce tampon est éliminé. Quelques gouttes de Citifluor AF1 (Agar Scientific) sont déposées sur une lame de microscope. Cet agent permet d'empêcher l'atténuation de fluorescence du fluorophore. Puis, la lamelle est placée sur la lame de façon à avoir la face comprenant les cellules au contact du Citifluor AF1. Cette lamelle est lutée avec du vernis à ongles et les cellules sont observées par fluorescence avec un microscope confocal Biorad 1024S.

<i>Anticorps et réactifs</i>	<i>Caractéristiques</i>
Anti-EBP	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant à 14 résidus de la séquence de 32 acides aminés spécifiques de l'EBP (Neosystem, Strasbourg, France).
Anti-IgG de lapin biotinylé	Anticorps permettant une sensibilité accrue de détection par utilisation de fluorophores couplés à de la streptavidine (Jackson ImmunoResearch réf. 711 065 152, distribué par Interchim, Montluçon, France).

AlexaFluor 568 couplé streptavidine	Fluorophore ($\lambda_{exc}=578$ nm et $\lambda_{ém}=603$ nm) fluorescent dans le rouge et s'associant à la biotine (Molecular Probes réf. S-11226, distribué par Invitrogen).
Sous-unité B de la toxine du choléra couplé à de l'AlexaFluor 488	Reconnaît le GM1. Marqueur spécifique des radeaux lipidiques couplé à de l'AlexaFluor 488 ($\lambda_{exc}=495$ nm et $\lambda_{ém}=519$ nm) fluorescent dans le vert (Molecular Probes réf. V-34403).

Tableau 7 : Anticorps et réactifs utilisés en immunocytochimie

IX. Inhibiteurs chimiques utilisés

IX.1. U0126, inhibiteur de MEK1/2

Le U0126 (Cell Signaling) est un inhibiteur spécifique de MEK1 et MEK2. Cet inhibiteur n'entre pas en compétition avec le site de liaison à l'ATP de ces kinases et les inhibe de manière allostérique. U0126 a un IC_{50} vis à vis de MEK1 de 72 nM et de 58 nM vis à vis de MEK2 [English et Cobb, 2002].

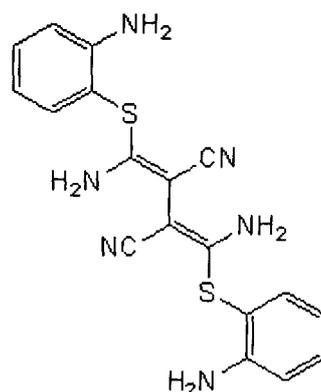


Figure 25 : structure chimique du U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiène).

IX.2. SB203580, inhibiteur de p38

C'est un inhibiteur spécifique de p38 α et p38 β [Ono et Han, 2000]. Il inhibe de façon compétitive la liaison de l'ATP à son site. Il n'inhibe pas les autres isoformes de p38. L'IC₅₀ du SB203580 est d'environ 50 nM pour p38 α et 500 nM pour p38 β [Davies et coll., 2000]. Cet inhibiteur a été acheté chez Calbiochem (distribué par VWR Int., Strasbourg, France).

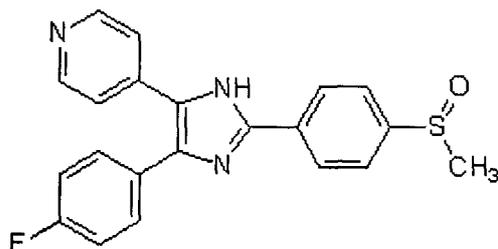


Figure 26 : Structure chimique du SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole).

IX.3. SP600125, inhibiteur de JNK

Cet inhibiteur spécifique de JNK1, 2 et 3 est un inhibiteur compétitif du site de liaison de l'ATP de ces kinases (Cell Signaling). L'IC₅₀ du SP600125 respectivement pour JNK1, 2 et 3 est de 40 nM, 40 nM et de 90 nM [Bogoyevitch et coll., 2004]. SP600125 a été acheté chez Calbiochem.

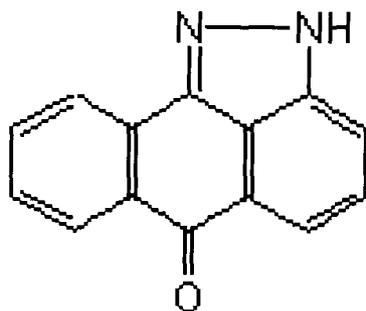


Figure 27 : Structure chimique du SP600125 (Anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one 1,9-pyrazoloanthrone)

IX.4. GF109203X, inhibiteur de PKC

Cet inhibiteur spécifique de PKC est structuralement similaire à la staurosporine. Il agit de manière compétitive vis à vis du site de liaison de l'ATP des PKC. C'est un inhibiteur très sélectif des isoformes PKC α , PKC β _I, β _{II}, γ , δ et ϵ . GF109203X a été acheté chez Calbiochem.

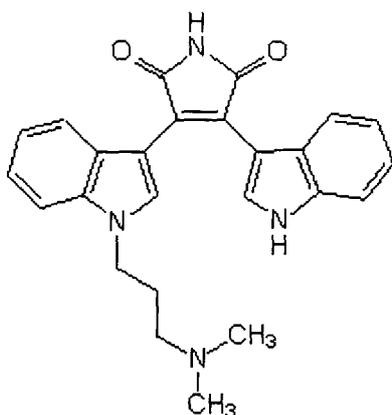


Figure 28 : Structure chimique du GF109203X
2-[1-(3-Diméthylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide

IX.5. LY294002, inhibiteur de PI3K

Le LY294002 (Cell Signaling) est un inhibiteur spécifique de PI 3-kinase. Il inhibe de façon compétitive la liaison de l'ATP sur la sous-unité catalytique p110 des PI 3-kinases de classe I_A, I_B et II [Vlahos et coll., 1994]. Contrairement à la wortmannine, un autre inhibiteur de la PI 3-kinase, le LY294002 est stable en culture et n'a pas d'action sur les PI 3-kinases de classe III [Powis et coll., 1994 ; Stein et coll., 2000].

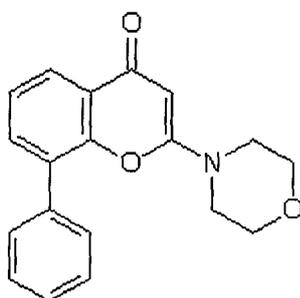


Figure 29 : Structure chimique du LY294002
2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one

IX.6. H-89, inhibiteur de PKA

Cet inhibiteur spécifique des PKA agit également de manière compétitive vis à vis de la liaison de l'ATP à son site de liaison. L'IC₅₀ de cet inhibiteur est de 48 nM [Chijiwa et coll., 1990]. H-89 a été acheté chez Calbiochem.

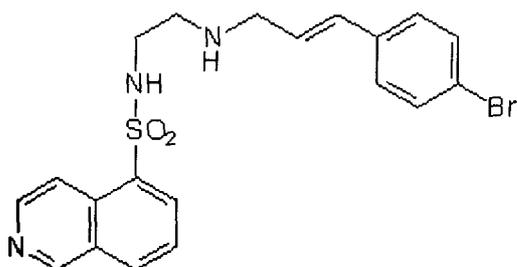


Figure 30 : Structure chimique du H-89
N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide

IX.7. L'acide 2,3-désoxy-2-déhydro-N-acétylneuraminique (DANA), inhibiteur de neuraminidase

Cette molécule est un analogue de l'acide sialique (acide N-acétylneuraminique) et agit comme inhibiteur compétitif des neuraminidases [Achyuthan et Achyuthan, 2001]. Il été acheté chez Sigma.

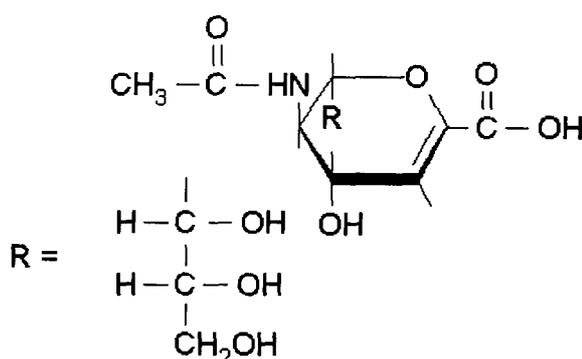


Figure 31 : Structure chimique de l'acide 2,3-désoxy-2-déhydro-N-acétylneuraminique

X. Analyse statistique des résultats obtenus

Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne des données obtenues à partir de trois expériences indépendantes au minimum. Les valeurs moyennes sont exprimées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). Le test Student a été utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus (*, $p < 0,01$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$).

Les images montrées sont représentatives des triplicatas obtenus.

Résultats

1^{ère} partie

Les peptides d'élastine induisent la production de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques via l'activation de la voie ERK1/2 par les modules AMPc / PKA / B-Raf / MEK1/2 et protéine G_i/G₀ / p110 γ / Raf-1 / MEK1/2

I. La kE induit la production de pro-MMP-1 via les voies ERK1/2, PKA et PI3K

Les travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire ont montré que la kE, hydrolysate organométallique d'élastine insoluble, induit l'expression de pro-MMP-1, avec pour résultat l'accumulation de cette MMP dans le milieu de culture des fibroblastes dermiques [Brassart et coll., 2001]. La concentration optimale de kE induisant cet effet est de 50 µg/ml, concentration que nous avons donc utilisé dans toute notre étude.

Les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine ont été très peu étudiées. Cependant, la participation des voies MAPK ERK1/2, JNK1/2 et p38 dans l'expression de la pro-MMP-1 est connue [Westermarck et Kähäri, 1999].

Nous avons donc d'abord réalisé une étude préliminaire en recherchant l'implication de ces voies dans la production de pro-MMP-1 induite par la kE, en nous basant sur la présence de cette protéase dans le milieu de culture.

I.1. Influence de l'inhibition des voies ERK1/2, JNK1/2 et p38 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE

Après avoir été mises au repos pendant 18h dans du milieu de culture à 0,5 % de SVF, les cellules (10^5) sont préincubées pendant 1h soit avec du U0126 (10 µM, inhibiteur de MEK1/2, kinases activatrices de ERK1/2), soit avec du SB203680 (5 µM ; inhibiteur de p38α et β), soit avec du SP600125 (20 µM ; inhibiteur de JNK1/2). Après cette période de préincubation, les fibroblastes sont stimulés pendant 24 h avec de la kE (50 µg/ml). A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot.

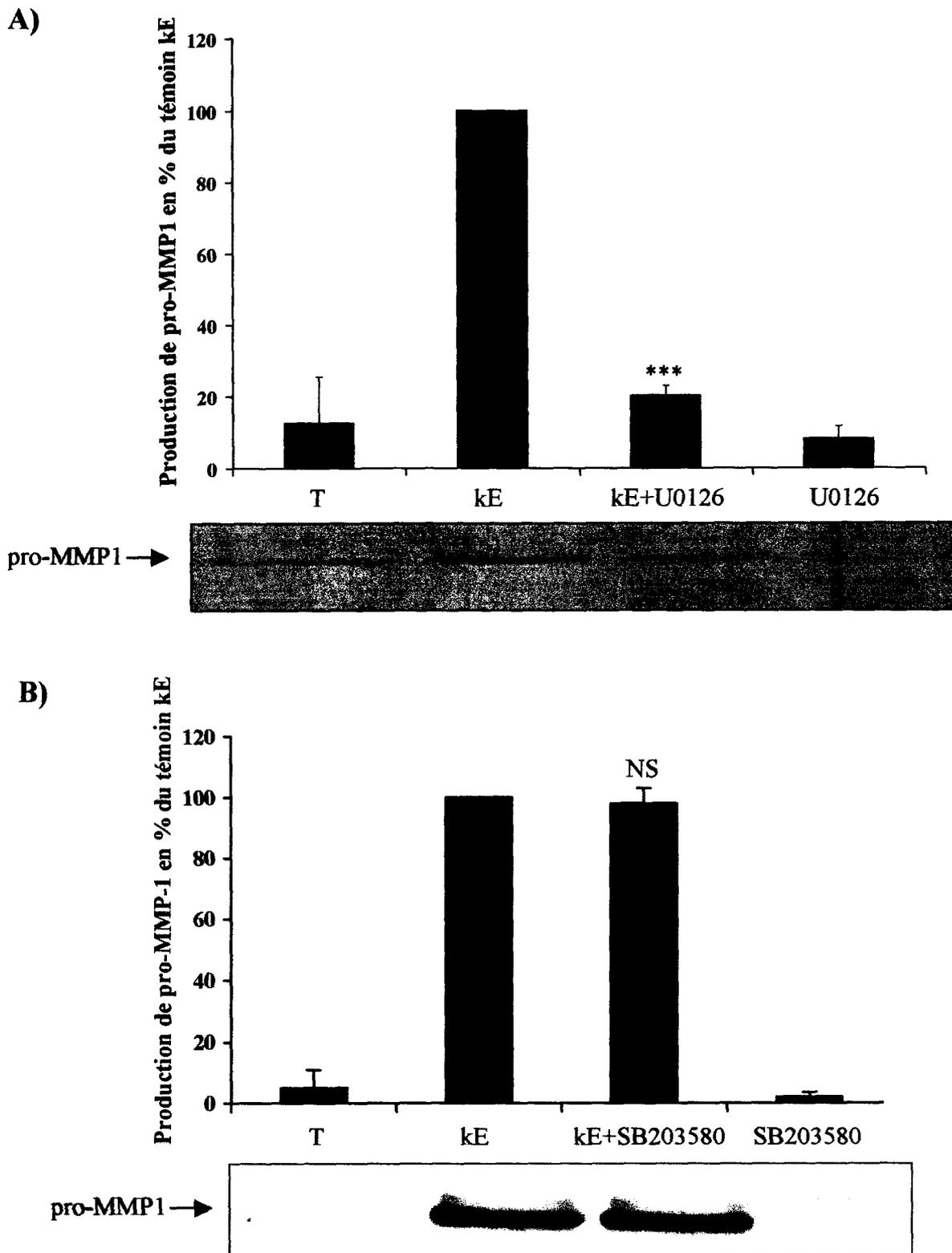


Figure 32 : Analyse par western-blot de l'effet du U0126 (A) et du SB203580 (B) sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées ou non pendant 24h avec 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kE. Dans le cas de l'utilisation de U0126 (10 μM) ou de SB203580 (5 μM), ceux-ci sont préincubés 1 h avant la stimulation. A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. Les western-blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. Les analyses densitométriques correspondantes sont indiquées au dessus des blots sous forme de la moyenne \pm SEM. kE vs kE+U0126 significativement différents à ***, $p < 0,001$. NS : kE vs kE+SB203580 non significativement différents.

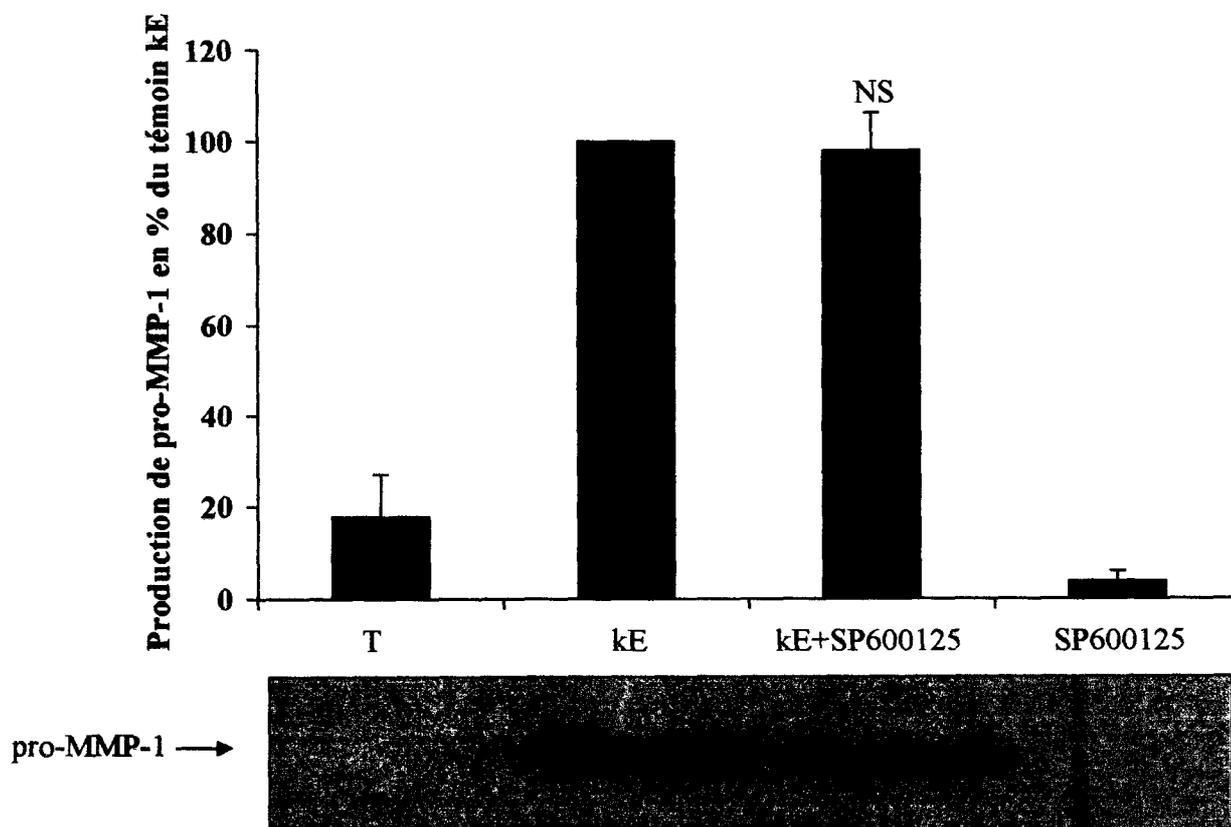


Figure 33 : Analyse par western-blot de l'effet du SP600125 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées ou non pendant 24h avec 50 $\mu\text{g/mL}$ de kE. Dans le cas de l'utilisation du SP600125 (20 μM), cet inhibiteur est préincubé 1 h avant la stimulation. A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. Les analyses densitométriques correspondantes sont indiquées au dessus des blots sous forme de la moyenne \pm SEM. NS : kE vs kE+SP600125 non significativement différents.

En accord avec nos précédents résultats, la kE induit une forte production de pro-MMP-1 comparativement aux contrôles (Figures 32 et 33). Cette MMP apparaît sous deux formes correspondant à la forme glycosylée de 57 kDa et la forme non glycosylée de 53 kDa. Il est à noter que la forme glycosylée n'est pas détectée dans toutes les expériences, certainement dû à son faible taux d'expression.

L'utilisation des inhibiteurs spécifiques des différentes voies MAPK permet de mettre en évidence un point important : seul l'utilisation du U0126 permet d'inhiber l'effet de la kE. En effet, alors que cet inhibiteur bloque totalement la production de pro-MMP-1, ni le SB203580, ni le SP600125, n'ont d'effet sur la synthèse de cette MMP stimulée par la kE.

L'inhibition de la voie ERK1/2 suffit à bloquer la production de pro-MMP-1. La voie MAPK contrôlant la production de cette MMP par les peptides d'élastine dans les fibroblastes dermiques est donc la voie ERK1/2.

I.2. La kE induit l'activation de facteurs de transcription de la famille AP-1 via la voie ERK1/2

Les facteurs de transcription de la famille AP-1 jouent un rôle majeur dans l'expression de la MMP-1. En particulier, le site de fixation AP-1 situé entre les positions -72 pb et -66 pb du promoteur de cette MMP joue un rôle crucial dans son expression [Lee et coll., 1996 ; Doyle et coll., 1997 ; Westermarck et coll., 1997]. Comme de tel facteurs de transcriptions peuvent être activés par la voie ERK1/2, nous avons procédé à des expériences de Gel shift pour déterminer le niveau d'activation des facteurs de transcriptions du type AP-1 suite au traitement des cellules avec de la kE.

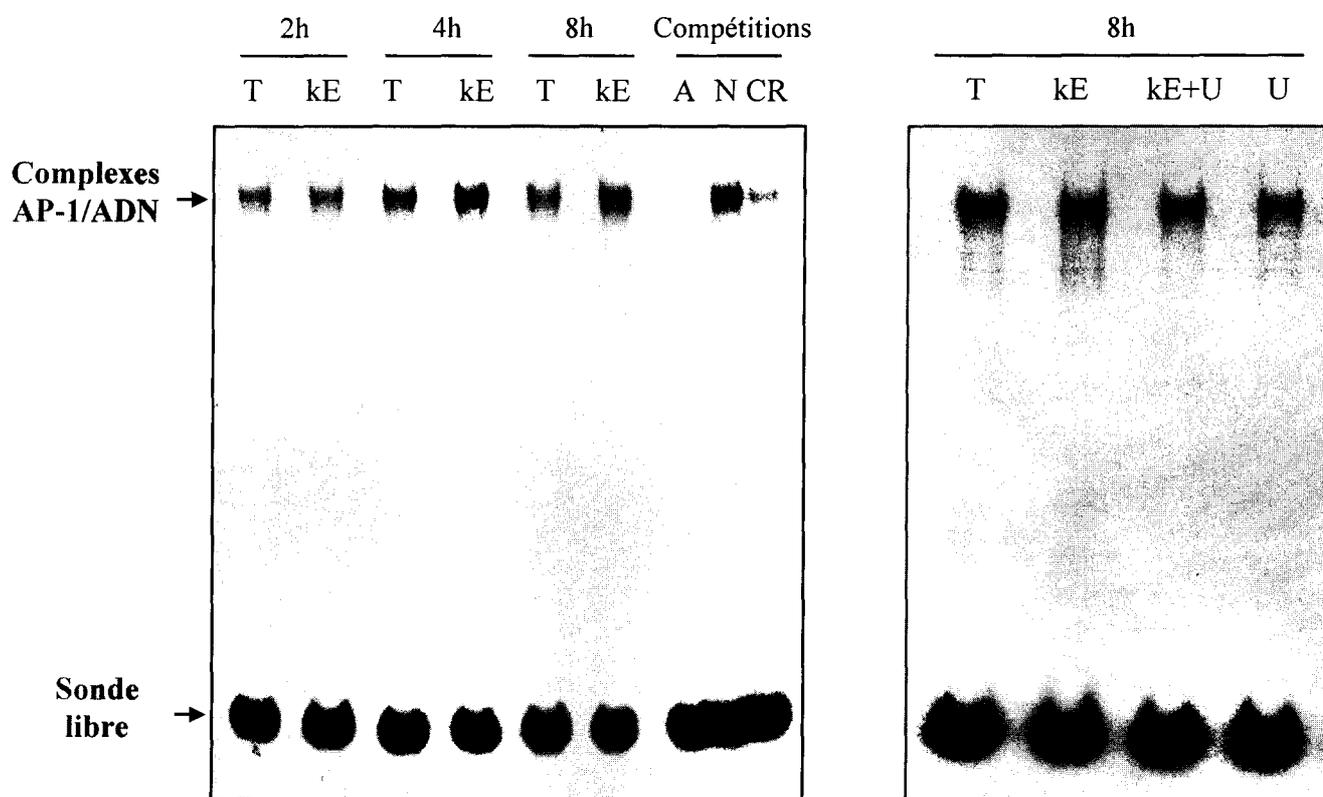


Figure 34 : Analyse de l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 par technique de gel-shift. Expériences de retard sur gel utilisant une sonde d'ADN double brin radiomarquée possédant la séquence 5'-TGAGTCA-3' correspondant au site de fixation des complexes AP-1 sur le promoteur de la MMP-1 et permettant la fixation de facteurs de transcription de type AP-1. A gauche, étude de la cinétique d'activation des dimères AP-1 utilisant des extraits nucléaires de cellules mises au repos puis traitées (kE, 50 µg/ml) ou non (T : témoin). Les expériences de compétitions ont été réalisées à partir d'extraits nucléaires de cellules traitées pendant 8h avec de la kE (A : sonde AP-1 froide ; N : sonde NF-κB froide, CR : sonde CREB froide). Toutes les sondes froides sont en excès de 100 fois par rapport à la sonde AP-1 marquée. A droite, effet du U0126 sur l'activation d'AP-1. Dans ce cas, U0126 (10 µM) a été préincubé 1 h avant la stimulation. Les figures montrées sont représentatives des résultats obtenus lors de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires.

L'analyse de l'activation des facteurs de transcription AP-1 révèle que la kE induit une activité de liaison de ces protéines à leur séquence cible, avec dans nos conditions d'étude, une activation dès 2 h de stimulation, et continuant d'augmenter jusqu'à 8 h. L'analyse de la spécificité de liaison des protéines nucléaires à la séquence cible démontre que ce sont des protéines du type AP-1 qui se sont fixées. En effet, la disparition de la bande correspondant au complexe AP-1/ADN lors d'expériences de compétitions utilisant une sonde AP-1 non marquée en est la preuve. De plus, ces résultats sont renforcés par le fait que la sonde CREB entre également en compétition : en effet, certains dimères AP-1 peuvent s'associer faiblement à CREB [Eferl et Wagner, 2003], expliquant les résultats obtenus. L'oligonucléotide NF- κ B, incapable de lier les dimères AP-1, n'entre pas en compétition.

L'utilisation de U0126 permet de bloquer totalement l'activité de liaison à l'ADN des protéines AP-1 évaluée à partir d'extraits nucléaires provenant de cellules stimulées pendant 8 h avec de la kE. Ceci est tout à fait cohérent avec le fait que de tels facteurs de transcriptions soient cruciaux pour l'expression de MMP-1 ainsi qu'avec le fait que l'inhibiteur de MEK1/2 bloque totalement la production de cette MMP stimulée par la kE (Figure 32A).

I.3. La production de pro-MMP-1 par la kE implique les kinases PKA et PI3K

La régulation de l'activation de la voie ERK1/2 peut impliquer diverses isoformes de PKC et des voies dépendantes de l'AMPc [Houslay et Kolch, 2000 ; Dhillon et Kolch, 2002] . Nous avons ainsi évalué leur rôle dans la production de pro-MMP-1 par la kE.

I.3.1. Influence de l'inhibition des PKC sur la production de pro-MMP-1

Différentes isoformes de PKC peuvent participer à l'activation de Raf-1, kinase activatrice de MEK1/2. De plus, l'activation de PKC a été mise en évidence dans le chimiotactisme de cellules de carcinomes pulmonaires M27 induit par des peptides d'élastine [Blood et Zetter, 1989]. Nous avons donc naturellement testé l'influence du GF109203X, inhibiteur spécifique de PKC permettant d'inhiber de nombreuses isoformes de ces kinases (PKC α , β _I, β _{II}, γ , δ et ϵ), sur la production de pro-MMP-1. Les conditions expérimentales utilisées sont identiques à celles décrites pour les inhibiteurs de MAPK.

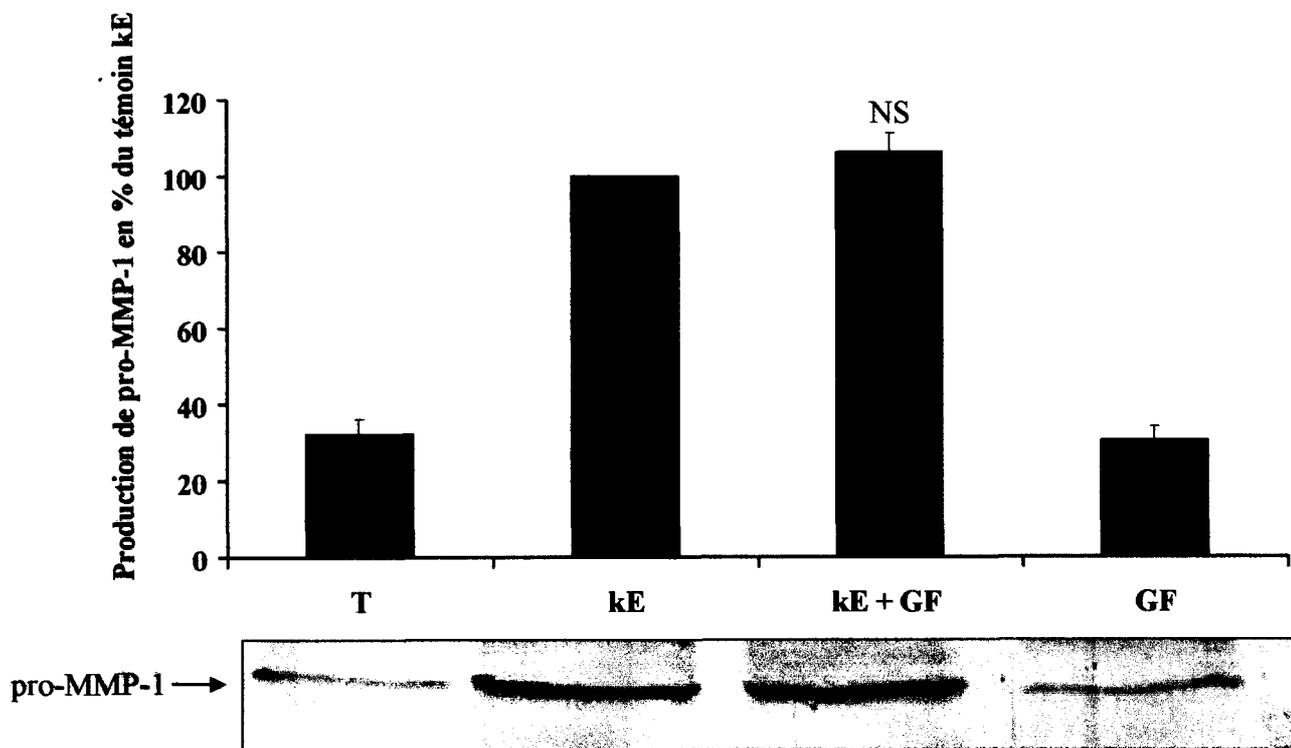


Figure 35 : Analyse par western-blot de l'effet du GF109203X sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées ou non pendant 24h avec 50 $\mu\text{g/mL}$ de kE. Dans le cas de l'utilisation du GF109203X (0,1 μM), cet inhibiteur est préincubé 1 h avant la stimulation. A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. Les analyses densitométriques correspondantes sont indiquées au dessus des blots sous forme de la moyenne \pm SEM. NS : kE vs kE+GF109203X non significativement différents.

L'utilisation de cet inhibiteur n'entraîne aucune baisse du taux de pro-MMP-1 dans le milieu après 24 h de stimulation avec la kE. Les PKC inhibées par le GF109203X ne sont donc pas impliquées dans la signalisation considérée.

I.3.2. Effet de la kE sur la production d'AMPC et rôle de ce second messenger dans la production de pro-MMP-1

Les voies dépendantes de l'AMPC peuvent également être responsables de l'activation de ERK1/2. Une augmentation d'AMPC induite par des peptides d'élastine a été mise en évidence chez des monocytes [Fülöp et coll., 1986]. De plus, ce second messenger peut induire l'expression de la MMP-1 chez des fibroblastes dermiques humains [Kuroda et Shinkai, 1997]. Nous avons donc évalué l'influence de la kE sur la production d'AMPC par les fibroblastes, puis étudié le rôle de ce second messenger dans la production de pro-MMP-1.

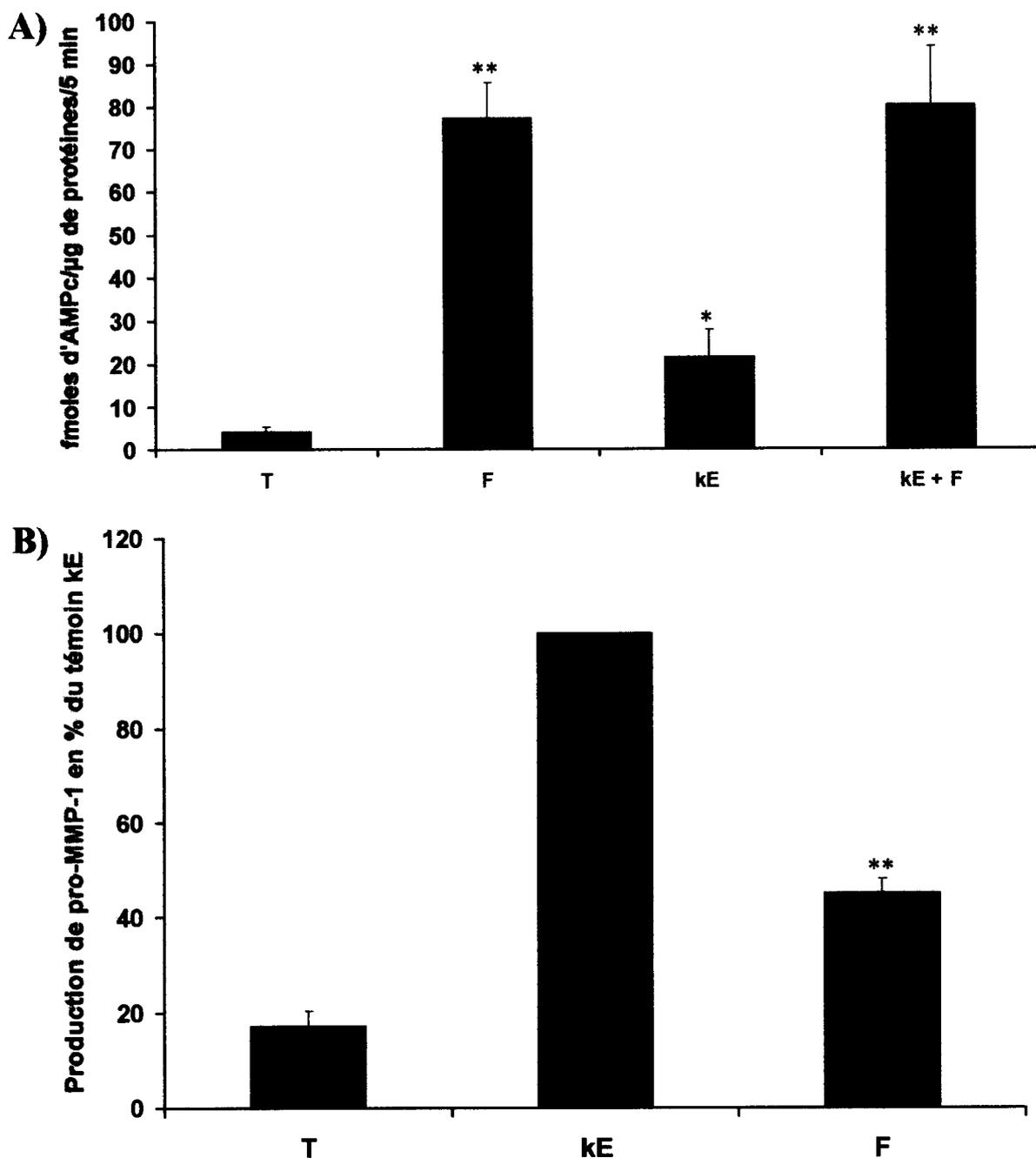


Figure 36 : Effet de la kE sur la production d'AMPc par les fibroblastes dermiques et influence de la forskoline sur la production de pro-MMP-1. A) la kE induit la synthèse d'AMPc. Dosage radio immunologique de l'AMPc. Après la mise au repos, les cellules ($5 \cdot 10^5$) sont stimulées avec de la kE ($50 \mu\text{g/mL}$) pendant 5 min et/ou avec de la forskoline (F, 10^{-4} M) Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm SEM obtenus à partir de trois expériences indépendantes. Les différences statistiques significatives entre stimulés et témoin sont indiquées (*, $p < 0,05$ et **, $p < 0,01$).

B) Influence de la forskoline sur la production de pro-MMP-1. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées pendant 24 h avec de la kE ($50 \mu\text{g/mL}$) ou de la forskoline (F, 10^{-5} M). A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. L'analyse densitométrique correspondante est indiquée et les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm SEM obtenus à partir de trois expériences indépendantes. T vs F significativement différents à **, $p < 0,01$.

Après une mise au repos effectuée dans les conditions précédemment décrites et stimulation par la kE pendant 5 min, le taux intracellulaire d'AMPc a été déterminé par dosage radio-immunologique. L'influence de ce second messenger sur la production de pro-MMP-1 a été ensuite déterminé par l'utilisation de forskoline, activateur non physiologique de l'adénylyl cyclase, enzyme responsable de la synthèse d'AMPc.

Pour les fibroblastes dermiques, une stimulation de 5 min avec de la kE induit une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire d'environ 6 fois. La forskoline induit également une très forte augmentation (19 fois comparativement au contrôle) et a été utilisé ici comme témoin positif de la production d'AMPc (Figure 36 A).

La forskoline est classiquement utilisée pour augmenter artificiellement le taux intracellulaire d'AMPc afin d'évaluer son rôle dans un processus biologique. Nous avons donc testé son influence sur la production de pro-MMP-1.

Nous montrons (Figure 36 B) que cette molécule induit la production de pro-MMP-1. Nos résultats, en accord avec ceux de Kuroda et Shinkai [1997] suggèrent fortement que l'AMPc est un second messenger impliqué dans l'expression de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques. Ainsi, l'augmentation d'AMPc induite par la kE pourrait jouer ce rôle.

Cependant, la forskoline ne reproduit que partiellement l'effet de la kE sur la production de pro-MMP-1, suggérant que l'effet des peptides d'élastine n'est pas totalement dépendant de l'AMPc.

1.3.3. Effet de l'inhibition des PKA sur la production de pro-MMP-1 stimulée par la kE

Une des cibles privilégiées de l'AMPc est la Ser/Thr kinase PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc). Cette kinase peut activer la voie ERK1/2 via l'activation de B-Raf [Houslay et Kolch, 2000].

Le rôle des PKA dans la production de pro-MMP-1 induite par les peptides d'élastine a été étudiée en utilisant le H-89, inhibiteur spécifique de ces kinases, dans les mêmes conditions de culture que celles décrites pour tous les autres inhibiteurs.

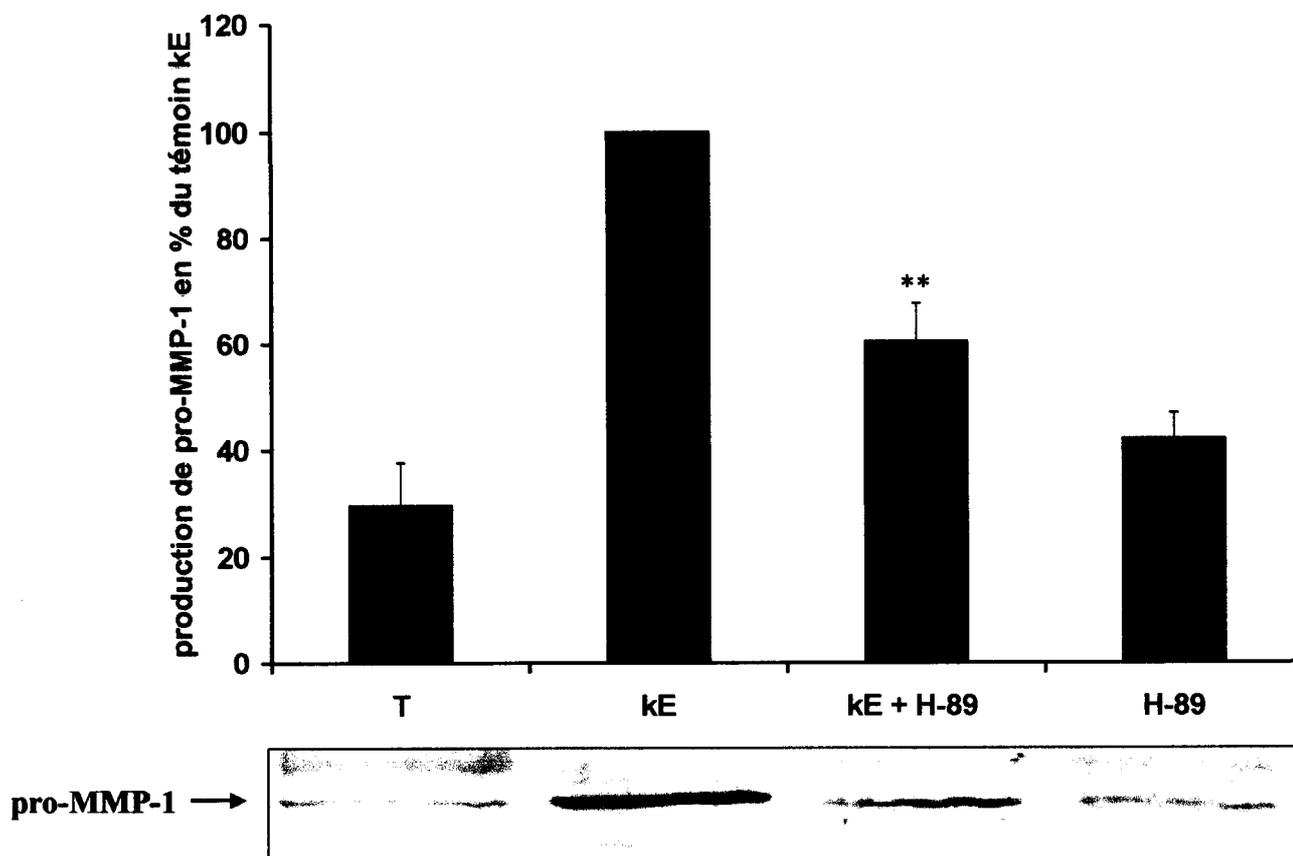


Figure 37 : Influence du H-89 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées ou non pendant 24h avec 50 $\mu\text{g/mL}$ de kE. Dans le cas de l'utilisation du H-89 (5 μM), cet inhibiteur est préincubé 1 h avant la stimulation. A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. Les analyses densitométriques correspondantes sont indiquées au dessus des blots sous forme de la moyenne \pm SEM. kE vs. kE+H-89 significativement différents à **, $p < 0,01$.

L'utilisation du H-89 permet d'inhiber significativement l'accumulation de pro-MMP-1 induite par la kE d'environ 50 %. La concentration de H-89 utilisée, est, comme pour tous les autres inhibiteurs, suffisante pour inhiber totalement les PKA. Cette inhibition partielle met donc à jour le fait qu'une autre voie de signalisation indépendante de la voie AMPc/PKA est mise en jeu, confirmant les résultats présentés dans la Figure 36B.

1.3.4. Effet de l'inhibition des PI3K sur la production de pro-MMP-1 stimulée par la kE

Plusieurs auteurs ont mis en évidence que divers composants matriciels pouvaient activer les phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K) [Versteeg et coll., 2000 ; Li et coll., 2001]. De plus, les peptides d'élastine induisent la migration de diverses cellules, phénomène dans lequel les PI3K sont souvent impliquées [Okkenhaug et Vanhaesebroeck, 2003]. La participation d'une PI3K dans un processus régulé par les peptides d'élastine n'a jamais été décrit. Nous avons donc testé l'effet du LY294002, inhibiteur de PI3K, sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE.

Les cellules sont traitées comme décrit précédemment.

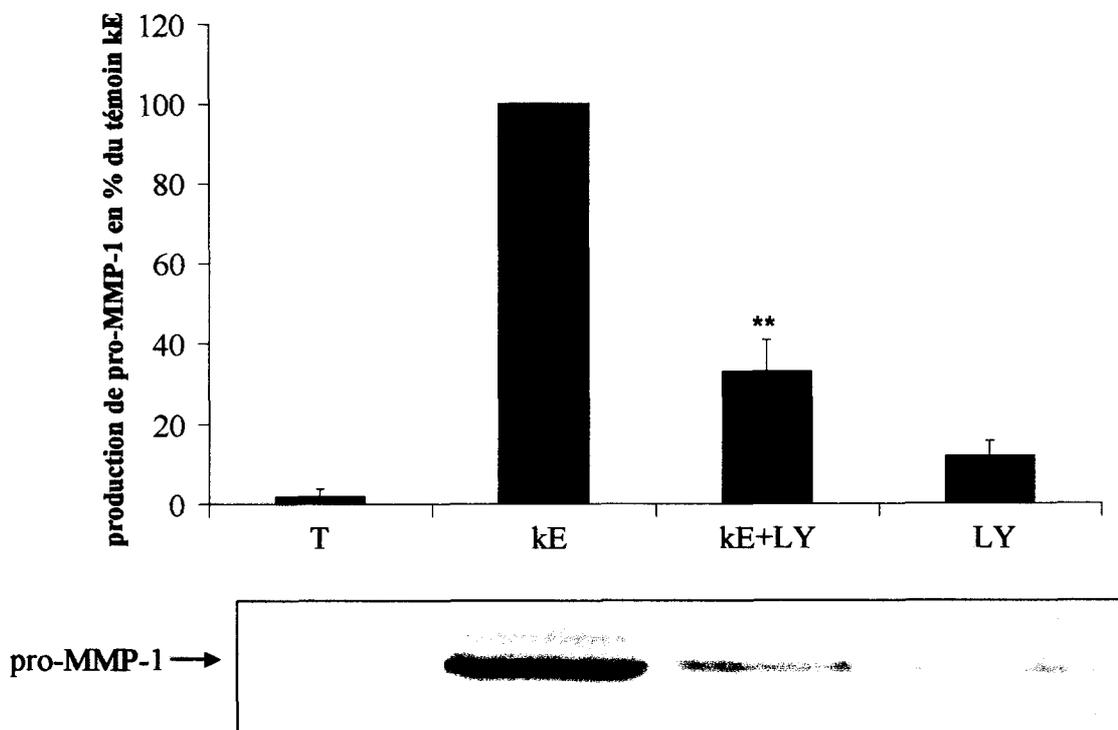


Figure 38 : Influence du LY294002 sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées ou non pendant 24h avec 50 $\mu\text{g/mL}$ de kE. Dans le cas de l'utilisation du LY294002 (25 μM), cet inhibiteur est préincubé 1 h avant la stimulation. A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes et reproductibles. Les analyses densitométriques correspondantes sont indiquées au dessus des blots sous forme de la moyenne \pm SEM. kE vs kE+LY significativement différents à **, $p < 0,01$

L'inhibition des PI3K bloque partiellement (60%) la production de pro-MMP-1 induite par les peptides d'élastine. Cette voie pourrait donc être la voie complémentaire à la voie AMPc/PKA décrite précédemment.

La production de pro-MMP-1 induite par les peptides d'élastine met donc en jeu les voies AMPc/PKA, PI3K et ERK1/2.

Cette analyse très préliminaire des acteurs impliqués dans la régulation de la production de pro-MMP-1 par les peptides d'élastine nous donne des renseignements précieux concernant les voies de signalisation induites par le récepteur de l'élastine dans les fibroblastes dermiques.

Logiquement, l'étape suivante a été d'étudier en détail la signalisation intracellulaire impliquée en nous focalisant sur les mécanismes d'intégration de ces différents protagonistes.

II. Les peptides d'élastine activent la voie ERK1/2 par un mécanisme indépendant de Ras impliquant les voies p110 γ / Raf-1/ MEK1/2 et PKA / B-Raf/ MEK1/2

Nous avons précédemment montré que la kE induit la production de pro-MMP-1 par la voie ERK1/2 et les kinases PI3K et PKA. Cependant l'activation de ces protéines et les interrelations entre ces différents acteurs n'ont pas été étudiées.

II.1. La kE active MEK1/2 et ERK1/2, mais pas p38 ni JNK1/2

Le U0126, inhibiteur de MEK1/2 bloque totalement l'activation de AP-1 et la production de pro-MMP-1 induite par les peptides d'élastine. Cependant, ni le SP600125 (inhibiteur de JNK1/2), ni le SB203580 (inhibiteur de p38 α et β) ne bloquent cet effet. Cependant, cette absence d'inhibition ne nous renseigne pas sur l'effet de la kE sur ces kinases.

Nous avons donc évalué l'influence de la kE sur l'activation de ces voies. Les cellules sont mises au repos pendant 18h puis sont stimulées avec de la kE. Les extraits cellulaires sont ensuite soumis à un western-blot et les formes actives de MEK1/2, ERK1/2, p38 et JNK1/2 sont recherchées par utilisation d'anticorps adéquats.

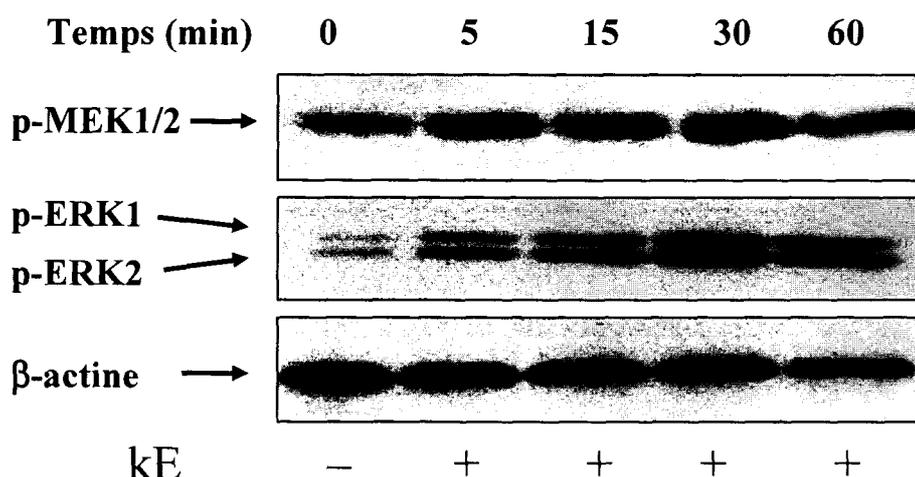


Figure 39 : Effet de la kE sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont traitées avec de la kE (50 μ g/ml) pendant les temps indiqués. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204) et anti-phospho-MEK1/2 (S217/S221). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. p-MEK1/2 : phospho-MEK1/2 (S217/S221) ; p-ERK1/2 phospho-ERK1/2 (T202/Y204).

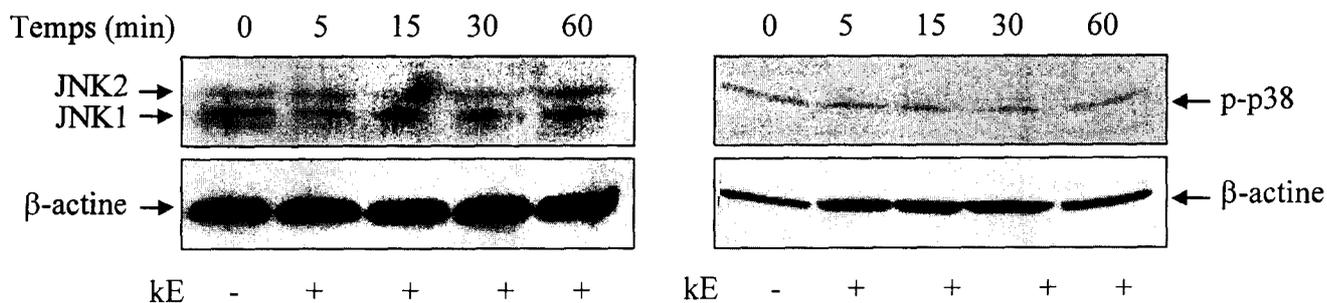


Figure 40 : Effet de la kE sur l'activation de JNK1/2 et p38. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont traitées avec de la kE (50 $\mu\text{g/ml}$) pendant les temps indiqués. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-JNK1/2 (T183/Y185) et anti-phospho-p38 (T180/Y182). La membrane est ensuite dés hybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. p-JNK1/2 : phospho-JNK1/2 (T183/Y185) ; p-p38 : phospho-p38 (T180/Y182).

Le traitement des fibroblastes avec de la kE résulte dans l'activation dès 5 min de MEK1/2 et de ERK1/2. Le maximum d'activation est atteint à 30 min. Les deux profils de cinétiques de phosphorylation sont semblables. De manière très intéressante, une forte activation de ces kinases comparativement au témoin est toujours observée après 60 min de stimulation (Figure 39).

Au contraire, les peptides d'élastine n'induisent ni l'activation de JNK1/2, ni l'activation de p38 (Figure 40). Ces résultats peuvent expliquer pourquoi dans le cas des peptides d'élastine, la production de pro-MMP-1 ne dépend que de la voie ERK1/2 alors que, dans la littérature, il a été montré que JNK1/2 et p38 peuvent également y participer [Westermarck et Kähäri, 1999].

L'ensemble de ces données sont donc en accord avec nos résultats concernant la production de pro-MMP-1 par la kE. La suite logique du travail a donc été d'étudier comment les voies dépendantes de PKA et PI3K participent à l'activation de la voie ERK1/2, puis d'analyser comment ces différents mécanismes s'articulent.

II.2. MEK1/2 et ERK1/2 sont activées de manière dépendante de PKA et PI3K

Afin de déterminer l'influence de PKA et PI3K sur l'activation de ERK1/2 et MEK1/2, les cellules ont été préincubées après leur mise au repos avec du LY294002, du H-89, ou les deux. De plus, dans le but de déterminer l'importance de ces kinases dans l'activation de la voie ERK1/2, l'effet conjoint des deux inhibiteurs sur l'activation de MEK1/2 et de ERK1/2 a été comparé à celui du lactose, antagoniste de l'EBP. Pour toutes les expériences, les effets des inhibiteurs ont été évalués à 30 min de stimulation, correspondant au maximum d'activation de MEK1/2 et ERK1/2.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 41 à 43.

II.2.1. Influence du LY294002 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2

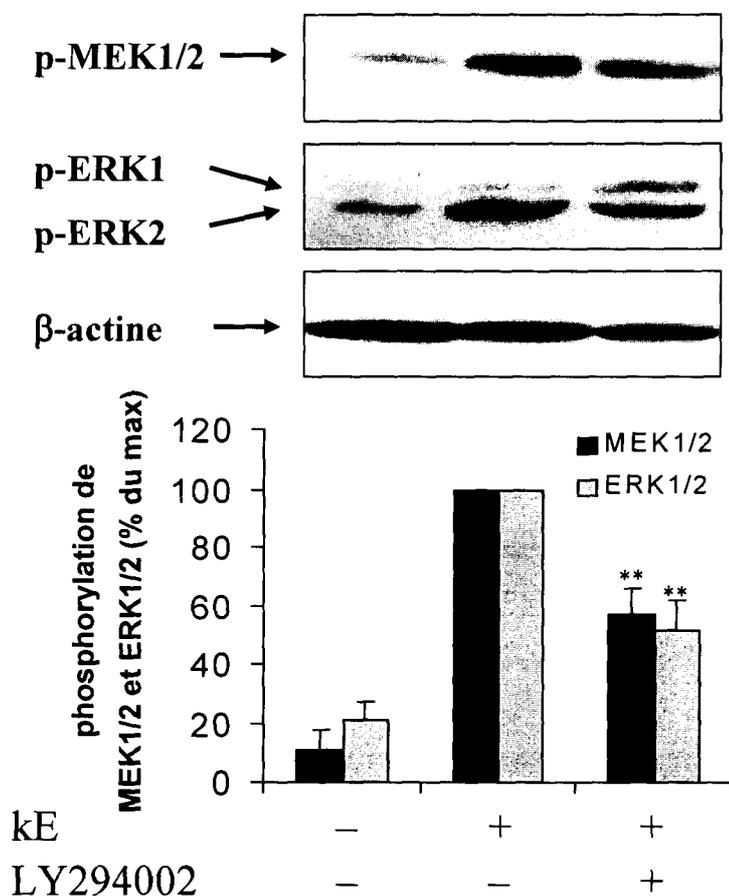


Figure 41 : Effet du LY294002 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont préincubées pendant 1h avec $25 \mu\text{M}$ de LY294002 puis traitées avec de la kE ($50 \mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204) et anti-phospho-MEK1/2 (S217/S221). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti-β-actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée sous les blots sous forme de la moyenne±SEM et représente les rapports de densitométrie p-MEK1/2 / β-actine et p-ERK1/2 / β-actine. **, $p < 0,01$: significativement différents par rapport à kE seule.

Le LY294002 permet d'inhiber partiellement l'activation de ERK1/2 et MEK1/2 induite par la kE. L'analyse densitométrique révèle que le pourcentage d'inhibition obtenu est d'environ 50 % (44 % pour MEK1/2 et 49 % pour ERK1/2). Une PI3K est donc impliquée dans l'activation de MEK1/2, et donc de ERK1/2.

II.2.2. Influence du H-89 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2

Dans ces expériences, l'influence de l'inhibition des PKA sur l'activation de la voie ERK1/2 a été examinée par l'utilisation de H-89. Il est à noter que dans ces expériences, cet inhibiteur a été utilisé à 1 μ M (contre 5 μ M dans les expériences précédentes), dans le but de rester dans les conditions optimales de spécificité de l'inhibiteur. Cependant les résultats obtenus avec les deux concentrations sont identiques. Seules les données obtenues avec la concentration de 1 μ M sont présentées.

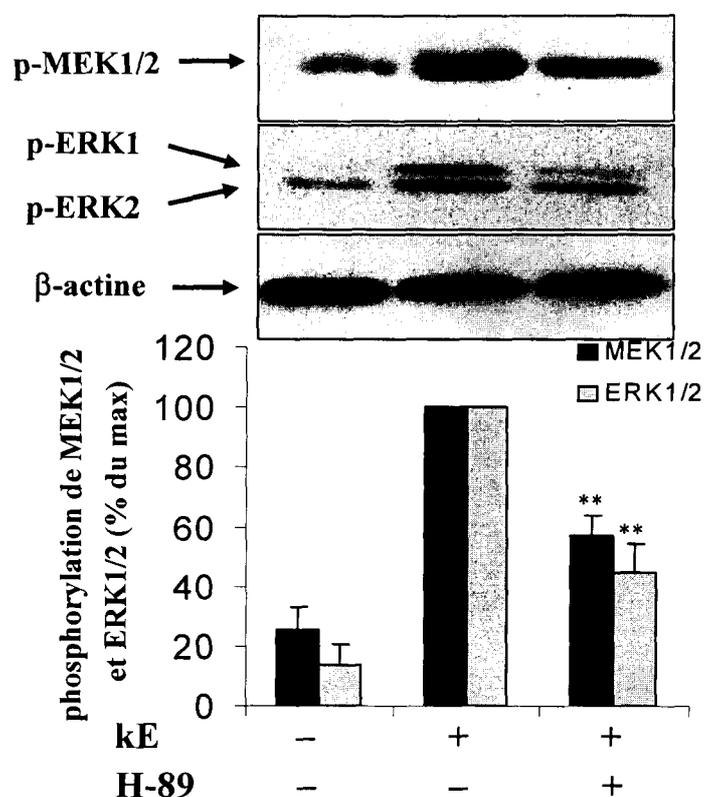


Figure 42 : Effet du H-89 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont préincubées pendant 1h avec 1 μ M de H-89, puis traitées avec de la kE (50 μ g/ml) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204) et anti-phospho-MEK1/2 (S217/S221). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée sous les blots sous forme de la moyenne \pm SEM et représente les rapports de densitométrie p-MEK1/2 / β -actine et p-ERK1/2 / β -actine. **, $p < 0,01$: significativement différent par rapport à kE seule.

L'inhibition des PKA par le H-89 induit une inhibition partielle de l'activation de MEK1/2 et de ERK1/2. L'inhibition obtenue est d'environ 50 % (43 % d'inhibition pour MEK1/2 et 55 % pour ERK1/2) suggérant que les voies dépendantes des kinases PKA et PI3K sont complémentaires et s'associent pour activer pleinement la voie ERK1/2.

II.2.3. Les voies PI3K et PKA sont additives

Afin de déterminer si les voies dépendantes de PKA et PI3K interviennent de manière additive lors de l'activation de MEK1/2 et ERK1/2, les fibroblastes ont été préincubés avec les deux inhibiteurs. L'effet conjoint du LY294002 et du H-89 a également été comparé à celui du lactose, dans le but d'évaluer l'importance des voies PI3K et PKA dans l'activation de la voie ERK1/2.

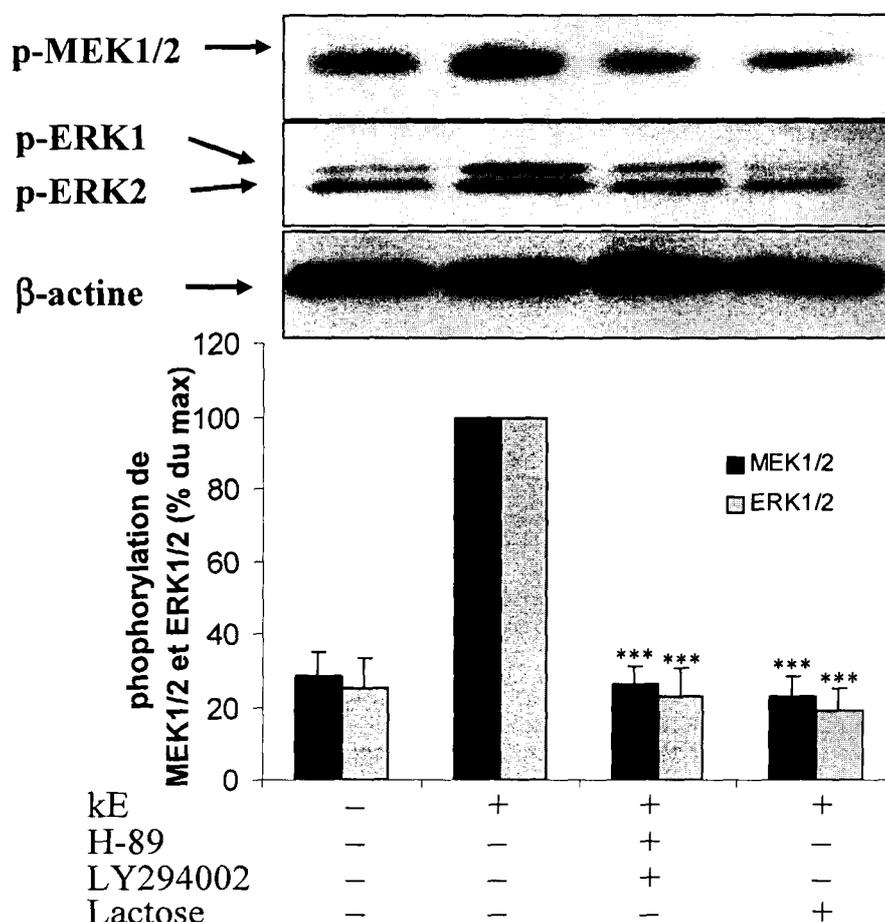


Figure 43 : Effet cumulatif du H-89 et du LY294002 sur l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont préincubées pendant 1h avec $1 \mu\text{M}$ de H-89 et $25 \mu\text{M}$ de LY 294002, ou pendant 3 h avec 1mM de lactose. Elles sont ensuite traitées avec de la kE ($50 \mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204) et anti-phospho-MEK1/2 (S217/S221). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée sous les blots sous forme de la moyenne \pm SEM et représente les rapports de densitométrie p-MEK1/2 / β -actine et p-ERK1/2 / β -actine. ***, $p < 0,001$: significativement différents par rapport à kE seule.

Les résultats obtenus démontrent que les voies PKA et PI3K s'associent effectivement pour activer ERK1/2. L'utilisation conjointe du H-89 et du LY294002 permet d'inhiber totalement l'activation de MEK1/2 et de ERK1/2. De plus, le niveau d'inhibition observé est identique à celui obtenu avec le lactose, démontrant que ces deux voies sont cruciales dans l'activation de la voie ERK1/2 par les peptides d'élastine liés à l'EBP.

II.3. La PI3K est responsable de l'activation de Raf-1

Raf-1 est l'activateur typique de MEK1/2 [Houslay et Kolch, 2000]. L'activation de Raf-1 nécessite sa phosphorylation sur différents sites, parmi lesquels la phosphorylation de la sérine 338 est l'événement majeur. En effet, la substitution de cet acide aminé en alanine bloque totalement l'activation de Raf-1 [Diaz et coll., 1997 ; Barnard et coll., 1998, Mason et coll., ; 1999].

Plusieurs auteurs ont suggéré que la phosphorylation de Raf-1 sur S338 pourrait être régulé par les PI3K [Chaudhary et coll., 2000 ; Sun et coll., 2000]. Pour ces raisons, nous avons examiné si la kE induit la phosphorylation de Raf-1 sur S338, et si ce processus est régulé par la PI3K.

II.3.1. *La kE induit la phosphorylation de Raf-1 sur S338.*

Les fibroblastes sont mis au repos pendant 18h puis sont stimulées avec de la kE. Les extraits cellulaires sont ensuite soumis à un western-blot et la phosphorylation de Raf-1 sur S338 est recherchée à l'aide d'un anticorps spécifique reconnaissant Raf-1 uniquement lorsqu'il est phosphorylé sur ce site.

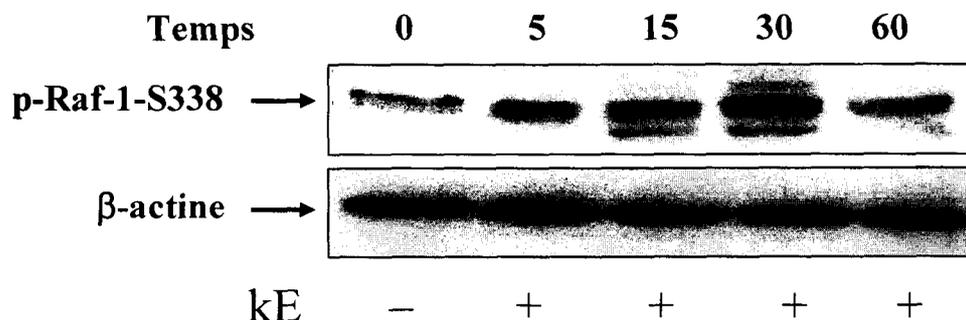


Figure 44 : Influence de la kE sur la phosphorylation de Raf-1 sur S338. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont traitées avec de la kE (50 $\mu\text{g/ml}$) pendant les temps indiqués. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-Raf-1 (S338). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. p-Raf-1-S338 : phospho-Raf-1 sur S338.

La stimulation des fibroblastes par la kE induit la phosphorylation de Raf-1 sur S338. La cinétique de phosphorylation observée est très similaire à celle mise en évidence pour MEK1/2 et ERK1/2 (Figure 39). Le maximum de phosphorylation est également observé après 30 min de stimulation mais contrairement à MEK1/2 et ERK1/2, la phosphorylation de la serine 338 de Raf-1 est moins soutenue dans le temps, et retourne quasiment à son taux basal après 60 min.

II.3.2. La phosphorylation de Raf-1 sur S338 est régulée par la PI3K

Afin d'étudier l'influence des PI3K sur la phosphorylation de S338, nous avons étudié l'effet du LY294002 à 30 min de stimulation, temps correspondant au maximum de phosphorylation de Raf-1.

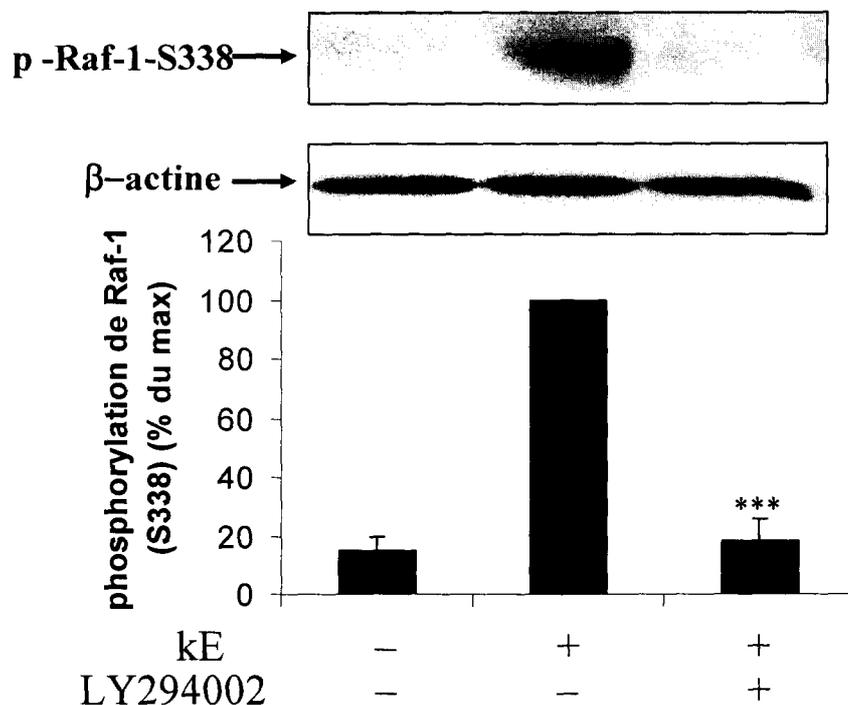


Figure 45 : Effet du LY294002 sur la phosphorylation de Raf-1 (S338) induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont préincubées pendant 1h avec $25 \mu\text{M}$ de LY294002, puis traitées avec de la kE ($50 \mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-Raf-1 (S338). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée sous les blots sous forme de la moyenne \pm SEM et représente les rapports de densitométrie p-Raf-1 / β -actine. ***, $p < 0,001$: significativement différents par rapport à kE seule.

L'inhibition de la PI3K permet de bloquer totalement la phosphorylation de Raf-1 induite par la kE, démontrant que cette enzyme est impliquée dans la phosphorylation de cette kinase. Cependant, si la phosphorylation de Raf-1 sur S338 est un événement crucial et essentiel pour son activation, une telle analyse ne suffit pas à démontrer qu'elle est activée [Mason et coll., 1999 ; Chiloèches et coll., 2001].

II.3.3. Raf-1 est activé par la kE de manière PI3K-dépendante

Afin d'étudier l'activité kinase de Raf-1, les cellules sont mises au repos, puis stimulées pendant 30 min avec de la kE (50 µg/mL). Les extraits cellulaires sont préparés puis Raf-1 est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-Raf-1. L'activité kinase de Raf-1 est alors étudiée en présence d'ATP[γ - 32 P], en utilisant MEK1 comme substrat.

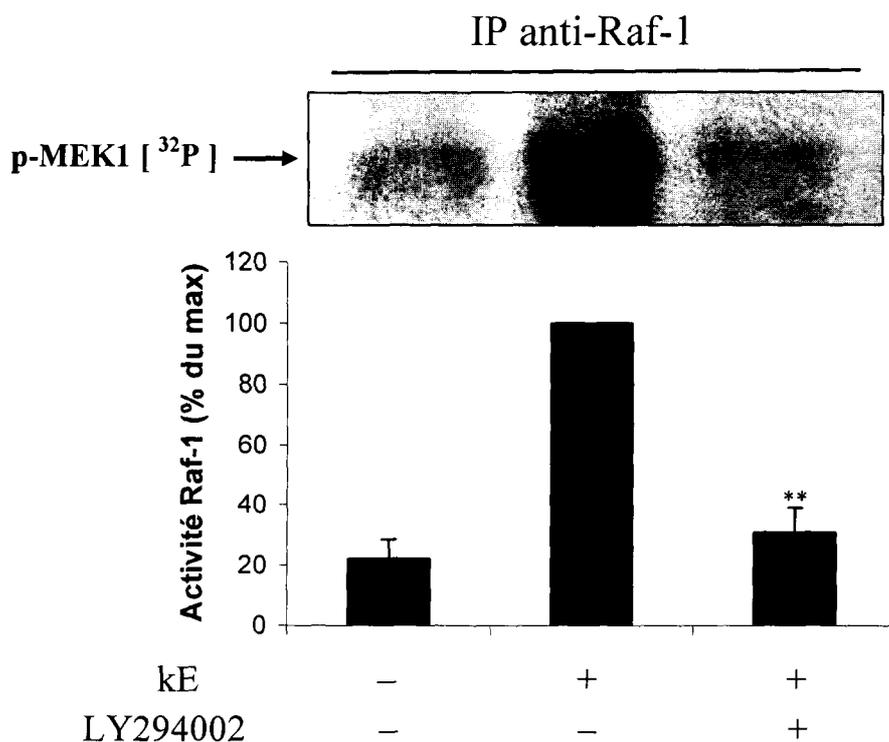


Figure 46 : Effet de la kE et du LY294002 sur l'activité kinase de Raf-1. Après la mise au repos, les cellules (8.10^6) sont préincubées pendant 1h avec 25 µM de LY294002, puis traitées avec de la kE (50 µg/ml) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et une quantité égale de protéines entre les différents essais est soumise à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-Raf-1. La réaction kinase est effectuée pendant 30 min en présence d'ATP[γ - 32 P], en utilisant MEK1 comme substrat. Les produits de la réaction sont ensuite séparés par SDS-PAGE, puis soumis à une autoradiographie. L'autoradiogramme montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée sous la figure sous forme de la moyenne \pm SEM. **, $p < 0,01$: significativement différent par rapport à kE seule. p-MEK1 [32 P]: MEK1 phosphorylée par du [32 P]; IP : immunoprécipitation.

Ces résultats démontrent que la kE active fortement Raf-1 (5 fois comparé au contrôle) et que cette kinase peut phosphoryler, donc activer, ses substrats physiologiques MEK. L'utilisation de LY294002 permet de bloquer totalement cette activation. Ceci met donc en

évidence que la phosphorylation de Raf-1 sur S338 ainsi que son activité kinase sont régulées par les peptides d'élastine de manière dépendante de la PI3K.

Cependant, l'isoforme de PI3K impliquée dans l'activation de Raf-1, et donc de la voie ERK1/2, est encore inconnue.

II.4. Les peptides d'élastine activent p110 γ , PI3K de classe I_B

Les PI3K de classe I_A et I_B peuvent participer à l'activation de la voie ERK1/2 dans divers types cellulaires [Mansat-De Mas et coll., 2003 ; Takeda et coll., 1999 ; King et coll., 1997].

La classe I_A est composée d'une sous-unité régulatrice de type p85 et d'une sous-unité catalytique de type p110 (α , β ou δ). Les isoformes α et β sont exprimées par les fibroblastes [Domin et coll., 1996 ; Roche et coll., 1998]. Au contraire, p110 γ , unique représentante de la classe I_B, est associée à une sous-unité régulatrice p101. La distribution tissulaire de p110 γ est beaucoup plus restreinte, et elle est principalement exprimée dans les leucocytes, les plaquettes et les cardiomyocytes [Wetzker et Rommel, 2004].

Son expression n'a jamais été décrite pour les fibroblastes.

Afin de déterminer quelle isoforme de PI3K est activée par la kE, nous avons mesuré l'activité des deux classes potentiellement impliquée dans l'activation de Raf-1. Pour cela, les cellules sont mises au repos, puis traitées avec de la kE pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et soumis à une immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-p85 pour évaluer l'activité catalytique de la classe I_A, ou un anticorps anti-p110 γ afin de déterminer celle de la classe I_B.

L'activité lipide kinase des PI3K est étudiée en présence d'ATP[γ -³²P], en utilisant du phosphatidylinositol (PI) comme substrat.

Concernant p110 γ , l'analyse de son expression par les fibroblastes dermiques a été réalisée par western-blot en utilisant le même anticorps que celui utilisé pour l'immunoprécipitation.

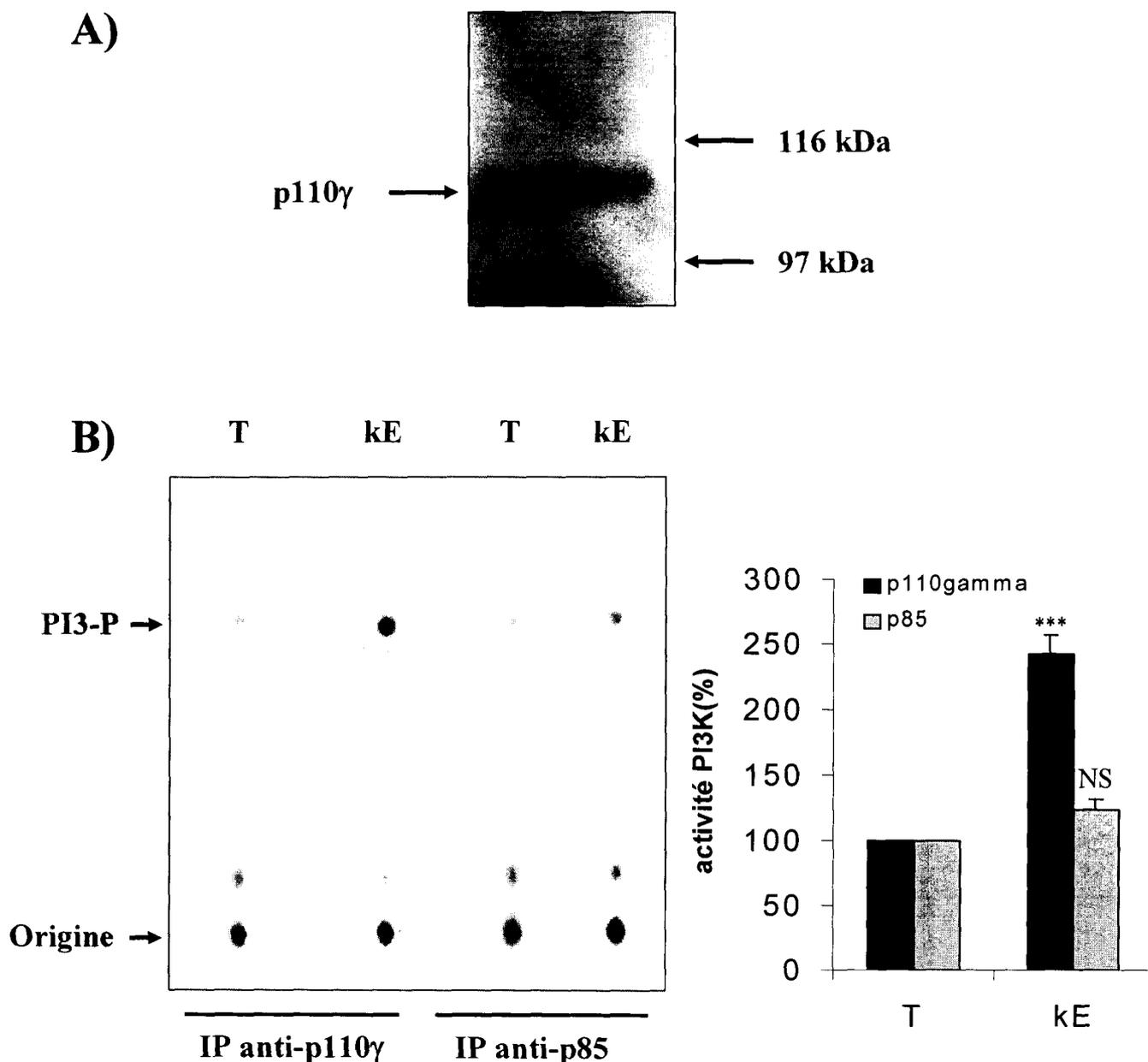


Figure 47: Effet de la kE sur l'activité des PI3K de classe I_A et I_B. A) Analyse par western-blot de l'expression de p110 γ par les fibroblastes dermiques. Le blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. B) les cellules (8.10^6) sont mises au repos puis stimulées pendant 30 min avec de la kE (50 μ g/ml). Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et une quantité égale de protéines entre les différents essais est soumise à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-p85 ou anti-p110 γ . La réaction kinase est effectuée pendant 15 min en présence d'ATP[γ - 32 P], en utilisant PI comme substrat. Les lipides sont ensuite extraits, séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) et la plaque est autoradiographiée. Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P) produit est identifié comme tel en comparant son Rf à celui d'un contrôle commercial. L'autoradiogramme montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée à côté de la figure sous forme de la moyenne \pm SEM. ***, $p < 0,001$: significativement différent par rapport au contrôle correspondant. NS : Non significatif. Origine : origine du dépôt sur la plaque de CCM.

Nos résultats montrent que la PI3K de classe I_B p110 γ est exprimée par les fibroblastes dermiques humains. Ceci représente à notre connaissance la première démonstration de sa présence dans de telles cellules. De plus, l'analyse des activités lipide kinases de deux sous-classes démontre que la kE induit une forte activation de p110 γ (150 % d'augmentation comparativement au contrôle), tandis que les isoformes de classe I_A associées aux sous-unités régulatrices p85 ne sont pas activées.

II.5. p110 γ est activée par les sous-unités $\beta\gamma$ dérivées d'une protéine G hétérotrimérique sensible à la toxine pertussique.

II.5.1. p110 γ est activée par une protéine G sensible à la toxine pertussique

Plusieurs études ont suggéré qu'une des cibles du complexe récepteur de l'élastine est une protéine G hétérotrimérique sensible à la toxine pertussique [Varga et coll., 1989 ; Brassart et coll., 2001]. Malgré le fait que la signalisation induite par les peptides d'élastine semble différer en fonction du type cellulaire, l'activation d'une telle protéine paraît être un point commun. La toxine pertussique (PTX) est une toxine bactérienne dérivée de *Bordetella pertussis*. Cette molécule catalyse l'ADP-ribosylation NAD⁺-dépendante d'un résidu cystéyl en position -4 de l'acide aminé C-terminal des sous-unités α des protéines G_{i1,2,3}, G₀ et G_t de la famille G_i. La réaction catalysée par la PTX bloque le couplage entre la protéine G et le récepteur, empêchant par conséquent l'activation de la protéine G et donc sa dissociation [Fields et Casey, 1997].

G_t n'étant exprimée que dans la rétine, cette toxine constitue donc un outil de choix de l'étude du rôle d'une protéine G du type G₀/G_i dans nos cellules.

L'activation de la voie ERK1/2 par p110 γ peut mettre en jeu des protéines G sensibles à la toxine pertussique, qui agissent en activant cette PI3K [Takeda et coll., 1999 ; Yart et coll., 2002].

Afin d'étudier l'influence du blocage des protéines G₀/G₁ dans l'activation de p110 γ , les fibroblastes ont été incubés avec de la PTX pendant la mise au repos. Ensuite, les cellules ont été stimulées par de la kE puis soumises à un test d'activité p110 γ , de la manière précédemment décrite.

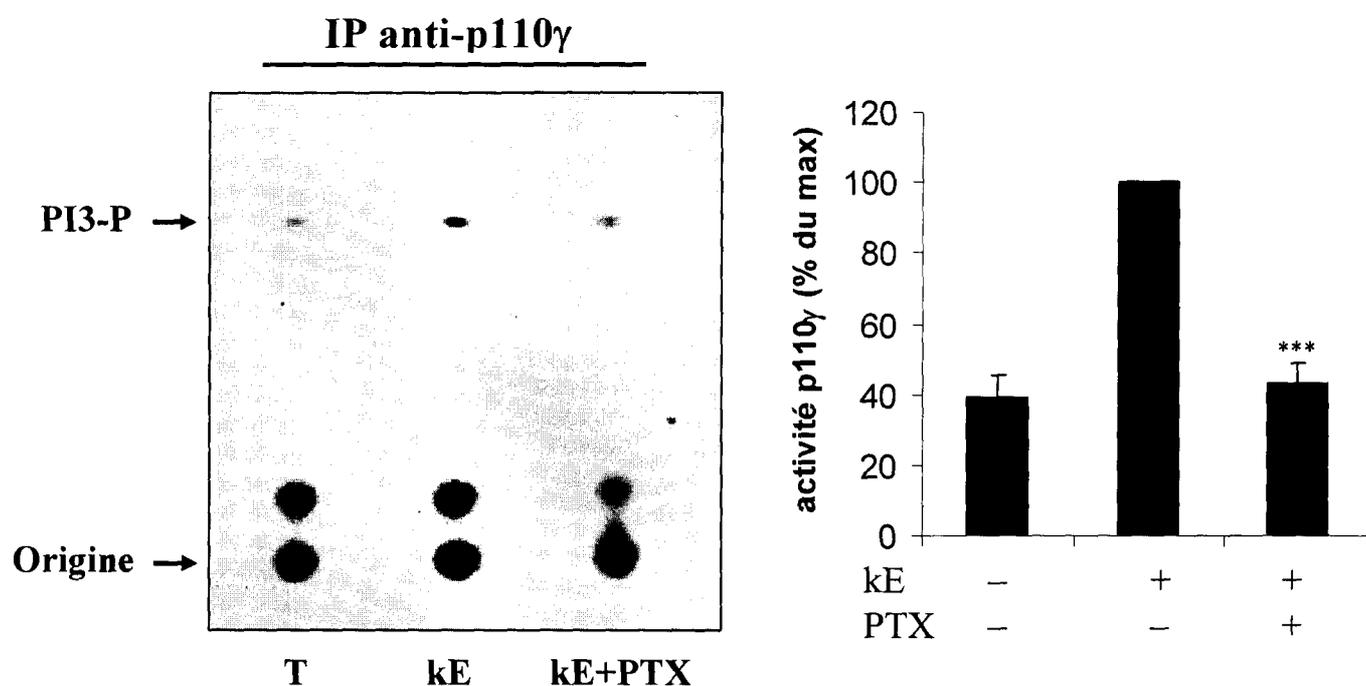


Figure 48 : Effet de la PTX sur l'activité p110 γ stimulée par la kE. Les cellules (8.10^6) sont mises au repos en présence de PTX (100 ng/mL) puis stimulées pendant 30 min avec de la kE (50 μ g/ml). Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et une quantité égale de protéines entre les différents essais est soumise à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-p110 γ . La réaction kinase est effectuée pendant 15 min en présence d'ATP[γ - 32 P], en utilisant PI comme substrat. Les lipides sont ensuite extraits, séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) et la plaque est autoradiographiée. Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P) produit est identifié comme tel en comparant son Rf à celui d'un contrôle commercial. L'autoradiogramme montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée à côté de la figure sous forme de la moyenne \pm SEM. ***, $p < 0,001$: significativement différent par rapport à kE seule.

En accord avec nos précédent résultats, la kE induit fortement l'activité de la p110 γ . La toxine pertussique permet d'inhiber totalement l'activité p110 γ induite par la kE. Ceci démontre qu'une protéine G sensible à cette toxine est impliquée dans l'activation de cette PI3K et, par conséquent, dans la signalisation induite par la kE dans les fibroblastes.

Nos résultats ont montré que Raf-1 est activée de manière dépendante de PI3K. L'isoforme de PI3K activée est p110 γ , elle même régulée par une protéine G sensible à la PTX. Par conséquent, si p110 γ participe à l'activation de la voie ERK1/2, l'utilisation de PTX devrait inhiber la phosphorylation de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2 d'une manière comparable à celle du LY294002.

II.5.2. La PTX inhibe la phosphorylation de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2

Les cellules sont mises au repos en présence de PTX, puis stimulées par de la kE pendant 30 min. La présence de formes phosphorylées de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2 est alors analysée par western-blot.

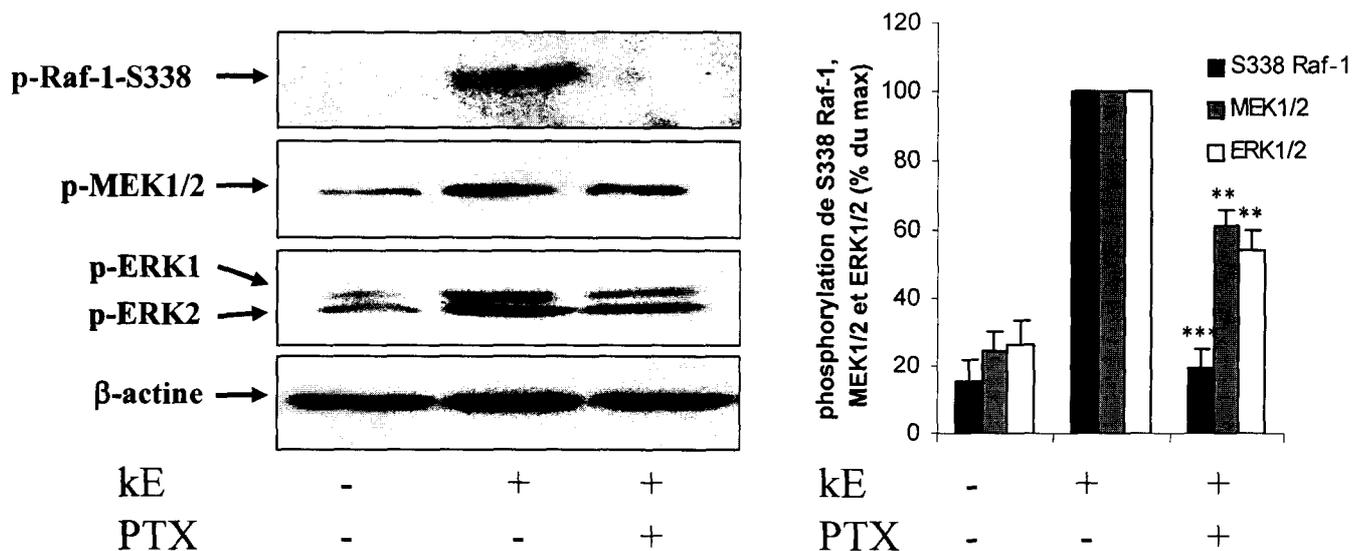


Figure 49 : Effet de la PTX sur la phosphorylation de Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2. Les cellules (1.10^6) sont mises au repos en présence de PTX (100 ng/mL), puis traitées avec de la kE (50 μ g/ml) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204), anti-phospho-MEK1/2 (S217/S221) et anti-Raf-1 (S338). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée à côté des blots sous forme de la moyenne \pm SEM et représente les rapports de densitométrie p-MEK1/2 / β -actine, p-ERK1/2 / β -actine et p-Raf-1 / β -actine. **, $p < 0,01$ et ***, $p < 0,001$: significativement différents par rapport à kE seule.

La préincubation des cellules avec de la PTX bloque totalement la phosphorylation de Raf-1 sur S338, mais partiellement l'activation de MEK1/2 et ERK1/2. De tels résultats sont tout à fait cohérents avec les données précédemment obtenues avec l'inhibiteur de PI3K, le LY294002 (Figures 41 et 45), à savoir que l'inhibition des PI3K bloque totalement la phosphorylation de Raf-1 sur S338 mais partiellement le reste de la voie ERK1/2.

Ces résultats démontrent qu'une protéine G sensible à la PTX du type G_0/G_i est activée par les peptides d'élastine et que celle-ci est impliquée dans l'activation de p110 γ . Cette PI3K peut ainsi induire la voie ERK1/2 par l'activation de Raf-1.

II.5.3. p110 γ est activée par les sous-unités $\beta\gamma$ dérivées de la protéine G

Initialement, quand p110 γ fut clonée, il a été montré que son activité pouvait être régulée par α et par $\beta\gamma$ [Stoyanov, 1995]. Cependant, des études *in vivo* plus récentes ont mis en avant le rôle de $\beta\gamma$ dans la régulation de son activité [Lopez-Illasaca et coll. 1997 ; Stephens et coll., 1997]. Brock et coll. [2003] ont très récemment montré que les hétérodimères $\beta\gamma$ activent p110 γ par interaction directe avec la sous-unité catalytique, après avoir permis le recrutement membranaire de l'enzyme par interaction avec p101, sa sous-unité régulatrice.

Nous avons donc analysé le rôle des hétérodimères $\beta\gamma$ dans l'activation de p110 γ par la kE, afin d'étudier si ce mécanisme de régulation existe également dans les fibroblastes.

Pour réaliser cette étude, les fibroblastes dermiques ont été transfectés de manière transitoire avec un plasmide (pRK5- β ARK1-CT) codant pour le fragment G495-L689 correspondant à la partie C-terminale de la *β -adrenergic receptor kinase 1* (β ARK1). β ARK1 est une Ser/Thr kinase de la famille GRK (*G-protein-coupled receptor kinases*) qui est activée par liaison de sous-unités $\beta\gamma$ à son domaine C-terminal. Une fois activée, elle phosphoryle le RCPG responsable de l'activation de la protéine G et permet son internalisation par les β -arrestines et AP-2 [Iacovelli et coll., 1999 ; Ferguson, 2001].

pRK5- β ARK1-CT exprimant le domaine d'interaction $\beta\gamma$ - β ARK1, permet ainsi de détourner $\beta\gamma$ de ses cibles physiologiques et de déterminer sa participation dans un processus biologique. Ce fragment agit comme un "scavenger" d'hétérodimères $\beta\gamma$ [Koch et coll., 1994].

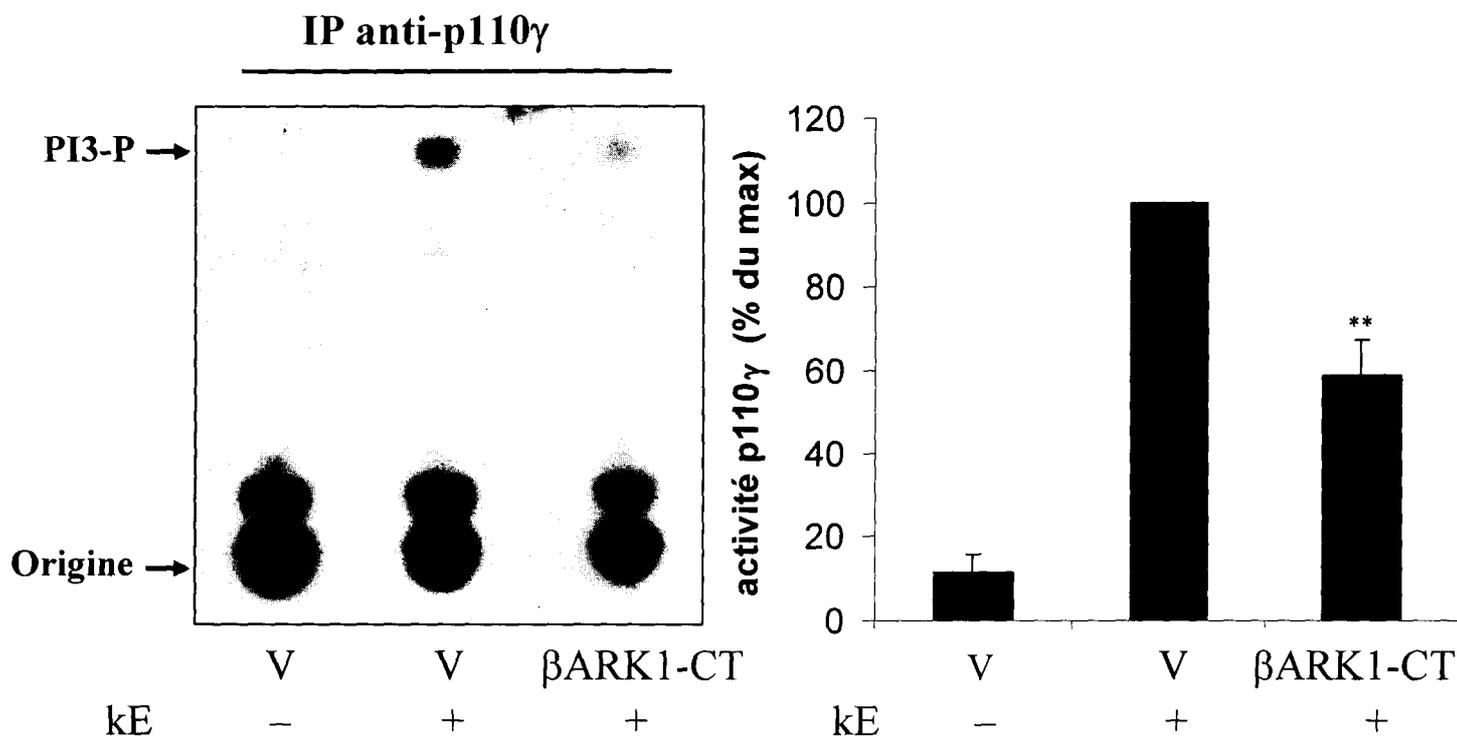


Figure 50 : Effet du peptide β ARK1-CT sur l'activité p110 γ stimulée par la kE. Les cellules (8.10^6) sont cotransfectées avec pRK5- β ARK1-CT (ou un vecteur vide) et pEGFP-C1, ce dernier servant à vérifier l'efficacité de la transfection. Les cellules sont ensuite mises au repos puis stimulées pendant 30 min avec de la kE (50 μ g/ml). Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et une quantité égale de protéines entre les différents essais est soumise à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-p110 γ . La réaction kinase est effectuée pendant 15 min en présence d'ATP [γ - 32 P], en utilisant PI comme substrat. Les lipides sont ensuite extraits, séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) et la plaque est autoradiographiée. Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P) produit est identifié comme tel en comparant son Rf à celui d'un contrôle commercial. L'autoradiogramme montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée à côté de la figure sous forme de la moyenne \pm SEM. **, $p < 0,01$: significativement différent par rapport kE seule. V : fibroblastes transfectés avec un vecteur vide ; β ARK1-CT : fibroblastes transfectés avec pRK5- β ARK1-CT.

Les fibroblastes transfectés avec un vecteur vide répondent parfaitement à la stimulation par la kE. p110 γ est fortement activée par les peptides d'élastine après 30 min de stimulation. En revanche, l'activité de p110 γ observée dans les cellules transfectées avec pRK5- β ARK1-CT est réduite de manière significative démontrant que cette PI3K est activée par $\beta\gamma$.

Il est important de souligner que le niveau d'inhibition observé ne reflète que l'inhibition obtenue dans les fibroblastes transfectés. En effet, seulement 30 à 40 % des cellules sont transfectées en conditions optimales et seules ces cellules expriment β ARK1-CT.

L'ensemble de nos résultats suggèrent fortement que la PI3K activée par les peptides d'élastine est la PI3K de classe I_B p110 γ , elle même activée par l'hétérodimère $\beta\gamma$ dérivé d'une protéine G de type G_i ou G₀.

p110 γ participe à l'activation de la voie ERK1/2 en régulant la phosphorylation de Raf-1 sur S338, ce qui permet son activation.

La voie PI3K-dépendante participant à l'activation de la cascade Raf-1 / MEK1/2 ERK1/2 a été mise à jour. Cependant, le mécanisme par lequel le signal provenant de PKA est intégré à l'activation de cette voie MAPK n'a pour l'instant pas été révélé.

II.6. B-Raf est exprimé par les fibroblastes dermiques humains et activé par la kE via un mécanisme PKA-dépendant

B-Raf est l'isoforme de la famille Raf qui est décrite comme étant l'activateur le plus puissant de MEK1/2. Son profil d'expression tissulaire est beaucoup plus restreint que celui de Raf-1 et, bien qu'il ait été détecté dans les fibroblastes embryonnaires de souris, son expression n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée pour les fibroblastes dermiques humains [Hagemann et Rapp, 1999 ; Mercer et Pritchard, 2003 ; Huser et coll., 2001].

B-Raf a la capacité d'être activée par des éléments dépendants de l'AMPc, Epac ou PKA [Houslay et Koch, 2000]. C'est une protéine qui peut être exprimée sous forme de

nombreux variants d'épissage, dont la taille s'échelonne entre 67 et 99 kDa, mais qui possède deux isoformes majeures de 68 et 95 kDa.

L'activation de B-Raf met en jeu la phosphorylation de T598 et S601 [Zhang et Guan, 2000]. Cependant, il n'existe pas d'anticorps spécifiques reconnaissant ces sites permettant de nous renseigner sur une possibilité d'activation de B-Raf par les peptides d'élastine.

De plus, la famille Raf-1 possède de très nombreux sites de phosphorylation sur sérine et thréonine dont certains sont impliqués dans la régulation négative de leur activité. Pour cette raison, nous n'avons pas étudié l'état de phosphorylation général de B-Raf à l'aide d'anticorps anti-phospho-sérine ou thréonine, mais avons décidé d'étudier directement son activité kinasique, après avoir vérifié qu'il était exprimé par nos cellules.

L'activation de MEK1/2 et ERK1/2 par les peptides d'élastine met en jeu une PKA. Dans le but d'étudier si B-Raf est activée de manière PKA-dépendante, son activité a également été étudiée en présence de H-89.

Pour étudier l'activité B-Raf, les cellules sont mises au repos puis sont stimulées avec de la kE pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite préparés puis soumis à une immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-B-Raf. L'activité kinasique de B-Raf est ensuite analysée en présence d'ATP [γ - 32 P] et de MEK1, substrat physiologique de B-Raf.

L'analyse de l'expression de B-Raf par les fibroblastes dermiques est quant à elle réalisée par western-blot en utilisant le même anticorps que celui utilisé pour l'immunoprécipitation.

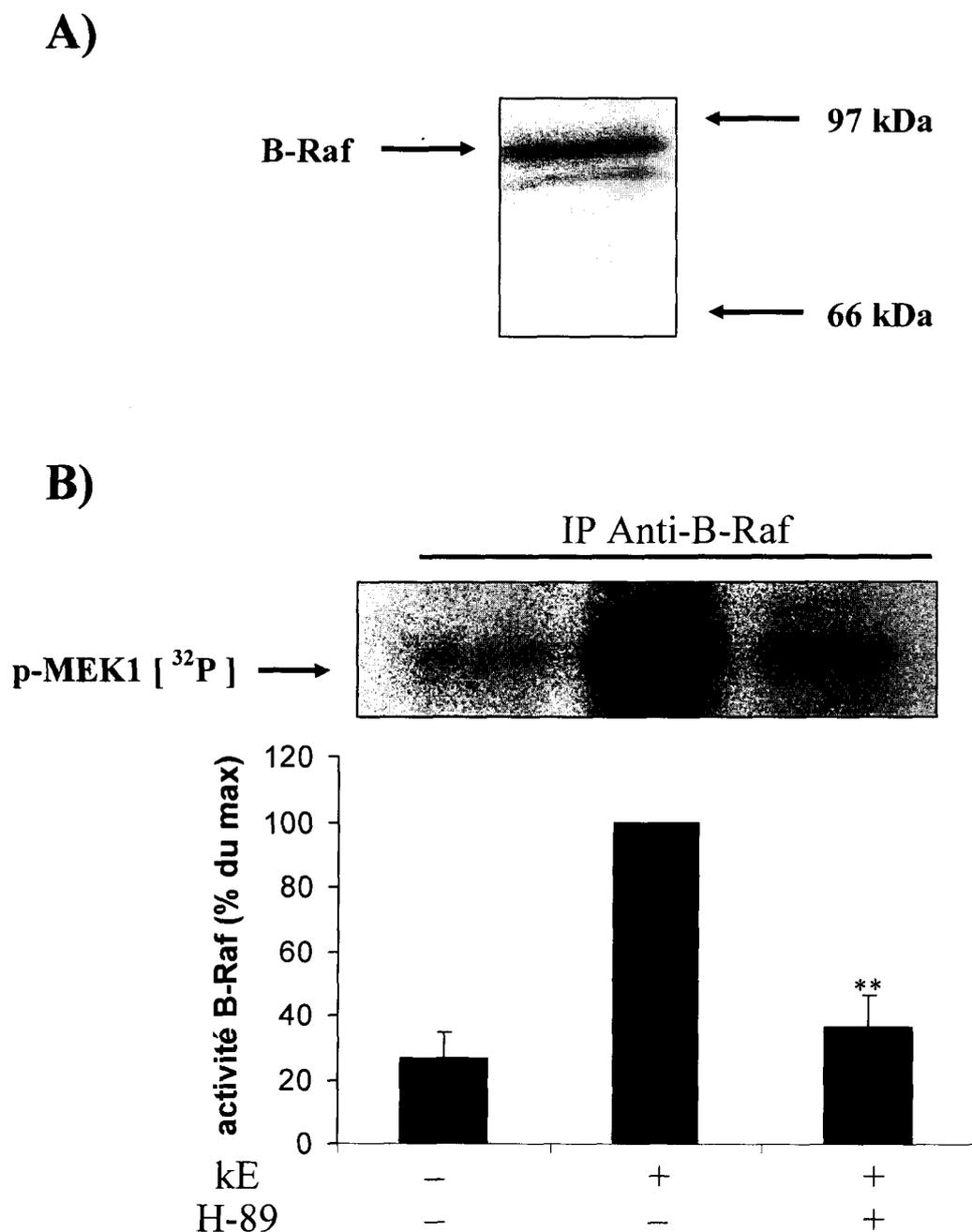


Figure 51 : Effet de la kE et du H-89 sur l'activité kinase de B-Raf. A) Analyse par western-blot de l'expression de B-Raf par les fibroblastes dermiques. B) Après la mise au repos, les cellules ($8 \cdot 10^6$) sont préincubées pendant 1h avec $1 \mu\text{M}$ de H-89, puis traitées avec de la kE ($50 \mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite préparés, et une quantité égale de protéines entre les différents essais est soumise à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-B-Raf. La réaction kinase est effectuée pendant 30 min en présence d'ATP[γ - ^{32}P], en utilisant MEK1 comme substrat. Les produits de la réaction sont ensuite séparés par SDS-PAGE puis soumis à une autoradiographie. L'autoradiogramme montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée sous la figure sous forme de la moyenne \pm SEM. **, $p < 0,01$: significativement différent par rapport à kE seule. p-MEK1 [^{32}P] : MEK1 phosphorylée par du [^{32}P]; IP : immunoprécipitation.

L'analyse de l'expression de B-Raf par les fibroblastes dermiques démontre que cette isoforme de Raf est présente dans nos cellules. L'isoforme majeure de 95 kDa est exprimée tandis que celle de 68 kDa ne semble pas l'être. La bande détectée en dessous de la forme de 95 kDa doit correspondre à un autre variant d'épissage. Ceci représente à notre connaissance la première démonstration de l'existence de B-Raf dans les fibroblastes dermiques.

L'étude de l'activité de B-Raf permet de mettre en évidence que celle-ci est faible mais présente en conditions basales. La stimulation des cellules avec de la kE induit une forte augmentation de son activité (5 fois comparativement au témoin). L'utilisation de H-89 permet d'inhiber totalement l'activation de B-Raf, démontrant que celle-ci est PKA dépendante.

B-Raf est donc exprimé par les fibroblastes dermiques et son activité mesurée envers un de ses substrats physiologiques, MEK1, est fortement augmentée par la kE. Le signal AMPc/PKA induit par les peptides d'élastine est donc intégré à l'activation de MEK1/2 / ERK1/2 par B-Raf.

II.7. Le mécanisme d'activation de la voie ERK1/2 par la kE est indépendant de Ras

La petite protéine G Ras est un activateur majeur de la voie ERK1/2. Les petites protéines G sont des protéines possédant une masse moléculaire comprise entre 20-30 kDa. Ce sont des protéines qui sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP mais actives quand elles sont associées à du GTP. Sous cette forme, elles s'associent à leurs effecteurs et modulent ainsi leur activité. L'échange du GDP par du GTP est le facteur limitant de l'activation des petites protéines G. Spontanément, celle-ci est très lente et est stimulée par des *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs ou facteur d'échange de nucléotides guanyliques). Le passage de la forme active à la forme inactive est effectuée par l'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la petite protéine G, régulée par des protéines appelées GAP (*GTPase-Activating Protein*) [Matozaki et coll., 2000].

Ras a la particularité de pouvoir activer Raf-1, B-Raf et p110 γ [Mercer et Pritchard, 2003 ; Suire et coll., 2002] qui sont toutes des protéines impliquées dans l'activation de la voie ERK1/2 par les peptides d'élastine.

Afin d'évaluer le rôle potentiel de Ras dans l'activation de la voie ERK1/2 par la kE, nous avons transfecté nos cellules avec un mutant dominant négatif de Ras appelé RasN17. Chez ce mutant, la sérine en position 17 est mutée en asparagine ce qui bloque la signalisation dépendante de Ras en inhibant les Ras-GEFs [Bustelo et coll., 1994].

Afin de nous affranchir du faible taux de transfection que l'on peut obtenir avec les fibroblastes dermiques et qui pourrait rendre les résultats plus difficiles à obtenir et à interpréter, les cellules sont cotransfectées avec pSV₂-RasN17 (codant pour RasN17) et pECE-HA-ERK1, codant pour ERK1 couplée à un tag hémagglutinine (HA).

En se basant sur l'hypothèse de la cotransfection (à savoir que les deux plasmides peuvent entrer ensemble dans la même cellule), et après stimulation des cellules avec de la kE puis immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA, nous n'observerons alors les effets du mutant que sur ERK1-HA. Ceci nous permet alors d'étudier l'effet du blocage de Ras uniquement dans les cellules transfectées.

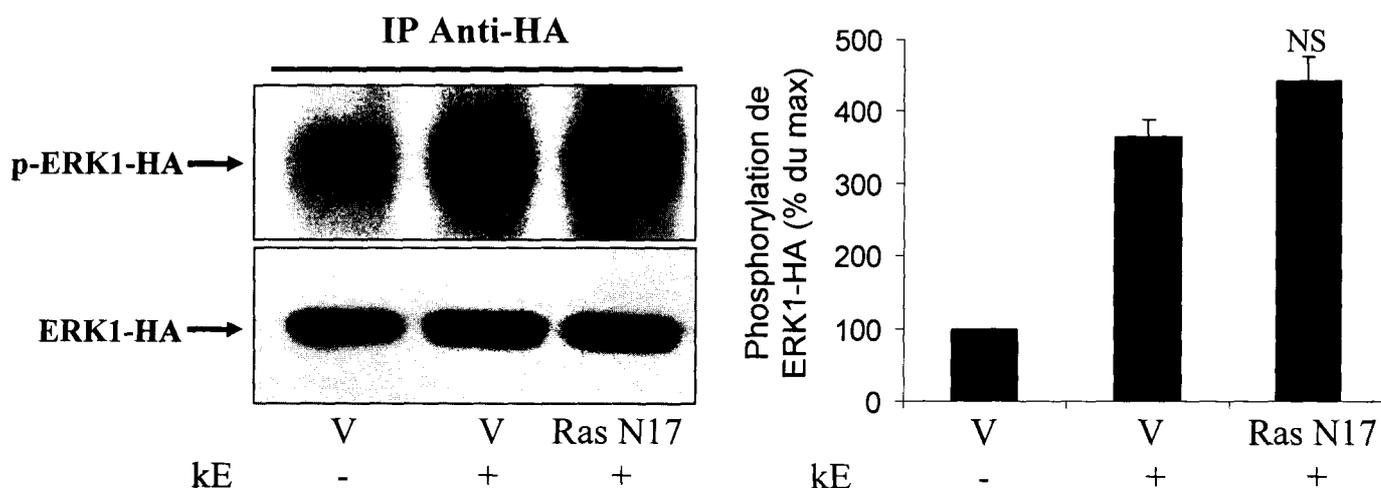


Figure 52 : Effet de RasN17 sur l'activation de ERK1-HA. Les cellules (1.10^6) sont cotransfectées avec pSV₂-RasN17 (ou un vecteur vide) et pECE-HA-ERK1 et pEGFP-C1, ce dernier servant à vérifier l'efficacité de la transfection. Les cellules sont ensuite mises au repos puis stimulées pendant 30 min avec de la kE (50 µg/ml). Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et une quantité égale de protéines entre les différents essais est soumise à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA. La présence de formes phosphorylées de ERK1-HA est analysée par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti-ERK1/2 afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est montrée à côté des blots sous forme de la moyenne±SEM et représente les rapports p-ERK1-HA / ERK1-HA. NS : non significatif par rapport à kE. IP : immunoprécipitation ; p-ERK1-HA : ERK1-HA phosphorylée sur T202 et Y204.

En accord avec nos précédents résultats, la kE induit la phosphorylation et donc l'activation de ERK1. Les fibroblastes transfectés avec un vecteur vide répondent parfaitement à une stimulation par la kE. L'utilisation du mutant dominant négatif RasN17 ne bloque pas l'activation de ERK1 induite par la kE. Au contraire, une légère augmentation de la phosphorylation de ERK1, mais non significative, est observée.

Ras n'est donc pas impliqué dans l'activation de la voie ERK1/2 induite par la kE.

En conclusion, les fibroblastes dermiques expriment la PI3K de classe I_B p110 γ ainsi que B-Raf. Comme nous l'avons décrit dans la première partie de notre étude, la production de pro-MMP-1 par les peptides d'élastine implique les voies PI3K, PKA et ERK1/2.

Nous savons maintenant que les voies PI3K et PKA s'associent pour induire pleinement l'activation de ERK1/2 par un mécanisme indépendant de Ras faisant intervenir deux voies en parallèle, AMPc / PKA / B-Raf / MEK1/2 et protéine G de type G₀/G_i / p110 γ / Raf-1 / MEK1/2.

A notre connaissance, un tel mécanisme d'activation de ERK1/2 n'avait jamais été décrit et présente un nouveau type de régulation de la production de pro-MMP-1. Ce travail présente de nouvelles données concernant les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine. Il identifie de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pouvant se révéler utiles dans des stratégies visant à limiter la contribution de la dégradation de l'élastine au développement tumoral.

2^{ème} partie

*Etude préliminaire du mécanisme de
fonctionnement du complexe récepteur de
l'élastine : importance des radeaux lipidiques
et de la neuraminidase*

Bien qu'une partie des voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine ait été caractérisée dans le présent travail, son mécanisme de transduction membranaire reste totalement inconnu. Aucune donnée concernant son fonctionnement n'est à l'heure actuelle disponible. Cependant, son origine commune avec le complexe de dégradation intralysosomal composé d'une β -galactosidase, de la protéine protectrice et de la neuraminidase Neu-1 va pouvoir nous apporter des renseignements précieux.

I. Evaluation bioinformatique du rôle potentiel de l'interaction Neu-1 – effecteurs de signalisation dans la transduction du signal du récepteur de l'élastine

Des trois protéines constituant le complexe récepteur de l'élastine, la neuraminidase est la seule protéine transmembranaire. Cette neuraminidase est la neuraminidase Neu-1, également trouvée dans les lysosomes [Malvagia et coll., 2004].

Nous avons donc naturellement envisagé son rôle potentiel de transducteur de signal.

Pour cette étude nous avons recherché si la séquence de Neu-1 possède des similitudes avec des récepteurs connus, et dans une seconde étape, si Neu-1 contient des motifs, domaines ou séquences consensus d'interaction avec des effecteurs de signalisation.

I.1. Recherche de similitudes entre Neu-1 et des récepteurs de signalisation

Pour effectuer cette étude, un alignement de la séquence protéique de Neu-1 (*accession number* Q99519) avec les protéines contenues dans la base de données de la Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/>) a été réalisé en utilisant Blast, algorithme de recherche de similitudes (<http://www.expasy.org/tools/blast/>). Cet alignement a également été réalisé en faisant varier les divers paramètres de Blast et a fourni des résultats identiques.

Db	AC	Description	Score	E-value
<input type="checkbox"/>	sp	Q99519	NER1_HUMAN Sialidase 1 precursor (EC 3.2.1.18) (Lysoso...	819 0.0
<input type="checkbox"/>	tn	AAP35870	Sialidase 1 (Lysosomal sialidase) [Homo sapiens (Hum...	819 0.0
<input type="checkbox"/>	tn	CAG32998	NEU1 protein [NEU1] [Homo sapiens (Human)]	815 0.0
<input type="checkbox"/>	tn	AAT11276	Neurominidase (Fragment) [NEU1] [Homo sapiens (Human)]	223 3e-58
<input type="checkbox"/>	tn	AAT11275	Neuraminidase (Fragment) [NEU1] [Homo sapiens (Human)]	213 3e-55
<input type="checkbox"/>	sp	Q9UQ49	NER3_HUMAN Sialidase 3 (EC 3.2.1.18) (Membrane sialida...	67 4e-11
<input type="checkbox"/>	sp	Q8UWR8	NER4_HUMAN Sialidase 4 (EC 3.2.1.18) (N-acetyl-alpha-n...	67 6e-11
<input type="checkbox"/>	sp	Q9Y3R4	NER2_HUMAN Sialidase 2 (EC 3.2.1.18) (Cytosolic sialid...	60 4e-09
<input type="checkbox"/>	tn	AAH69151	Sialidase 2 [NEU2] [Homo sapiens (Human)]	60 4e-09
<input type="checkbox"/>	tn	AAT11277	Neurominidase (Fragment) [NEU1] [Homo sapiens (Human)]	46 8e-05
<input type="checkbox"/>	sp	O75094	SLT3_HUMAN Slit homolog 3 protein precursor (Slit-3) (...	30 6.0
<input type="checkbox"/>	sp_vs	O75094-2	Splice isoform 2 of O75094 [SLIT3] [Homo sapiens ...	30 6.0
<input type="checkbox"/>	sp_vs	O75094-3	Splice isoform 3 of O75094 [SLIT3] [Homo sapiens ...	30 6.0

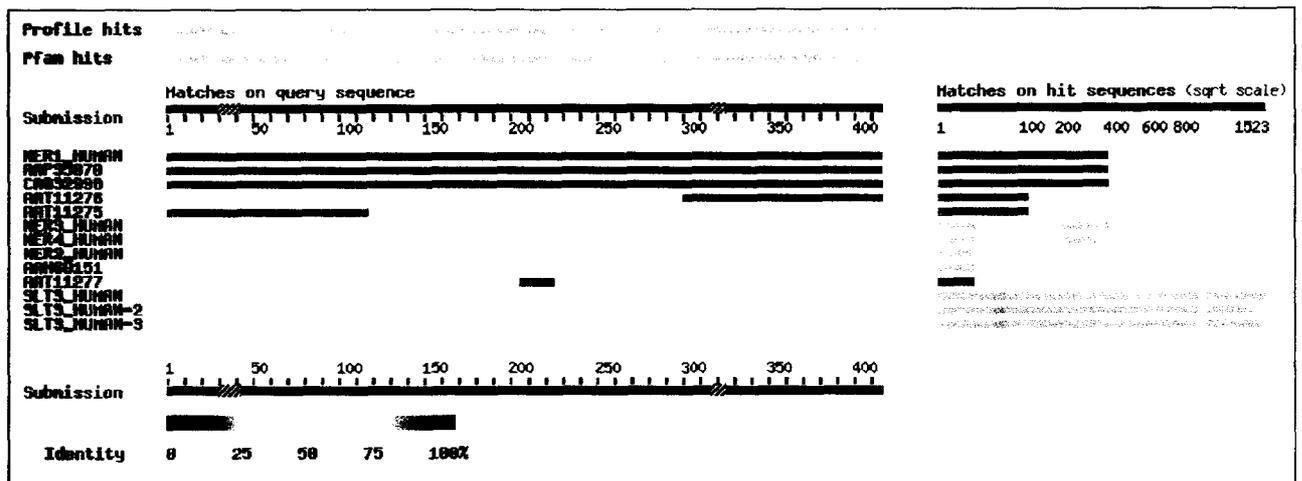


Figure 53 : Recherche de similitudes entre la séquence de Neu-1 et les protéines recensées au sein de la SWISS-PROT (analyse effectuée le 22/06/04). La partie supérieure du document donne les noms des protéines détectées par BLAST présentant des homologues avec la séquence de Neu-1. La partie inférieure est une représentation graphique de l'alignement effectué, et le pourcentage d'homologie obtenu est indiqué par l'échelle de couleurs Identity.

L'étude permet de mettre de évidence que Neu-1 ne possède *a priori* d'homologie qu'avec d'autres neuraminidases. Elle possède également une très faible homologie avec Slit-3, une protéine sécrétée pouvant être impliquée dans l'orientation de la migration cellulaire.

Il apparaît donc ici que Neu-1 ne possède pas d'homologie avec un récepteur impliqué dans la signalisation cellulaire.

I.2. Recherche de motifs, domaines ou sites consensus connus

Afin d'étudier plus précisément la possibilité d'interaction entre Neu-1 et un effecteur de signalisation dans la transduction membranaire du récepteur de l'élastine, nous avons recherché l'existence potentielle au sein de Neu-1, de domaines, motifs ou sites consensus connus. Pour réaliser cette étude, nous avons comparé sa séquence à la base de données de domaines Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>) et utilisé la fonction *Feature Aligner* de l'entrée Neu-1 (Q99519) de la Swiss-Prot recensant les domaines identifiés au sein d'une séquence protéique.

ASN GLYCOSYLATION : sites potentiels de N-glycosylation

186 - 189 NLSL
343 - 346 NLTL
352 - 355 NGTS

SULFATION : site potentiel de sulfatation de tyrosine

261 - 275 npdecqpYelpdgsV

cAMP PHOSPHO SITE : sites potentiels de phosphorylation par PKA et PKG

97 - 100 RKmS
357 - 360 RkeT

MYRISTYL : sites potentiels de N-myristoylation

72 - 77 GSvdTF
88 - 93 GTIIAF
136 - 141 GLnIGA
140 - 145 GAvvSD
163 - 168 GCqvAS
178 - 183 GVswST
243 - 248 GSgvSG
248 - 253 GipyGQ
321 - 326 GAvvTS
378 - 383 GSmdGE

PKC PHOSPHO SITE : site potentiel de phosphorylation par PKC

67 - 69 SgR
76 - 78 TFR
85 - 87 TpR
183 - 185 TpR
239 - 241 SwR
301 - 303 TIR
345 - 347 TIR
355 - 357 SwR

CK2 PHOSPHO SITE : site potentiel de phosphorylation par la Caséine kinase II

45 - 48 SkaE
100 - 103 SssD
101 - 104 SsdE
144 - 147 SdvE
174 - 177 SkdD

Domaines BNR : Bacterial Neuraminidase Repeat (ou Asp-Boxes)

112-123 RRSMDQGSTW SP BNR 1
172-183 VWSKDDGVSWS ST BNR 2
231-242 LLSDDHGASW RY BNR 3
347-358 RWSFNGTWSW RK BNR 4

FRIP motif : 77-80 FRIP

Internalization signal : Site de fixation pour AP2

412-415 YGTL

Figure 54 : Recherche de motifs, domaines et séquences consensus potentiels au sein de la séquence protéique de Neu-1 avec Prosite et la fonction Feature Aligner de l'entrée Neu-1 (Q99519) de la Swiss-Prot (analyse du 22/06/04).

L'analyse bioinformatique a permis de mettre en évidence de nombreux sites potentiels de modifications post-traductionnels. Néanmoins, il faut bien entendu garder à l'esprit que Prosite ne détecte que des sites potentiels qui peuvent ne pas avoir de réalité biologique. Les domaines BNR détectés sont des domaines de huit acides aminés répétés de deux à cinq fois dans tous les membres de la superfamille des neuraminidases à l'exception des neuraminidases virales [Bonten et coll., 2000]. Le motif FRIP est une séquence caractéristique et conservée dans la plupart des neuraminidases bactériennes et des mammifères. Le site ⁴¹²YGTL⁴¹⁵, trouvé dans la partie intracellulaire de Neu-1 correspond à un site de fixation pour AP2 [Lukong et coll., 2001b], complexe protéique impliqué dans l'internalisation de récepteurs couplés aux protéines G. Cependant, aucun site détecté ne semble pouvoir correspondre à un site potentiel d'interaction entre la Neu-1 et des effecteurs de signalisation. Des résultats similaires ont été obtenus avec InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>), autre logiciel permettant la recherche de motifs, domaines et sites conservés.

Les résultats obtenus avec BLAST, Prosite et avec la fonction *Feature Aligner* permettent de mettre en évidence que Neu-1 ne semble pas pouvoir interagir avec d'autres protéines que le complexe AP2. Comme AP2 n'est pas impliqué dans l'activation de voies de signalisation, il est tout à fait envisageable que la transduction de signal du récepteur de l'élastine fasse intervenir un autre processus que l'interaction directe entre Neu-1 et les effecteurs du récepteur de l'élastine.

II. Rôle de l'activité catalytique de Neu-1 dans la transduction du signal du récepteur de l'élastine

II.1. Effet de la stimulation de l'EBP sur l'activité neuraminidase à la membrane plasmique des fibroblastes dermiques humains

Une des caractéristiques les plus intéressantes du complexe récepteur de l'élastine est son lien de parenté direct avec le complexe de dégradation intralysosomal. Ce complexe est composé de trois protéines principales : la β -Gal., la Protéine Protectrice et

Neu-1. Le complexe récepteur de l'élastine est composé de l'EBP (S-Gal), la Protéine Protectrice et Neu-1. La seule différence réside donc dans la présence soit de l'EBP, soit de la β -Gal.

En 1996, Hinek a émis l'hypothèse que la Nase du récepteur de l'élastine jouerait un rôle important lors la synthèse des fibres élastiques. Elle pourrait, mais uniquement en présence de tropoélastine et suite à l'association de l'EBP au reste du complexe, cliver un acide sialique appartenant à une chaîne glycanne de glycoprotéines constitutives des microfibrilles de la fibre élastique. Cependant, l'existence d'une telle activité n'a jamais été étudiée.

De plus, dans le lysosome, Neu-1 est non active si la β -Gal n'est pas associée au reste du complexe [Van der Horst et coll., 1989].

Par analogie, nous avons donc évalué si la stimulation de l'EBP, induit une activité neuraminidase.

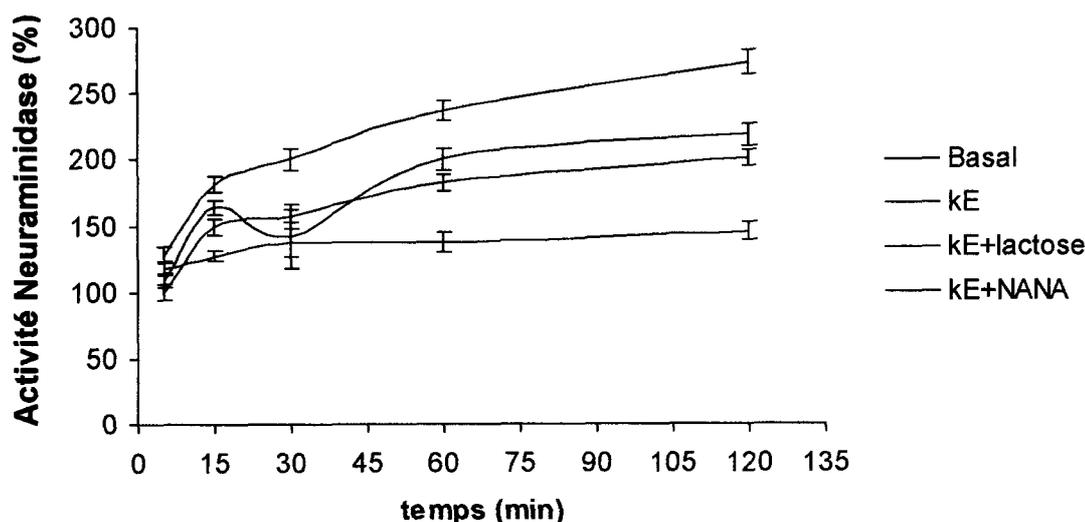


Figure 55 : Mesure d'activité Neuraminidase à la membrane plasmique des fibroblastes dermiques. Après la mise au repos, les cellules (5.10^5) sont traitées ou non par de la kE ($50 \mu\text{g/mL}$), en présence de l'acide 4-méthylumbelliferyl-N-acetyl- α -D-neuraminique (Muf-NANA), substrat de neuraminidase et durant les temps indiqués. Le lactose (1 mM), antagoniste de l'EBP et le DANA ($400 \mu\text{M}$), inhibiteur de neuraminidase, ont été préincubés respectivement pendant 3h et 1h avant la stimulation. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM et sont obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

Ces résultats montrent que les peptides d'élastine stimulent une activité neuraminidase à la membrane plasmique des fibroblastes. Cette activité est inhibée par le lactose démontrant l'implication de l'EBP dans ce processus. De plus, le DANA permet également d'inhiber l'activité neuraminidase produite.

Ces résultats suggèrent que la stimulation de l'EBP permet d'induire une activité neuraminidase qui pourrait correspondre à celle de Neu-1.

II.2. Influence du DANA sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE

Afin d'évaluer le rôle potentiel de l'activité neuraminidase dans la transduction du signal du complexe récepteur de l'élastine, nous avons tout d'abord testé l'influence du DANA sur la production de pro-MMP-1 induite par la kE.

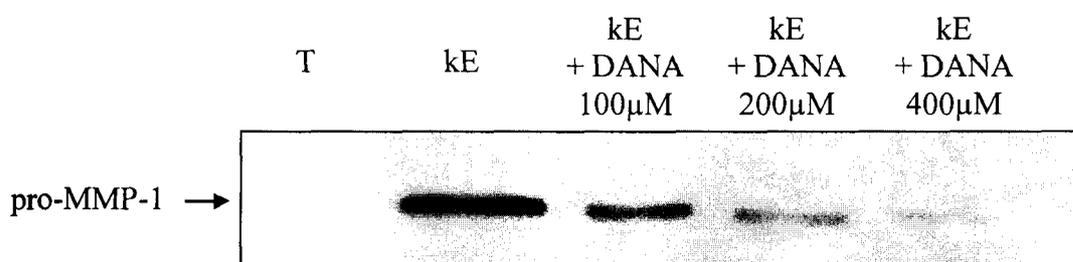


Figure 56 : Effet du DANA sur la sécrétion de pro-MMP-1. Après la mise au repos, les cellules (10^5) sont stimulées ou non pendant 24h avec 50 µg/mL de kE. Dans le cas de l'utilisation de DANA, celui-ci est préincubé 1 h avant la stimulation aux concentrations indiquées. A la fin de la période d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés, concentrés et la présence de pro-MMP-1 est analysée par western-blot. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires.

Le DANA permet d'inhiber la sécrétion de pro-MMP-1 induite par la kE. A la concentration de 400 µM, l'inhibition est presque totale. Cette concentration de DANA correspond à celle utilisée dans les expériences de mesure d'activité neuraminidase permettant d'inhiber l'activité neuraminidase induite par les peptides d'élastine.

II.3. Influence du DANA sur l'activation de ERK1/2

Le DANA inhibe la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Nous avons montré précédemment que ce processus est sous le contrôle de la voie ERK1/2. Nous avons donc naturellement évalué l'effet du DANA sur l'activation de ERK1/2.

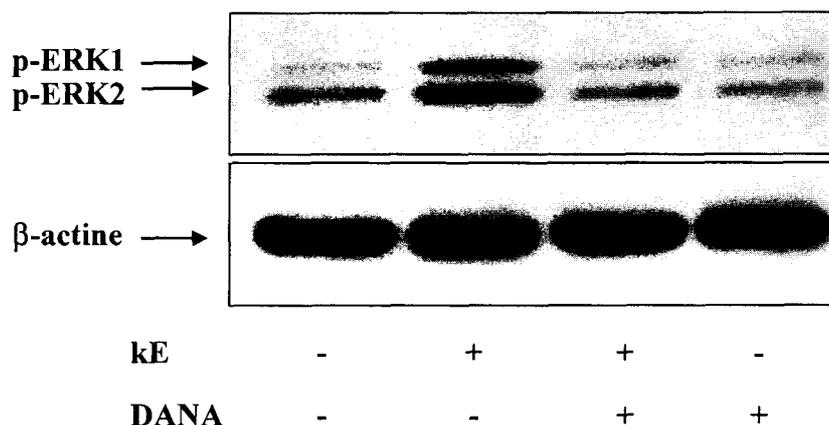


Figure 57 : Effet du DANA sur l'activation de ERK1/2. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont préincubées pendant 1h avec $400 \mu\text{M}$ de DANA puis traitées avec de la kE ($50 \mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti-β-actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires.

L'utilisation de DANA permet d'inhiber totalement l'activation de ERK1/2 induite par la kE. Une neuraminidase serait impliquée dans la signalisation du récepteur de l'élastine et jouerait un rôle fondamental. Il pourrait logiquement s'agir de Neu-1.

L'intervention d'une neuraminidase dans l'induction de voies de signalisation peut sembler atypique. Les peptides d'élastine activent la voie ERK1/2. Nous avons donc recherché comment une telle activité pourrait réguler cette voie.

III. Rôles des radeaux lipidiques et du couple GM3-lactosylcéramide dans la transduction du signal du complexe récepteur de l'élastine

Afin de comprendre comment une activité neuraminidase peut réguler l'activation de voies de signalisation, il est nécessaire de prendre en considération les substrats de ces enzymes. Parmi les substrats privilégiés des neuraminidases, les gangliosides occupent une place particulièrement importante [Achyuthan et Achyuthan, 2001].

Ce sont des glycosphingolipides caractérisés par la présence d'un ou plusieurs acides sialiques branchés ou non. Ces molécules sont des constituants des radeaux lipidiques, microdomaines membranaires très riches en cholestérol, qui jouent un rôle important dans la transduction du signal en concentrant de nombreux effecteurs de signalisation [Paratcha et Ibanez, 2002].

Parmi les gangliosides, le GM3 est un constituant spécifique des radeaux lipidiques et un des substrats préférentiels de Neu-1 [Zajchowski et Robbins, 2002 ; Seyrantepe et coll., 2003]. Le produit de sa désialylation est le lactosylcéramide, également trouvé dans les radeaux lipidiques [Iwabuchi et Nagaoka, 2002]. Ce glycosphingolipide est particulièrement intéressant dans le sens où il peut activer la voie ERK1/2 dans les cellules musculaires lisses d'aorte, conduisant à la prolifération de ces cellules [Bhunja et coll., 1996 et 1997]. Compte tenu des effets biologiques qu'il peut induire, il a été défini comme un nouveau second messager cellulaire [Chatterjee, 1998].

Forts de ces différents renseignements bibliographiques, nous avons décidé d'étudier le rôle des radeaux lipidiques et du lactosylcéramide dans le fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine. Notre hypothèse de travail est que le récepteur de l'élastine pourrait se trouver dans les radeaux lipidiques et que la neuraminidase activée par la kE cliverait le GM3 en lactosylcéramide. Ce dernier pourrait alors jouer un rôle de second messager et activer la voie ERK1/2.

III.1. Rôle des radeaux lipidiques dans le fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine

III.1.1. *L'EBP et les radeaux lipidiques sont colocalisés*

La première étape de cette étude a été d'analyser la localisation membranaire de l'EBP et des radeaux lipidiques par microscopie confocale. Pour cela, les radeaux lipidiques ont été marqués à l'aide de la sous-unité B de la toxine du choléra couplé à un fluorophore, l'AlexaFluor 488, fluorescent dans le vert. La toxine du choléra se fixe spécifiquement sur le GM1, résident spécifique des radeaux lipidiques. L'EBP a quant à lui été marqué à l'aide d'un anticorps anti-EBP, qui est par la suite reconnu par un anticorps secondaire adéquat couplé à de la biotine. La détection est effectuée par l'incubation d'AlexaFluor 568 couplé à de la streptavidine et fluorescent dans le rouge.

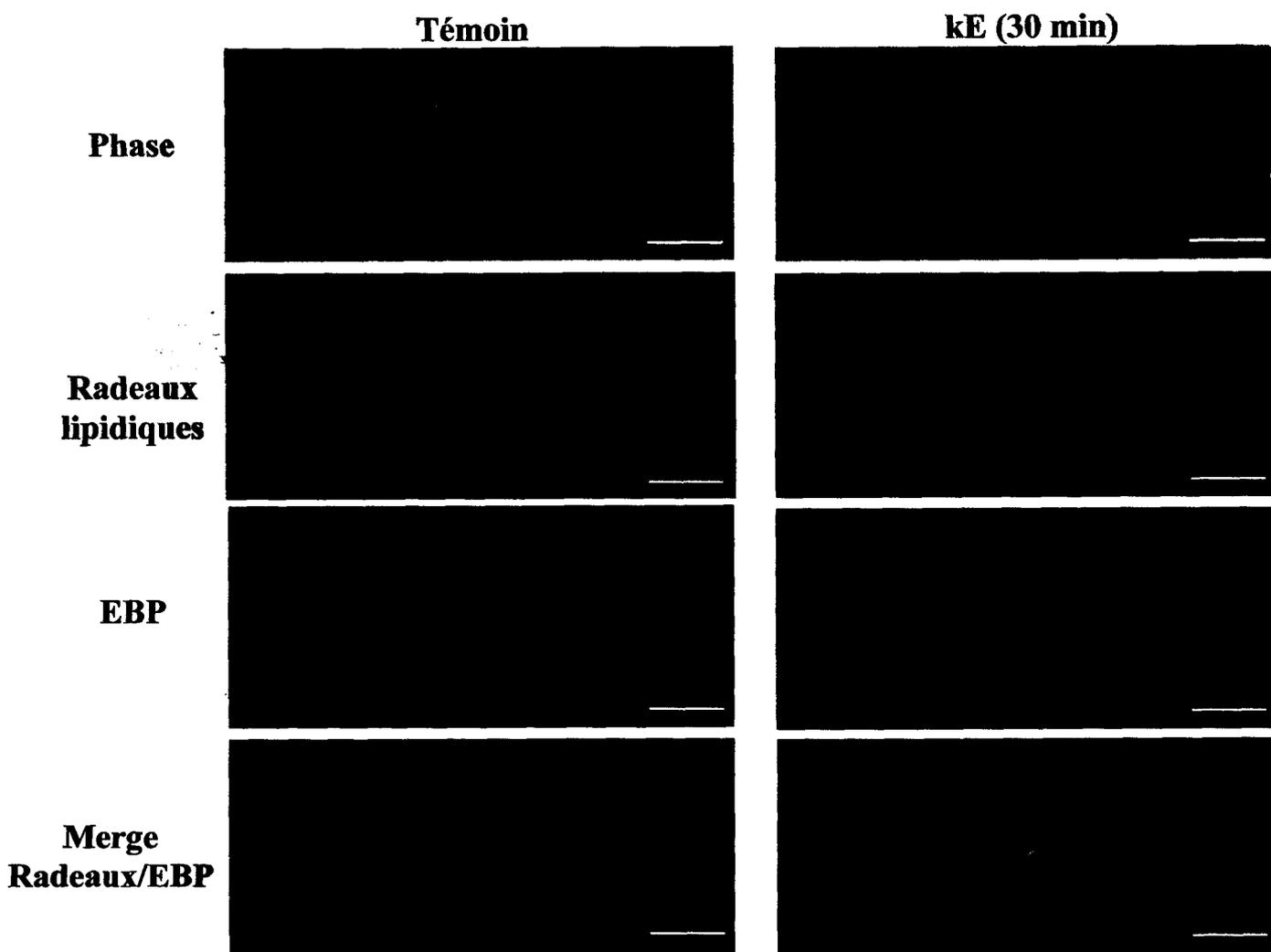


Figure 58 : Analyse en microscopie confocale du marquage des radeaux lipidiques et de l'EBP. Après la mise au repos, les cellules sont stimulées ou non avec de la kE (50 µg/mL) pendant 30 min. Les cellules sont fixées puis les localisations membranaires des radeaux lipidiques et de l'EBP sont alors étudiées par microscopie confocale. Phase : photos prise en contraste de phase ; Radeaux lipidiques : marquage des radeaux lipidiques ; EBP : marquage de l'EBP ; Merge Radeaux/EBP : analyse de la colocalisation Radeaux/EBP par superposition des images Radeaux lipidiques et EBP. La barre blanche représente 10 µm.

L'analyse en microscopie confocale permet de mettre en évidence une répartition homogène des radeaux lipidiques à la surface de la membrane des fibroblastes. Aucune différence de répartition n'est observée entre les témoins et les cellules stimulées par la kE.

Cependant, l'analyse de la localisation membranaire de l'EBP montre une localisation tout à fait atypique et particulière. En effet, l'EBP semble se présenter dans les fibroblastes non stimulés sous la forme de deux clusters très localisés à la surface de la cellule. Lorsque les cellules sont stimulées pendant 30 min avec 50 µg/mL de kE, l'EBP semble ne plus se présenter que sous la forme d'un seul cluster de grande taille.

Dans les deux cas, l'EBP est localisé dans les radeaux lipidiques, suggérant un rôle important pour ces microdomaines membranaires dans le fonctionnement du récepteur de l'élastine.

III.1.2. Les radeaux lipidiques sont cruciaux pour le fonctionnement du récepteur de l'élastine

Afin d'étudier le rôle fonctionnel des radeaux lipidiques dans le mécanisme de fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine, nous avons testé l'effet de la méthyl-β-cyclodextrine (MCD) sur l'activation de ERK1/2 induite par la kE.

Les radeaux lipidiques sont très riches en cholestérol et ce stérol est essentiel pour leur intégrité et leur fonction. L'utilisation de MCD permet de dépléter le cholestérol des radeaux lipidiques et constitue ainsi un outil de choix dans l'évaluation du rôle de ces microdomaines dans un processus biologique [Simons et Toomre, 2004].

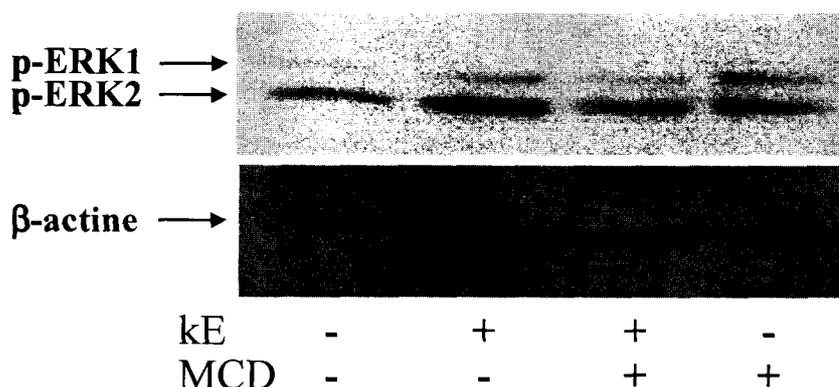


Figure 59 : Effet de la MCD sur l'activation de ERK1/2 stimulée par la kE. Après la mise au repos, les cellules (1.10^6) sont préincubées pendant 30 min avec 10 mM de MCD puis traitées avec de la kE (50 µg/ml) pendant 30 min. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti-β-actine afin de montrer l'égalité des dépôts. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires.

L'utilisation de MCD permet dans nos conditions, d'inhiber totalement l'activation de ERK1/2 induite par la kE. Ceci indique que les radeaux lipidiques sont cruciaux dans le mécanisme de transduction du récepteur de l'élastine.

III.2. Influence de la kE sur la production de lactosylcéramide

Le lactosylcéramide, produit de la désialylation du GM3 par Neu-1 et trouvé au sein des radeaux lipidiques, est un second messager capable d'activer la voie ERK1/2, voie de signalisation activée par la kE dans les fibroblastes. Nous avons donc décidé d'analyser sa production par extraction des glycolipides et gangliosides puis analyse par HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*).

Les fibroblastes ($15 \cdot 10^6$), sont stimulés ou non avec de la kE (50 $\mu\text{g/mL}$) pendant 30 min, puis les gangliosides et glycolipides sont extraits. Les extractions sont alors soumises à une analyse HPTLC, puis la plaque est révélée par du réactif de Bial.

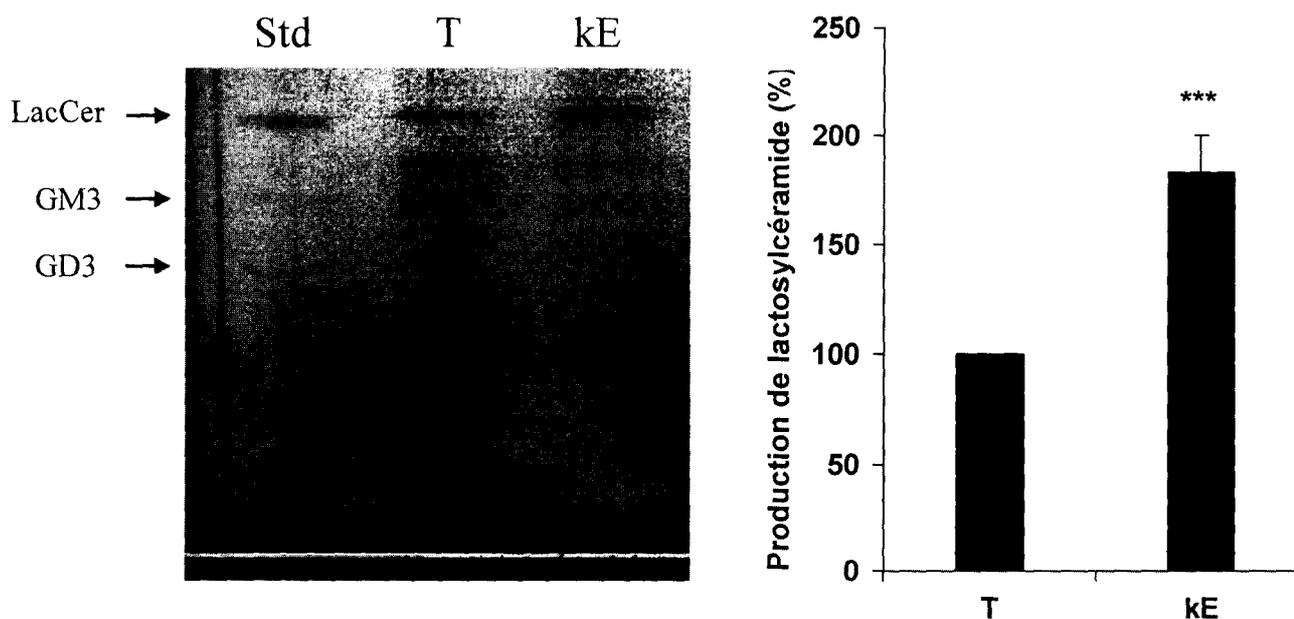


Figure 60 : Analyse par HPTLC de la production de lactosylcéramide induite par la kE. Après la mise au repos, les cellules ($15 \cdot 10^6$) sont traitées avec de la kE (50 $\mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Les glycolipides et gangliosides sont ensuite extraits, séparés par HPTLC puis révélés par du réactif de Bial. La plaque d'HPTLC montrée est représentative des résultats obtenus lors de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. L'analyse densitométrique est présentée à côté de la figure sous forme de la moyenne \pm SEM. ***, $p < 0,001$: significativement différent par rapport au témoin. : standards ; LacCer : lactosylcéramide ; T : témoin. kE : cellules traitées par de la kE.

Malgré l'analyse par HPTLC et le grand nombre de cellules utilisées, la sensibilité et l'efficacité de la séparation ne sont pas optimales. Cependant, de nombreux glycolipides sont révélés à l'aide du réactif de Bial permettant la révélation de leur partie glycanne. Ceci met en évidence que la stimulation avec la kE semble induire une production importante de lactosylcéramide comparativement au témoin. Malheureusement, il est impossible par cette technique d'évaluer le devenir du GM3.

*Conclusions, Discussion et
Perspectives*

Un des rôles de la Matrice Extracellulaire (MEC) est de servir de soutien mécanique aux cellules et d'assurer la cohésion des tissus. Cependant, au delà de cette fonction architecturale, le contact étroit établi avec les cellules permet à la MEC de réguler également les fonctions cellulaires fondamentales telles que l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie [Schenk et Quaranta, 2003]. Les interactions cellules-matrice sont donc essentielles pour le fonctionnement physiologique normal de l'organisme.

La MEC est une structure dynamique en perpétuel renouvellement et l'équilibre entre la néosynthèse de ses composants et sa dégradation est étroitement régulé. Un des processus permettant cette régulation est la balance TIMPs/MMPs. En conditions physiopathologiques caractérisées par une dégradation matricielle accrue, les MMPs se trouvent en excès par rapport aux TIMPs et sont donc responsables de la protéolyse de la MEC [Hoffmann et coll., 2000]. Ceci est observé lors de l'invasion tumorale.

Les fragments de matrice générés par ce processus ne sont pas tous inertes. Nombre d'entre eux possèdent des activités biologiques. Certains, comme le peptide 185-203 du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV vont permettre de bloquer le développement tumoral en inhibant, entre autres, la prolifération des cellules tumorales et la synthèse des MMPs [Pasco et coll., 2004]. Cependant, d'autres produits de dégradation matriciels comme les peptides d'élastine, pourraient au contraire favoriser la maladie. Ces peptides sont en effet capables de réguler divers processus impliqués dans le développement tumoral tels que la migration, la prolifération ou encore l'expression de protéases chez de nombreux types cellulaires normaux et pathologiques [Duca et coll., 2004].

Les premiers travaux réalisés au laboratoire ont montré que les peptides d'élastine induisent l'expression de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques, se traduisant par l'accumulation de cette protéine dans le milieu de culture. Cette MMP, en présence de plasmine et d'un de ses activateurs physiologique, la MMP3, est activée et permet de dégrader le collagène de type I [Brassart et coll., 2001]. La MMP-1 est une MMP principalement exprimée par les fibroblastes et sa présence est associée à un mauvais pronostic des tumeurs [Murray et coll, 1996 ;Inoue et coll, 1999 ; Ito et coll ; 1999].

Le but de notre travail était de mettre à jour les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine régulant l'expression de la pro-MMP-1. L'apport de données nouvelles concernant la transduction du signal associée à ce récepteur devrait permettre

d'identifier des cibles pharmacologiques potentiellement utiles pour la conception d'une thérapie visant à limiter les effets délétères de la dégradation de l'élastine dans le cas de la pathologie tumorale.

Par l'utilisation d'agents chimiques, nous montrons tout d'abord que la production de pro-MMP-1 par les peptides d'élastine met en jeu la voie ERK1/2, et que cette voie est cruciale pour l'expression de cette MMP. De plus, une voie PKA-dépendante et une voie PI3K-dépendante sont apparues comme essentielles pour l'induction de la production de pro-MMP-1 par la kE.

L'analyse détaillée des voies de signalisation impliquées a permis de mettre en évidence l'organisation de ces différents protagonistes. En effet, notre étude a mis à jour un nouveau mécanisme Ras-indépendant d'activation de ERK1/2, mettant en jeu les modules AMPc / PKA / B-Raf / MEK1/2 et protéine G_0/G_i / p110 γ / Raf-1 / MEK1/2, coopérant tous les deux pour induire l'activation de ERK1/2 responsable de l'expression de la pro-MMP-1 par les peptides d'élastine.

L'utilisation de U0126 nous a permis de mettre en évidence que la voie ERK1/2 est la voie régulatrice de la production de pro-MMP-1 induite par la kE. Le SP600125 et le SB203580, inhibiteurs respectifs de JNK1/2 et p38 n'ont aucun effet. Bien que les voies MAPK ERK1/2, JNK1/2 et p38 aient été décrites pour leur implication dans l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques induite par l'IL1- β ou par l'acide okadaïque [Reunanen et coll., 1998 ; Westermarck et coll., 1998], des études plus récentes ont permis de mettre en évidence que la voie ERK1/2 joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression de la MMP-1. En effet, l'utilisation de mutants constitutivement actifs des voies ERK1/2, JNK1/2 et p38 a révélé que seule la voie ERK1/2 avait la capacité d'induire l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes. L'utilisation de mutants dominants positifs de Ras et de Raf-1 ainsi que l'utilisation d'esters de phorbols, permet d'augmenter de manière importante l'activité du promoteur de la MMP-1 et l'expression de son ARNm. De plus, l'utilisation d'arsenite et d'anisomycine, molécules activatrices de p38 et JNK1/2, n'augmente que très faiblement l'expression de MMP-1 renforçant le rôle prépondérant de la voie ERK1/2 dans la production de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques [Westermarck et coll., 2001].

Les facteurs de transcriptions de la famille AP-1 jouent un rôle essentiel dans l'expression de la MMP-1. En effet, la mutation de l'élément AP-1 situé entre les positions

-72 pb et -66 pb du promoteur de la MMP-1 bloque totalement l'activité basale du promoteur et sa réponse aux stimuli externes [Lee et coll., 1996 ; Doyle et coll., 1997 ; Westermarck et coll., 1997]. L'analyse de l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 à l'aide d'un oligonucléotide comprenant la séquence 5'-TGAGTCA-3' correspondant au site de fixation des complexes AP-1 sur le promoteur de la MMP-1 [Angel et coll., 1987], permet de montrer que de tels facteurs de transcription sont activés par la kE et qu'ils pourraient être impliqués dans l'expression de la MMP-1. De plus, cette hypothèse est fortement renforcée par le fait que le U0126, inhibiteur de MEK1/2, inhibe totalement la fixation d'AP-1 à l'ADN induite par la kE. Ces résultats démontrent le lien existant entre la voie ERK1/2, responsable de la production de pro-MMP-1 par les peptides d'élastine, et l'activation d'AP-1.

L'utilisation d'un plasmide renfermant le promoteur de la MMP-1 muté sur AP-1 couplé à un gène rapporteur Luciférase permettrait de conclure quant à l'importance de ces facteurs de transcription dans l'expression de la MMP-1 induite par les peptides. De plus, l'identification des dimères AP-1 activés pourrait être réalisée par des expériences de "supershift".

Le contrôle de la production de pro-MMP-1 par la kE met également en jeu des voies PKA- et PI3K-dépendantes. Nous montrons que, comme pour les monocytes [Fülöp et coll., 1986], la kE induit après 5 min de stimulation une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc d'environ six fois. L'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc induite par la forskoline, permet d'induire l'expression de pro-MMP-1 démontrant le rôle potentiel de ce second messager dans la production de cette MMP par les peptides d'élastine. Cette observation est en accord avec les résultats de Kuroda et Shinkai [1997] qui montrèrent que l'utilisation de dibutyryl AMPc, un analogue non métabolisable de l'AMPc, permet d'induire l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques humains. L'utilisation de H-89, inhibiteur de PKA, permet d'inhiber partiellement la production de pro-MMP-1, démontrant que la voie dépendante de l'AMPc n'est que partiellement impliquée. L'inhibition des PI3K par le LY294002 inhibe également partiellement l'effet de la kE sur la production de pro-MMP-1, suggérant qu'une voie PI3K-dépendante est associée à la voie PKA-dépendante pour médier l'effet des peptides d'élastine. Le travail consistait ensuite à déterminer comment les voies ERK1/2, PKA et PI3K s'articulent.

L'activation de ERK1/2 par les peptides d'élastine a été décrite dans nos cellules mais aussi dans les cellules musculaires lisses d'aorte de porc [Mochizuki et coll., 2002]. Dans cet article, les auteurs décrivent les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine

régulant la prolifération de ces cellules et montrent que ERK1/2 est activé après 5 min de stimulation. Cependant, l'étude ne précise pas la cinétique d'activation de ces protéines, rendant la comparaison avec nos résultats plus difficile. De plus, et en accord avec nos données, les auteurs n'observent pas non plus d'activation de JNK1/2, ni de p38. La voie ERK1/2 semble donc être la seule voie MAPK activée par les peptides d'élastine. Cependant, étant donné le peu de renseignements existants concernant les voies de signalisation activées par les peptides d'élastine, ceci demande à être confirmé par des études sur d'autres types cellulaires.

Dans les fibroblastes dermiques, nous observons les formes actives de ERK1/2 (phosphorylation sur T202 et Y204) dès 5 min de stimulation, avec un maximum à 30 min. Cette activation persiste jusqu'à 60 min, temps le plus long que nous avons testé. Il est très intéressant de remarquer que l'activation de ERK1/2 est encore très forte après 60 min de stimulation. Ceci met en évidence une induction soutenue de la voie, phénomène atypique compte-tenu du fait que dans la plupart des cas l'activation de ERK1/2 est transitoire. Parallèlement, l'activation de MEK1/2, évaluée grâce à l'analyse de la phosphorylation sur S217 et S221, suit la même cinétique que ERK1/2. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que MEK1/2 sont les activateurs physiologiques de ERK1/2.

Nous montrons également que l'activation de MEK1/2 et ERK1/2 est contrôlée par des voies dépendantes de PI3K et PKA. En effet, l'utilisation du H-89 ou du LY294002 inhibe seulement partiellement l'activation de MEK1/2 et ERK1/2, résultats en accord les résultats obtenus avec les deux inhibiteurs concernant la production de pro-MMP-1. L'utilisation simultanée du H-89 et du LY294002 bloque totalement l'activation de MEK1/2 et ERK1/2. Le taux d'inhibition obtenu est identique à celui observé par l'utilisation de lactose, antagoniste couramment utilisé de l'EBP, démontrant l'importance cruciale des voies PKA et PI3K dans l'activation de la voie ERK1/2 par les peptides d'élastine dans les fibroblastes dermiques.

L'inhibition partielle de MEK1/2 par le H-89 ou le LY294002 suggère fortement que les voies PKA et PI3K sont intégrées à la voie ERK1/2 en amont de MEK1/2.

Nos résultats mettent en évidence que la kE induit la phosphorylation de Raf-1 sur S338 ainsi que son activation par un mécanisme dépendant de PI3K. Ces événements mènent à l'activation de MEK1/2. Il est bien établi que la phosphorylation de Raf-1 sur S338 est essentielle pour son activation [Diaz et coll., 1997 ; Barnard et coll., 1998 ; Mason et coll., 1999]. L'implication de la PI3K à ces événements a été proposée [Chaudhary et coll., 2000 ;

Sun et coll., 2000] mais ce modèle fut mis en doute par Chiloeches et coll. [2001]. Dans leur étude, ces auteurs ont suggéré que le LY294002 ne peut inhiber la phosphorylation de Raf-1 sur S338 qu'à très haute concentration (100 μ M) et que par conséquent, le blocage observé ne pouvait pas être dû à l'inhibition de la PI3K mais à une autre kinase. Cependant, dans notre travail, nous bloquons la phosphorylation de Raf-1 et son activité avec une concentration de LY294002 de 25 μ M, concentration couramment utilisée et considérée comme spécifique, supportant le rôle possible de la PI3K dans l'activation de Raf-1.

Le mécanisme par lequel la PI3K peut phosphoryler Raf-1 sur S338 et l'activer pourrait faire intervenir les sérine/thréonine kinase de la famille PAK (*p21-activated protein kinase*). Cette famille de kinases est composée de deux groupes : le premier est constitué de PAK1, 2 et 3 et le second de PAK4, 5 et 6, beaucoup moins connues. Les PAK s'associent aux petites protéines G Rac et Cdc42, mais seulement le groupe 1 est activé par ce mécanisme [Jaffer et Chernoff, 2002]. Le rôle de PAK3 dans la phosphorylation de la sérine 338 de Raf-1 a été démontré [King et coll., 1998 ; Sun et coll., 2000] et PAK1 peut également participer à la phosphorylation de ce site et à l'activation de Raf-1 [Chaudhary et coll., 2000]. Dans cette étude, les auteurs proposent un modèle d'activation de Raf-1 : l'induction de Ras conduit à l'activation des PI3K de classe I_A. Les produits lipidiques de l'action de la PI3K stimulent des Rac ou Cdc42-GEFs conduisant à l'activation de ces protéines G qui peuvent ainsi activer PAK1. PAK1 peut alors phosphoryler Raf-1 sur S338 et conduire à son activation.

Ce modèle, basé sur l'intervention des produits lipidiques de la PI3K peut donc tout à fait s'appliquer à notre système, faisant intervenir p110 γ .

Les PI3K de classe I_A et I_B peuvent activer la voie ERK1/2 [King et coll., 1997 ; Takeda et coll., 1999 ; Mansat-De Mas et coll., 2003]. Nous avons donc évalué l'activité de deux sous-classes en présence de kE. Nous montrons que dans les fibroblastes dermiques, l'activité de p110 γ est fortement augmentée tandis que celle des PI3K de classe I_A n'est pas induite. Ces résultats montrent pour la première fois que les fibroblastes dermiques expriment p110 γ . Diverses études ont identifié une protéine G sensible à la PTX comme cible de la signalisation induite par les peptides d'élastine [Varga et coll., 1989 ; Brassart et coll., 2001 ; Mochizuki et coll., 2002]. De plus, p110 γ est la seule PI3K pouvant être directement activée par les hétérodimères $\beta\gamma$ dérivés de protéines G. Cette PI3K est ainsi considérée comme un lien important entre l'activation de protéines G et celle de la voie ERK1/2 [Anderson et Jackson, 2003 ; Yart et coll., 2002].

Par conséquent, nous avons testé l'influence de la PTX sur l'activité de p110 γ et sur la phosphorylation de la voie Raf-1 / MEK1/2 / ERK1/2. Nos résultats montrent que la PTX bloque totalement l'activation de p110 γ . Cette toxine permet également d'inhiber totalement la phosphorylation de Raf-1 sur S338 mais partiellement l'activation de MEK1/2 et ERK1/2. Ces résultats, en accord avec ceux obtenus concernant les modifications de l'état de phosphorylation de la cascade Raf-1 / MEK1/2 / ERK1/2 en présence de LY294002, renforcent l'hypothèse du rôle de p110 γ dans l'activation de Raf-1 et de la voie ERK1/2.

Bien qu'il fût montré récemment que la PI3K de classe I β p110 β peut être stimulée par $\beta\gamma$ après avoir été activée par liaison de p85 à un motif de type phospho-tyrosine, le rôle de cette PI3K dans l'activation de la voie ERK1/2 par la kE peut être exclu par le simple fait que les peptides d'élastine n'activent que p110 γ dans les fibroblastes. De plus, dans le cas de p110 β , $\beta\gamma$ jouent uniquement un rôle de "booster". Le blocage de la protéine G n'inhibe par conséquent dans ce système que partiellement l'activation des cibles de la PI3K, alors que nous observons un blocage complet de la phosphorylation de Raf-1.

Initialement, lors des premières études menées *in vitro* sur la régulation de p110 γ par les protéines G, la sous unité α et l'hétérodimère $\beta\gamma$ ont été proposés comme activateurs de l'enzyme [Stoyanov, 1995]. Cependant diverses études *in vivo* plus récentes ont souligné l'importance des hétérodimères $\beta\gamma$ dans l'activation de p110 γ [Lopez-Illasaca et coll. 1997 ; Stephens et coll., 1997 ; Brock et coll., 2003]. Afin d'étudier si un tel mécanisme existe également dans les fibroblastes, ces cellules ont été transfectées avec pRK5- β ARK1-CT, plasmide codant pour un scavenger de sous-unités $\beta\gamma$, le peptide β ARK1-CT. Nous montrons que ce peptide bloque l'activation de p110 γ , démontrant que la protéine G est dissociée lors de la stimulation par la kE et le rôle crucial de $\beta\gamma$ dans l'activation de la PI3K. Cependant, l'utilisation d'une construction plasmidique codant pour p110 γ taggée nous permettrait de nous affranchir du faible taux de transfection obtenu avec nos cellules, et d'étudier l'effet de β ARK1-CT sur p110 γ uniquement dans les cellules transfectées, et non à partir d'extraits cellulaires contenant des cellules transfectées et non transfectées.

L'ensemble de ces résultats démontrent donc que l'activation de la voie ERK1/2 par les peptides d'élastine met en jeu l'activation de Raf-1 par la PI3K p110 γ . Cette enzyme est activée par l'hétérodimère $\beta\gamma$ dérivé d'une protéine G de type G $_0$ ou G $_i$, protéines G sensibles à la PTX.

Nos résultats montrent également que l'activation de ERK1/2 implique la serine/thréonine kinase dépendante de l'AMPc, PKA. Cette enzyme peut participer à l'activation de la voie MAPK ERK1/2 par le biais de l'activation de B-Raf. Cependant, l'existence d'un tel mécanisme dans les fibroblastes dermiques n'était pas connu car l'expression de B-Raf par de telles cellules n'avait pas été étudiée.

Nous mettons en évidence que B-Raf est exprimée par les fibroblastes dermiques humains. L'isoforme majeure de 95 kDa est détectée tandis que la forme de 68 kDa ne semble pas présente dans nos cellules. Nous détectons également une seconde forme, de masse moléculaire inférieure à 95 kDa, mais moins exprimée que cette dernière. B-Raf pouvant être exprimée sous la forme de nombreux variants d'épissage, il n'est pas étonnant de détecter deux isoformes au sein de la même cellule. En effet, Qiu et coll. [2000] ont montré que les cellules PC12, CHO-K1, NB2A et C6 expriment toutes, mais à des taux différents, les isoformes 68 et 95 kDa. De plus, trois isoformes de B-Raf sont détectables dans les reins et la rate murins tandis que le cerveau renferme quatre isoformes différentes [Barnier et coll., 1995]. Les fibroblastes dermiques humains semblent donc exprimer deux isoformes de B-Raf. Les différentes isoformes produites diffèrent par leur capacité à s'associer à MEK1/2 et à les activer [Papin et coll., 1998]. Il pourrait être intéressant d'étudier si dans nos cellules, les deux isoformes possèdent des activités kinases équivalentes ou pas. L'analyse de l'activité kinase de B-Raf est effectuée à l'aide d'un anticorps reconnaissant un épitope de 19 acides aminés situés dans le domaine C-terminal. Ce domaine de B-Raf n'étant soumis à aucun épissage [Mercer et Pritchard, 2003], l'immunoprécipitation effectuée ne permet pas de distinguer les deux isoformes.

L'étude de l'activité de B-Raf, utilisant MEK1 comme substrat, a permis de révéler que l'activité de cette kinase est fortement induite par la kE. L'activation de B-Raf par l'AMPc peut mettre en jeu le facteur d'échange de nucléotide guanilique Epac, ou la PKA. L'utilisation de H-89 permet de bloquer totalement l'activation de B-Raf induite par les peptides d'élastine, démontrant que l'activation de cette kinase est PKA dépendante.

Quelque soit le système d'activation de B-Raf par l'AMPc, le régulateur clé de cette isoforme de Raf est la petite protéine G Rap-1, non étudiée ici. Dans le cas de l'activation de Rap-1 par Epac, le mécanisme impliqué est classique concernant un GEF : la liaison de l'AMPc à Epac induit son association à Rap-1 qui stimule l'échange du GDP par du GTP et active la petite protéine G [Bos, 2003]. Cependant, le mécanisme de son activation par la PKA est différent et

un modèle a été proposé récemment [Schmitt et Stork, 2002]. L'activation de la PKA par l'AMPc induit la phosphorylation de la sérine 17 de c-Src, une tyrosine kinase. Ceci entraînerait l'activation de Rap-1 par le recrutement d'un complexe protéique composé des protéines adaptatrices Cbl et Crk, et du Rap-1-GEF C3G. Ce GEF activerait Rap-1, qui à son tour, activerait B-Raf. Un tel mécanisme pourrait donc être étudié dans le cas de l'activation PKA-dépendante de Rap-1 par les peptides d'élastine.

Un des points importants à souligner est que, pour le moment, le mécanisme par lequel la stimulation des fibroblastes dermiques induit l'augmentation d'AMPc est inconnu. Les sous-unités $\beta\gamma$ dérivées de protéines G sensibles à la PTX peuvent activer les adénylyl cyclases de type II et IV. Cependant, la PTX ne bloque que partiellement l'activation de la voie ERK1/2 par les peptides d'élastine démontrant qu'un tel système n'est pas applicable dans notre cas. L'intervention d'une protéine G_s , activateur classique de toutes les isoformes d'adénylyl cyclases [Hurley, 1999] est plutôt à envisager. Il est connu qu'un récepteur peut activer de concert deux protéines G différentes. L'activation du récepteur de l'hormone lutéinisante induit l'activation de l'adénylyl cyclase par G_s et de la PLC- β par $\beta\gamma$ provenant de G_s et de G_i [Herrlich et coll., 1996]. La stimulation du récepteur de la GnRH (*Gonadotropin releasing Hormone*) dans les cellules L β T2 permet l'activation de G_s et G_q [Liu et coll., 2002] et la liaison de l'isoprotérénol à un récepteur de type β -adrénergique, induit l'activation de la voie ERK1/2 dans des cardiomyocytes par le biais de G_s / AMPc / PKA et de $\beta\gamma$ dérivées de G_i / Src / Ras / Raf-1 [Zou et coll., 1999]. Il est donc envisageable que le récepteur de l'élastine puisse activer une protéine G du type G_0 / G_i et une protéine G_s .

La petite protéine G Ras est un régulateur important de Raf-1 [Chong et coll., 2003], B-Raf [Mercer et Pritchard, 2003] et p110 γ [Suire et coll., 2002], acteurs cruciaux de la signalisation induite par les peptides d'élastine dans les fibroblastes dermiques. Dans le but d'évaluer sa possible contribution à l'activation de la voie ERK1/2 par les peptides d'élastine, les fibroblastes ont été cotransfectés avec un dominant négatif de Ras, RasN17, et ERK1-HA. Nos résultats démontrent que cette petite protéine G n'est pas impliquée dans l'activation de cette voie MAPK par la kE. L'intervention d'un mécanisme d'activation de ERK1/2 indépendamment de Ras n'est pas commun mais a déjà été décrit dans les cellules HEK293T [Zang et coll., 2001], COS7 [Hayne et coll., 2000] et dans des cellules épithéliales intestinales [Paruchuri et coll., 2002].

La faible augmentation de l'activité de ERK1-HA que nous observons dans les cellules transfectées par RasN17 est non significative. Il est cependant à noter qu'une forte induction de l'activation de ERK1/2 indépendante de Ras a déjà été observée dans des cellules HEK293T transfectées par RasN17 et stimulées par du nocodazol, un agent dépolymérisant de microtubules [Zang et coll., 2001]. Bien que le mécanisme impliqué dans ce phénomène intrigant n'est pas connu, les auteurs ont montré que l'activation Ras-indépendante de ERK1/2 par le nocodazol fait intervenir le système Rac/Cdc42 / PAK, induisant la phosphorylation de Raf-1 sur S338 et son activation. Ces données renforcent l'hypothèse que dans notre système, l'activation de Raf-1 par p110 γ pourrait faire intervenir le système précité.

En conclusion, la première partie de notre travail identifie le mécanisme par lequel les peptides d'élastine induisent l'activation de la voie ERK1/2, responsable de la production de pro-MMP-1 par ces peptides, et apporte ainsi de nouvelles données concernant la signalisation induite par le récepteur de l'élastine. De plus, notre étude a permis d'identifier un nouveau mécanisme d'activation de cette voie MAPK, indépendant de Ras, et mettant en jeu deux voies parallèles et additives constituées des modules AMPc / PKA / B-Raf / MEK1/2 et protéine G₀/G_i / p110 γ / Raf-1 / MEK1/2. L'activation de ces deux isoformes de Raf et leur complémentarité dans l'induction de la voie ERK1/2 a déjà été décrit dans les cellules UT7-Mpl [Garcia et coll., 2001] et dans les cellules HEK293 [Norum et coll., 2003]. Cependant, les exemples d'une telle régulation sont rares. Notre étude en apporte un autre en identifiant les fibroblastes dermiques comme cellules exprimant B-Raf. Etant le plus puissant activateur de la voie ERK1/2 parmi la famille Raf [Kolch, 2001 ; Mercer et Pritchard, 2003 ; Chong et coll., 2003], B-Raf doit être considéré comme un régulateur clé de cette voie MAPK dans les fibroblastes dermiques. De plus, l'action concertée de Raf-1 et B-Raf pourrait expliquer l'activation soutenue dans le temps de ERK1/2 par les peptides d'élastine, comme cela a été décrit pour les cellules UT7-Mpl stimulées par la thrombopoïétine [Garcia et coll., 2001].

B-Raf est un facteur crucial de malignité des mélanomes. En effet, 66 % des mélanomes malins présentent des mutations sur B-Raf dont 80 % sont dues à une simple substitution V599E [Davies et coll., 2002]. Très récemment, B-Raf a été identifié comme cible thérapeutique importante dans trois lignées de mélanomes (A375, Colo829 et WM-266-4) [Karasarides et coll., 2004]. L'inactivation de B-Raf par l'inhibiteur BAY43-9006 induit un retard dans le développement tumoral *in vivo* de ces cancers. *In vitro*, cet inhibiteur,

initialement développé pour Raf-1, bloque la prolifération et induit l'apoptose des trois lignées. Les peptides d'élastine induisent l'expression de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques. Cet événement crucial pour le développement tumoral, pourrait participer au développement des mélanomes. Raf-1 et B-Raf sont tous les deux fondamentalement impliqués dans la production de cette MMP par les fibroblastes stimulés par des peptides d'élastine. Le BAY43-9006, inhibiteur de Raf-1 et de B-Raf, pourrait logiquement bloquer la production de cette MMP. Une thérapie basée sur l'utilisation d'un tel inhibiteur constituerait un choix logique dans le traitement du mélanome car cela pourrait permettre de bloquer à la fois le développement de la tumeur, et les événements associés à la réaction stromale, comme la synthèse de MMP-1. Cependant, il ne faut pas oublier que la production de cette MMP par les fibroblastes fait également intervenir d'autres facteurs que les peptides d'élastine pouvant agir par d'autres voies que ERK1/2. La stratégie thérapeutique citée ci-dessus pourrait alors être considérée comme un moyen complémentaire de bloquer la maladie, s'intégrant dans un plan multithérapeutique visant également d'autres cibles.

Nos résultats démontrent également que p110 γ est exprimée par les fibroblastes dermiques et fortement activée par la kE. Cette PI3K est un élément critique impliqué dans la réponse chimiotactique des neutrophiles [Hirsch et coll., 2000 ; Li et coll., 2000 ; Sasaki et coll., 2000]. Les peptides d'élastine sont connus pour la migration qu'ils induisent chez de nombreux types cellulaires, dont les fibroblastes [Senior et coll., 1984 ; Blood et coll., 1988 ; Fülöp et Larbi, 2002]. Il est donc envisageable que p110 γ soit un élément crucial de la migration des fibroblastes induite à la fois par les peptides d'élastine, mais aussi par d'autres facteurs pouvant intervenir dans le phénomène de cicatrisation, où la migration des fibroblastes au site de la blessure est un phénomène important [Steffensen et coll., 2001].

La seconde partie de notre travail a consisté à étudier le mécanisme de fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine. Cette étude très préliminaire nous a permis de mettre en évidence un rôle possible de l'activité neuraminidase du récepteur et des radeaux lipidiques dans la transduction du signal. Un rôle potentiel de second messager pourrait être attribué au lactosylcéramide, au regard des premiers résultats que nous avons obtenu. Cependant, ce travail doit être approfondi pour démontrer sans ambiguïté ce mécanisme.

Bien qu'il n'y ait aucune donnée concernant le mode de fonctionnement du récepteur, le rôle de l'interaction directe entre la neuraminidase du complexe récepteur, Neu-1, et ses

effecteurs de signalisation a été proposé [Mochizuki et coll., 2002]. Nous avons donc commencer par étudier par analyse bioinformatique, la possibilité que Neu-1 puisse présenter des éléments structuraux communs avec des récepteurs, pouvant nous renseigner sur son interaction potentielle avec certaines protéines. Les résultats furent négatifs et le seul motif reconnu d'interaction est le site $^{412}\text{YGTL}^{415}$, situé à l'extrémité du domaine C-terminal de l'enzyme et donc, du coté cytoplasmique de la membrane. Ce site d'interaction avec le complexe protéique AP2 a été récemment mis en évidence [Lukong et coll., 2001b]. Ces auteurs ont montré que, chez des lymphocytes T activés par de la concanavaleine A, Neu-1 était présente à la membrane plasmique en quantité plus importante comparativement aux mêmes cellules non stimulées. Le mécanisme impliqué semble mettre en jeu la phosphorylation de ^{412}Y , rendant impossible son association avec AP2 entraînant le maintien de Neu-1 à la membrane plasmique. AP2 est un hétérotétramère possédant une sous-unité $\mu 2$ se liant au signal d'internalisation de ses protéines cibles [Jarousse et Kelly, 2000]. AP2 est par exemple impliqué dans l'internalisation de récepteurs couplés aux protéines G [Ferguson, 2001]. La phosphorylation de Neu-1 sur ^{412}Y empêche son interaction avec AP2, et bloque par conséquent son internalisation. L'intervention d'un système d'internalisation du complexe récepteur de l'élastine par AP2 n'est donc pas à exclure et pourrait, comme pour les RCPG, constituer un moyen de réguler négativement le signal induit par les peptides d'élastine. De plus, même s'il n'existe pas à notre connaissance de données précises concernant le segment transmembranaire de Neu-1, il est connu que l'acide glutamique en position 394 est impliqué dans le site actif de l'enzyme, situé du coté intralysosomal ou extracellulaire [Seyrantepe et coll., 2003]. Le fait que Neu-1 ne possède que 415 acides aminés, suggère que son segment intracytoplasmique est très court, et qu'il ne pourrait physiquement pas interagir avec d'autres protéines qu'AP2. Il paraît donc peu probable que le récepteur de l'élastine transmette son signal par interaction directe entre Neu-1 et des protéines de signalisation.

Nous nous sommes donc tournés vers la possible implication de l'activité de cette neuraminidase dans la transduction du signal. Hinek [1996] a suggéré que la neuraminidase du récepteur pouvait être activée par la liaison de l'EBP au complexe lors de la synthèse des fibres élastiques. Cependant, ceci n'avait pas été étudié expérimentalement. De plus, il est connu qu'au sein des lysosomes, Neu-1 n'est active que lorsque la β -Gal est associée au complexe β -Gal / PP / Neu-1 [Van der Horst et coll., 1989]. Nous montrons que la kE induit une activité neuraminidase à la membrane plasmique des fibroblastes dermiques. L'éventuelle

participation de la Neu-1 lysosomale dans l'effet observé peut-être exclue car le pH auquel les mesures ont été effectuées est de 6,5 alors qu'au sein de ces organites, cette neuraminidase ne fonctionne qu'à pH acide (4,5) [Achyuthan et Achyuthan, 2001]. L'utilisation de lactose permet de bloquer l'activité enzymatique stimulée par la kE démontrant que l'EBP est impliqué. Ceci suggère également l'activation de la neuraminidase du récepteur.

Afin d'évaluer le rôle potentiel de cette activité dans la transduction du signal du complexe récepteur de l'élastine, nous avons testé l'effet du DANA, inhibiteur de neuraminidase, sur la production de pro-MMP-1 et l'activation de ERK1/2 induites par la kE. Nous montrons que cet agent chimique bloque les deux effets biologiques à la concentration de 400 μ M, dose permettant d'inhiber également l'activité neuraminidase. Nos résultats suggèrent fortement que Neu-1 permet de transduire le signal du complexe récepteur de l'élastine par son activité catalytique. Cependant, afin de prouver réellement ce point, d'autres expériences sont nécessaires. Nous construisons actuellement un mutant Neu-1 dépourvu d'activité catalytique. La transfection de ce mutant dans nos cellules et l'étude de son influence sur l'activation de ERK1-HA induite par les peptides d'élastine, nous permettra d'évaluer précisément le rôle de cette enzyme dans la transduction du signal.

Le rôle d'une neuraminidase dans la transduction du signal est un phénomène connu. La production d'IL-4 par des splénocytes activés par un anticorps anti-CD3 ϵ nécessite l'activité enzymatique de Neu-1. Le traitement de ces mêmes cellules avec de la neuraminidase bactérienne induit la production d'IL-4, sans activation par l'anticorps. De plus, l'activation de cellules T en présence d'inhibiteur de neuraminidase bloque leur production d'IL-4 [Chen et coll., 1997]. Il a également été montré que l'ajout de neuraminidase bactérienne à des fibroblastes dermiques induit leur prolifération [Ogura et Sweeley, 1992]. Il a de plus été récemment montré que l'ajout de neuraminidase à des monocytes résultait dans la désialylation de glycoconjugués non identifiés de la surface cellulaire, induisant l'activation de la voie ERK1/2 [Stamatos et coll., 2003]. Toutes ces données bibliographiques renforcent notre conviction de la participation d'une activité neuraminidase, *a priori* celle de Neu-1, dans la transduction du signal du récepteur de l'élastine.

Afin de comprendre le mécanisme impliqué, nous nous sommes intéressés à un des substrats de Neu-1, le ganglioside GM3 [Seyrantepe et coll., 2003]. Ce ganglioside est impliqué dans la signalisation cellulaire par le fait qu'il est capable de moduler l'activité de

récepteur tel que l'EGF en bloquant sa dimérisation [Miljan et Bremer, 2002]. Cependant, c'est au produit de sa désialylation par Neu-1, le lactosylcéramide, que nous nous sommes intéressé. Le GM3 et le lactosylcéramide sont des constituants lipidiques des radeaux lipidiques [Zajchowski et Robbins, 2002 ; Iwabuchi et Nagaoka, 2002]. Nous avons tout d'abord étudié la localisation membranaire des radeaux lipidiques et de l'EBP par microscopie confocale. Ces expériences révèlent une répartition de l'EBP à la surface cellulaire totalement atypique. En effet, contrairement à un grand nombre de récepteurs répartis de façon homogène à la surface de la cellule, l'EBP semble être concentré en deux amas dans les cellules non stimulées. Par ajout de kE, nous n'observons plus qu'un seul cluster de récepteurs. Dans les deux cas, l'EBP est localisé dans les radeaux lipidiques. Le clustering de récepteurs suite à leur activation est un phénomène connu. Cela a par exemple été observé pour différents récepteurs tels que le CD95, le CD40, le récepteur du TNF, diverses intégrines ou encore le récepteur du PDGF [Gulbins et Grassmé., 2002]. Le point commun à tous ces récepteurs est qu'ils se trouvent dans les radeaux lipidiques. Un mécanisme commun pourrait donc s'appliquer au récepteur de l'élastine. La répartition atypique de l'EBP devra cependant être confirmée par l'utilisation d'un autre anticorps en cours de production au laboratoire.

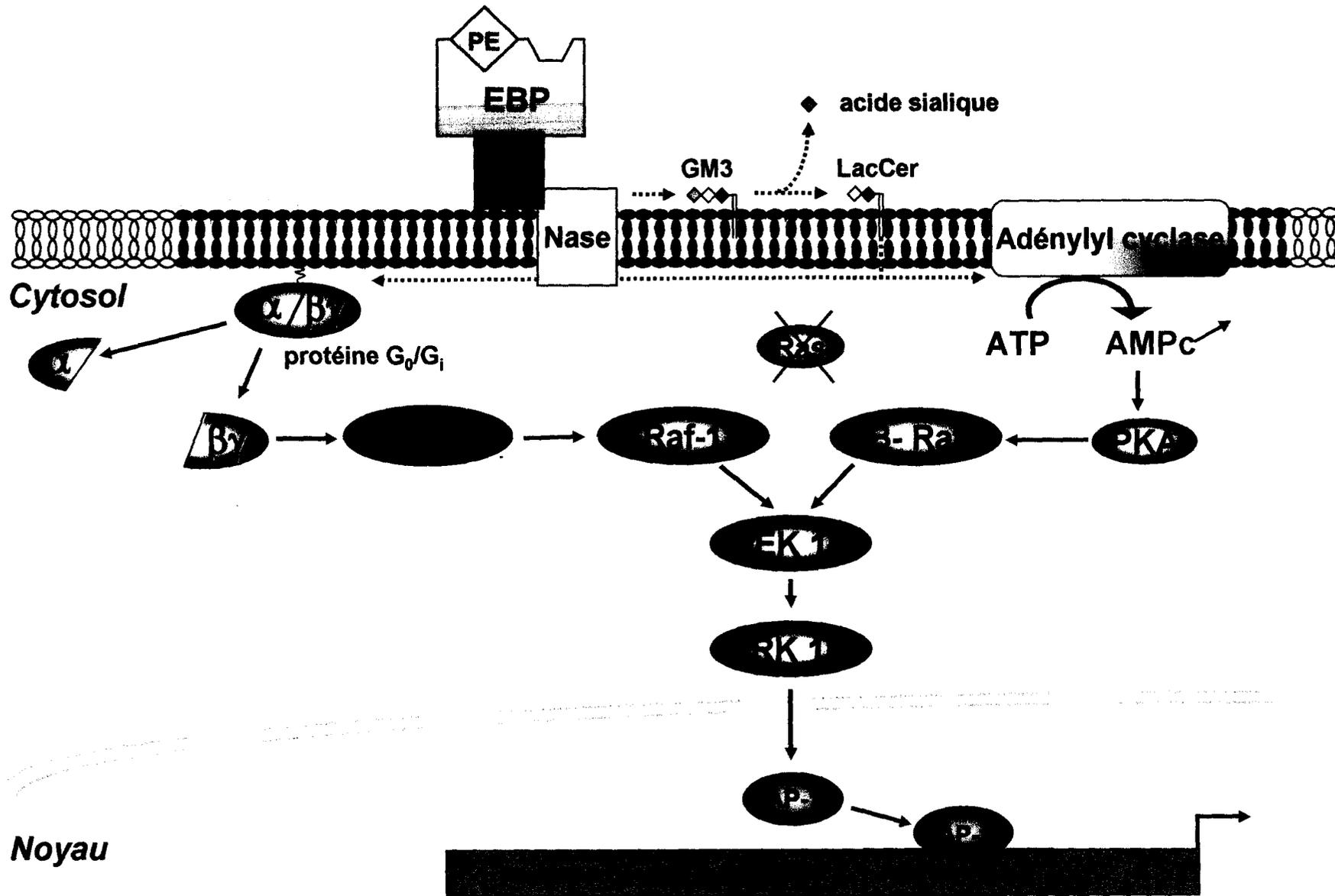
L'utilisation de méthyl- β -cyclodextrine, un agent permettant d'étudier le rôle des radeaux lipidiques par déplétion du cholestérol qu'ils contiennent, nous a permis de mettre en évidence le rôle crucial de ces microdomaines membranaires dans le fonctionnement du récepteur de l'élastine. En effet, à la concentration de 10 mM, cette cyclodextrine bloque totalement la signalisation induite par la kE. Ceci démontre que les radeaux lipidiques sont cruciaux pour le fonctionnement du récepteur. Certaines protéines impliquées, ou potentiellement impliquées dans la signalisation induite par la kE dans les fibroblastes, sont présentes dans les radeaux lipidiques : l'adénylyl cyclase, la PI3K, la famille de protéine G_i en sont autant d'exemples [Zajchowski et Robbins, 2002]. Il a également été montré que le produit de l'action de la PI3K, le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃), s'accumule dans les radeaux lipidiques suite à l'activation du récepteur Fc γ RIIa chez des plaquettes [Bodin et coll., 2003]. Ceci démontre le rôle essentiel des radeaux lipidiques dans la signalisation induite par la PI3K dans ces cellules. L'utilisation de MCD détruisant le lieu d'initiation du signal du récepteur de l'élastine, bloque l'activation de ERK1/2 par la kE.

L'analyse du lactosylcéramide par HPTLC semble montrer que la kE induit une augmentation de synthèse de ce glycolipide. Ce dernier est connu pour induire la prolifération de cellules musculaires lisses d'aorte humaine par l'activation de la voie Raf-1 / MEK1/2 /

ERK1/2 [Bhunia et coll., 1996 ; Bhunia et coll., 1997]. Le lactosylcéramide est par ailleurs produit lors de l'activation de cellules endothéliales par du $\text{TNF}\alpha$, ce qui induit l'expression de NF κ B et ICAM-1. De plus, il est connu que l'ajout de lactosylcéramide à des fibroblastes dermiques induit leur prolifération [Ogura et Sweeley, 1992]. Le lactosylcéramide pouvant être produit par désialylation du GM3 par Neu-1, et l'activation de l'EBP induisant une activité neuraminidase, notre hypothèse est que Neu-1 est activée par les peptides d'élastine, qu'elle cliverait le GM3 en lactosylcéramide, et que ce dernier jouerait un rôle de second messenger pour activer les voies de signalisation du récepteur de l'élastine. Bien entendu, ces résultats préliminaires demandent à être confirmés. En plus de l'utilisation du mutant Neu-1 précité, nous envisageons de mesurer la production de lactosylcéramide par cytométrie de flux, en présence et en absence de DANA et de lactose. Cette technique sensible et fiable nous permettra de valider ou d'infirmer la production EBP- et neuraminidase- dépendantes du lactosylcéramide. L'ajout de ce glycolipide à nos cellules permettra de vérifier son rôle dans l'activation de la voie ERK1/2. Enfin, l'analyse HPTLC ne nous permet pas de conclure quand au devenir du GM3. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre sa partie glycanne devrait permettre de bloquer l'action hypothétique de Neu-1 sur ce ganglioside, et d'étudier son rôle de substrat et de précurseur du lactosylcéramide.

Bien qu'il existe quelques points communs (protéine G sensible à la PTX, activation de la voie ERK1/2), la signalisation induite par les peptides d'élastine semble varier d'un type cellulaire à l'autre. L'hypothèse dépeinte ci-dessus décrit le rôle des radeaux lipidiques et de Neu-1 dans la transduction du signal de ce récepteur. Il est de plus envisageable que la composition protéique des radeaux lipidiques renfermant le complexe récepteur de l'élastine soit variable d'un type cellulaire à l'autre. Si cette hypothèse se confirme, cela pourrait expliquer les différences observées entre les diverses cellules sensibles aux peptides d'élastine en terme de voies de signalisation induites et d'effets biologiques associés.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail est schématisé dans la figure 61.



- 157 -

Figure 61 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine dans les fibroblastes dermiques régulant l'expression de la pro-MMP-1. L'hypothèse du mécanisme de fonctionnement du récepteur se basant sur le rôle de second messenger du lactosylcéramide (LacCer) produit à partir de l'action de la neuraminidase (Nase) du récepteur sur le GM3 est également présentée. Les radeaux lipidiques (en noir) seraient essentiels dans les processus décrits. PE : peptides d'élastine.

Publications et Communications

PUBLICATIONS

1. **Duca L.**, Debelle L., Debret R., Antonicelli F., Hornebeck W. and Haye B.
The elastin peptide-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI₃K-dependent signaling.
FEBS Letters 524, 193–198 (2002)
2. Debret R., El Btaouri H., **Duca, L.**, Rahman I., Radke S., Haye B., Sallenave J.M. and Antonicelli F.
Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells.
FEBS Letters 195-202 (2003)
3. **Duca L.**, Floquet N., Alix A.J.P., Haye B. and Debelle L.
Elastin as a matrikine.
Critical Reviews in Oncology and Hematology 235-244 (2004)
4. **Duca L.**, Lambert E., Debret R., Rothhut B., Blanchevoye C., Delacoux F., Hornebeck W., Martiny L. and Debelle L.
Elastin peptides activate ERK1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110 γ /Raf-1 and PKA/B-Raf signaling.
Molecular Pharmacology (En révision)

ACTES DE CONGRES

1. **Duca L.**, Debelle L, Debret R., Hornebeck W. and Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a cross-talk between PKA, PI3K and ERK signalling pathways.
European Journal of Biochemistry 270 (Supplément 1), 178, 2003.
2. Floquet N., **Duca L.**, Héry-Hyunh S., Moroy G., Dauchez M., Debelle L. and Alix A.J.P.
Structure-function relationships of elastin-derived peptides : determination of a structural motif involved in the peptides-receptor(s) interactions.
In : *ELASTIN 2002*,
Tamburro A.M. and Pepe A. (Eds.),
EditricErmes, Potenza, pp. 103–109, 2003.
3. **Duca L.**, Lambert E., Debret R., Rothhut B., Blanchevoye C., Delacoux F., Hornebeck W., Martiny L. and Debelle L.
ERK1/2 activation by elastin peptides in human skin fibroblasts is Ras-independent and requires both p110 γ /Raf-1 and PKA/B-Raf signaling pathways.
Matrix Biology (sous presse).

COMMUNICATIONS ORALES A DES CONGRES INTERNATIONAUX

L'auteur ayant présenté la communication est souligné.

1. **Duca L.**, Debelle L., Hornebeck W. and Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a MEK/ERK signaling pathway.
First European Symposium ELASTIN 2001,
Reims, France , 10-14 Juillet 2001.
2. Brassart B., Fuchs P., **Duca L.**, Huet E., Alix A.J.P., Wallach J., Tamburro A.M., Delacoux F., Haye B., Emonard H., Hornebeck W. and Debelle L.
Control of extracellular matrix proteolysis by elastin.
XVIIth Latin Meeting on Vascular Research LIAC 2001,
Padoue, Italie, 10 – 13 octobre 2001.
3. **Duca L.**, Debelle L., Delacoux F., Hornebeck W. and Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a cross-talk between PKA, PI3K and MEK/ERK signaling pathways.
Second European Symposium ELASTIN 2002,
Acquafredda di Maratea, Italie, 10 - 14 juillet 2002.
4. Hornebeck W., Huet E., Robinet A., **Duca L.**, Wallach J., Debelle L., Antonicelli F. and Bellon G.
Elastin degradation and tumor progression.
28th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies,
Istanbul, Turquie, 20 – 25 Octobre 2002.
5. **Duca L.**, Lambert E., Debret R., Rothhut B., Blanchevoye C., Delacoux F., Hornebeck W., Martiny L. and Debelle L.
ERK1/2 activation by elastin peptides in human skin fibroblasts is Ras-independent and requires both p110 γ / Raf-1 and PKA / B-Raf signaling pathways.
Third European Symposium ELASTIN 2004,
Manchester, Angleterre, 30 Juin – 3 Juillet 2004.

COMMUNICATIONS ORALES A DES CONGRES NATIONAUX

L'auteur ayant présenté la communication est souligné.

1. **Duca L.**, Debelle L., Delacoux F., Hornebeck W. et Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a MEK/ERK signaling pathway.
XIème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif,
Nantes, France, 15 - 16 mars 2002.

2. Floquet N., Moroy G., **Duca L.**, Héry S., Debelle L., Haye B., Derreumaux P., Dauchez M.
and Alix A.J.P.
Etudes biophysiques de peptides d'élastine. Détermination d'un motif structural impliqué dans l'interaction peptides-récepteur.
Réunion du Réseau Interrégional de Modélisation Moléculaire,
Paris, France, 14 novembre 2002.
3. Floquet N., **Duca L.**, Pasco S., Hery-Huynh S., Nuzillard J.M., Debelle L., Monboisse J.C.
et Alix A.J.P.
Etudes structurales de peptides de la matrice extracellulaire capables de réguler la voie de la MMP-2.
Congrès annuel de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire,
Lyon, France, 4 - 5 novembre 2003.

**COMMUNICATIONS PAR VOIE D'AFFICHE A DES CONGRES
INTERNATIONAUX**

L'auteur ayant présenté la communication est souligné.

1. **Duca L.**, Debelle L., Hornebeck W. and Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a MEK/ERK signaling pathway.
First European Symposium ELASTIN 2001,
Reims, France , 10-14 Juillet 2001.
2. Floquet N., **Duca L.**, Moroy G., Héry S., Debelle L., Dauchez M., Haye B. and Alix A.J.P.
Structure-function relationships of elastin-derived peptides. Determination of a structural motif implicated in the peptides-receptor(s) interactions.
Second European Symposium ELASTIN 2002,
Acquafredda di Maratea, Italie, 10 - 14 juillet 2002.
3. Floquet N., **Duca L.**, Moroy G., Héry S., Debelle L., Dauchez M., Haye B. and Alix A.J.P.
Structure-function relationships of elastin-derived peptides. Determination of a structural motif implicated in the peptide-receptor interactions.
XXVth European Congress on Molecular Spectroscopy,
Villeneuve d'Ascq, France, 1 - 6 septembre 2002.
4. **Duca L.**, Debelle L., Delacoux F., Hornebeck W. and Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a cross-talk between PKA, PI3K and MEK/ERK signaling pathways.
Fourth International Symposium "Collagen and Skin : from basic research to clinic",
Reims, France, 21 - 23 novembre 2002.

5. **Duca L.**, Debret R., Hornebeck W., Haye B. and Debelle L.
Roles of PI3K p110 γ and PKA in elastin peptides induced ERK1/2 pathway activation : Importance of c-Raf and B-Raf.
FEBS Special Meeting on Signal Transduction
Bruxelles, Belgique, 3 - 8 juillet 2003.

COMMUNICATIONS PAR VOIE D’AFFICHE A DES CONGRES NATIONAUX

L'auteur ayant présenté la communication est souligné.

1. **Duca L.**, Debelle L., Delacoux F., Hornebeck W. and Haye B.
The up-regulation of pro-MMP-1 by elastin peptides involves a MEK/ERK signaling pathway.
XIème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif,
Nantes, France, 15 - 16 mars 2002.
2. **Floquet N.**, **Duca L.**, Moroy G., Hery S., Debelle L., Dauchez M., Haye B. et Alix A.J.P.
Relations structure-activité biologique de peptides d'élastine ; étude du peptide CVGVAPGC sous formes ouverte et fermée.
XIème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif,
Nantes, France, 15 - 16 mars 2002.
3. **Blanchevoye C.**, **Duca L.**, Delacoux F., Haye B. et Debelle L.
Clonage, surproduction et purification de l'EBP.
Réunion annuelle de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire,
Lyon, France, 4 – 5 novembre 2003.
4. **Duca L.**, Lambert E., Debret R., Rothhut B., Blanchevoye C., Delacoux F., Hornebeck W., Martiny L. et Debelle L.
Le mécanisme Ras-indépendant d'activation de ERK1/2 par les peptides d'élastine chez les fibroblastes dermiques humains implique les voies p110 γ /Raf-1/MEK1/2 et PKA/B-Raf/MEK1/2.
XIIIème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif,
Arcachon, 25 – 27 Mars 2004.

Références

1. Achyuthan KE and Achyuthan AM (2001) Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**:29-64.
2. Adolphe M et Barlovatz-Meimon G (1988) Culture de fibroblastes, dans *Culture de cellules animales, Méthodologies et applications* (éds INSERM) pp 141-142.
3. Allende ML and Proia RL (2002) Lubricating cell signaling pathways with gangliosides. *Curr Opin Struct Biol* **12**:587-92.
4. Anderson KE and Jackson SP (2003) Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:1028-33.
5. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P and Karin M (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**:729-39.
6. Apte SS, Mattei MG and Olsen BR (1994) Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* **19**:86-90.
7. Archilla-Marcos M and Robert L (1993) Control of the biosynthesis and excretion of the elastase-type protease of human skin fibroblasts by the elastin receptor. *Clin Physiol Biochem* **10**:86-91.
8. Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ and Cerione RA (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**:27995-8.
9. Barnard D, Diaz B, Clawson D and Marshall M (1998) Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene* **17**:1539-47.
10. Barnier JV, Papin C, Eychene A, Lecoq O and Calothy G (1995) The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* **270**:23381-9.
11. Barone LM, Faris B, Chipman SD, Toselli P, Oakes BW and Franzblau C (1985) Alteration of the extracellular matrix of smooth muscle cells by ascorbate treatment. *Biochim Biophys Acta* **840**:245-54.
12. Bashir MM, Abrams WR, Rosenbloom J, Kucich U, Bacarra M, Han MD, Brown-Augsberger P and Mecham R (1994) Microfibril-associated glycoprotein: characterization of the bovine gene and of the recombinantly expressed protein. *Biochemistry* **33**:593-600.
13. Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, Fazio M, Uitto J and Rosenbloom J (1989) Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* **264**:8887-91.

14. Bedell-Hogan D, Trackman P, Abrams W, Rosenbloom J and Kagan H (1993) Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J Biol Chem* **268**:10345-50.
15. Benbow U and Brinckerhoff CE (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* **15**:519-26.
16. Bhunia AK, Arai T, Bulkley G and Chatterjee S (1998) Lactosylceramide mediates tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and the adhesion of neutrophil in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **273**:34349-57.
17. Bhunia AK, Han H, Snowden A and Chatterjee S (1996) Lactosylceramide stimulates Ras-GTP loading, kinases (MEK, Raf), p44 mitogen-activated protein kinase, and c-fos expression in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**:10660-6.
18. Bhunia AK, Han H, Snowden A and Chatterjee S (1997) Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272**:15642-9.
19. Bhunia AK, Schwarzmann G and Chatterjee S (2002) GD3 recruits reactive oxygen species to induce cell proliferation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:16396-402.
20. Bisaccia F, Castiglione-Morelli MA, Spisani S, Ostuni A, Serafini-Fracassini A, Bavoso A and Tamburro AM (1998) The amino acid sequence coded by the rarely expressed exon 26A of human elastin contains a stable beta-turn with chemotactic activity for monocytes. *Biochemistry* **37**:11128-35.
21. Bisaccia F, Morelli MA, De Biasi M, Traniello S, Spisani S and Tamburro AM (1994) Migration of monocytes in the presence of elastolytic fragments of elastin and in synthetic derivatives. Structure-activity relationships. *Int J Pept Protein Res* **44**:332-41.
22. Bissell MJ and Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **1**:46-54.
23. Blood CH, Sasse J, Brodt P and Zetter BR (1988) Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol* **107**:1987-93.
24. Blood CH and Zetter BR (1989) Membrane-bound protein kinase C modulates receptor affinity and chemotactic responsiveness of Lewis lung carcinoma sublines to an elastin-derived peptide. *J Biol Chem* **264**:10614-20.
25. Bode W, Gomis-Ruth FX, Huber R, Zwillig R and Stocker W (1992) Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* **358**:164-7.
26. Bodin S, Tronchere H and Payraastre B (2003) Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta* **1610**:247-57.

27. Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ and Barr RK (2004) Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* **1697**:89-101.
28. Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R and Wymann MP (1998) Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* **282**:293-6.
29. Bonten EJ, Arts WF, Beck M, Covanis A, Donati MA, Parini R, Zammarchi E and d'Azzo A (2000) Novel mutations in lysosomal neuraminidase identify functional domains and determine clinical severity in sialidosis. *Hum Mol Genet* **9**:2715-25.
30. Bos JL (2003) Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:733-8.
31. Brassart B, Fuchs P, Huet E, Alix AJ, Wallach J, Tamburro AM, Delacoux F, Haye B, Emonard H, Hornebeck W and Debelle L (2001) Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* **276**:5222-7.
32. Brassart B (2000) Influence des peptides dérivés de l'élastine sur les expressions des métalloprotéinases matricielles par les fibroblastes dermiques humains et les cellules issues de fibrosarcome humain en culture. *Thèse de Doctorat nouveau régime, Université de Reims Champagne-Ardenne*.
33. Brassart B, Randoux A, Hornebeck W and Emonard H (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Clin Exp Metastasis* **16**:489-500.
34. Bremer EG (1994) in *Current topics in membrane* (Hoekstra D ed) pp 387-411, Academic press.
35. Brettell LM and McGowan SE (1994) Basic fibroblast growth factor decreases elastin production by neonatal rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**:306-15.
36. Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G and Nurnberg B (2003) Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol* **160**:89-99.
37. Brown PL, Mecham L, Tisdale C and Mecham RP (1992) The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. *Biochem Biophys Res Commun* **186**:549-55.
38. Brown-Augsburger P, Broekelmann T, Mecham L, Mercer R, Gibson MA, Cleary EG, Abrams WR, Rosenbloom J and Mecham RP (1994) Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase. *J Biol Chem* **269**:28443-9.

39. Bustelo XR, Suen KL, Leftheris K, Meyers CA and Barbacid M (1994) Vav cooperates with Ras to transform rodent fibroblasts but is not a Ras GDP/GTP exchange factor. *Oncogene* **9**:2405-13.
40. Callahan JW (1999) Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal beta-galactosidase and the non-lysosomal beta-galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta* **1455**:85-103.
41. Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG and Stricklin GP (1986) Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:2407-11.
42. Carrere S, Verger A, Flourens A, Stehelin D and Duterque-Coquillaud M (1998) Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* **16**:3261-8.
43. Carrillo MB, Milner CM, Ball ST, Snoek M and Campbell RD (1997) Cloning and characterization of a sialidase from the murine histocompatibility-2 complex: low levels of mRNA and a single amino acid mutation are responsible for reduced sialidase activity in mice carrying the Neula allele. *Glycobiology* **7**:975-86.
44. Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**:563-72.
45. Chatterjee S (1998) Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**:1523-33.
46. Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS and Brugge JS (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* **10**:551-4.
47. Chen XP, Ding X and Daynes RA (2000) Ganglioside control over IL-4 priming and cytokine production in activated T cells. *Cytokine* **12**:972-85.
48. Chen XP, Enioutina EY and Daynes RA (1997) The control of IL-4 gene expression in activated murine T lymphocytes: a novel role for neu-1 sialidase. *J Immunol* **158**:3070-80.
49. Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T and Hidaka H (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* **265**:5267-72.
50. Chiloeches A, Mason CS and Marais R (2001) S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* **21**:2423-34.
51. Chong H, Vikis HG and Guan KL (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* **15**:463-9.

52. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J and Baselga J (1999) Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* **59**:1196-201.
53. Cormack BP, Valdivia RH and Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-8.
54. Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF and Keating MT (1993) The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell* **73**:159-68.
55. Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quagliano D, Jr. and Giro M (1997) Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem* **272**:345-52.
56. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR and Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-54.
57. Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**:95-105.
58. Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ and Meiningner GA (2000) Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol* **156**:1489-98.
59. Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52.
60. Davison IG, Wright GM and DeMont ME (1995) The structure and physical properties of invertebrate and primitive vertebrate arteries. *J Exp Biol* **198** (Pt **10**):2185-96.
61. Debelle L and Tamburro AM (1999) Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* **31**:261-72.
62. Debelle L and Alix AJ (1999) The structures of elastins and their function. *Biochimie* **81**:981-94.
63. Debelle L, Alix AJ, Wei SM, Jacob MP, Huvenne JP, Berjot M and Legrand P (1998) The secondary structure and architecture of human elastin. *Eur J Biochem* **258**:533-9.
64. Delany AM, Gabbitas BY and Canalis E (1995) Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem* **57**:488-94.

65. Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV and Strongin AY (2002) Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **277**:9749-56.
66. Dhillon AS and Kolch W (2002) Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* **404**:3-9.
67. Diaz B, Barnard D, Filson A, MacDonald S, King A and Marshall M (1997) Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol* **17**:4509-16.
68. Domin J, Dhand R and Waterfield MD (1996) Binding to the platelet-derived growth factor receptor transiently activates the p85alpha-p110alpha phosphoinositide 3-kinase complex in vivo. *J Biol Chem* **271**:21614-21.
69. Doyle GA, Pierce RA and Parks WC (1997) Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and an upstream C/EBP-beta site. *J Biol Chem* **272**:11840-9.
70. Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B and Debelle L (2004) Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:235-44.
71. Eferl R and Wagner EF (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**:859-68.
72. Egeblad M and Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**:161-74.
73. English JM and Cobb MH (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* **23**:40-5.
74. Ewart AK, Jin W, Atkinson D, Morris CA and Keating MT (1994) Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *J Clin Invest* **93**:1071-7.
75. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M and Keating MT (1993) Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* **5**:11-6.
76. Faris B, Ferrera R, Toselli P, Nambu J, Gonnerman WA and Franzblau C (1984) Effect of varying amounts of ascorbate on collagen, elastin and lysyl oxidase synthesis in aortic smooth muscle cell cultures. *Biochim Biophys Acta* **797**:71-5.
77. Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T, Jr., Jacob MP, Mecham RP, Robert L and Verdeti J (1998) Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res* **82**:328-36.
78. Fazio MJ, Kahari VM, Bashir MM, Saitta B, Rosenbloom J and Uitto J (1990) Regulation of elastin gene expression: evidence for functional promoter activity in the 5'-flanking region of the human gene. *J Invest Dermatol* **94**:191-6.

79. Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**:1-24.
80. Fields TA and Casey PJ (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* **321** (Pt 3):561-71.
81. Fivaz M, Abrami L and van der Goot FG (1999) Landing on lipid rafts. *Trends Cell Biol* **9**:212-3.
82. Fridriksson EK, Shipkova PA, Sheets ED, Holowka D, Baird B and McLafferty FW (1999) Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry* **38**:8056-63.
83. Friedrichson T and Kurzchalia TV (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**:802-5.
84. Fulop T, Jr., Jacob MP, Varga Z, Foris G, Leovey A and Robert L (1986) Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca²⁺ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **141**:92-8.
85. Fulop T, Jr., Wei SM, Robert L and Jacob MP (1990) Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA. *Clin Physiol Biochem* **8**:273-82.
86. Fulop T and Larbi A (2002) Putative role of 67 kDa elastin-laminin receptor in tumor invasion. *Semin Cancer Biol* **12**:219-29.
87. Gallo KA and Johnson GL (2002) Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:663-72.
88. Garcia J, de Gunzburg J, Eychene A, Gisselbrecht S and Porteu F (2001) Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol Cell Biol* **21**:2659-70.
89. Ghuysen-Itard AF, Robert L and Jacob MP (1992) [Effect of elastin peptides on cell proliferation]. *C R Acad Sci III* **315**:473-8.
90. Gomis-Ruth FX (2003) Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol* **24**:157-202.
91. Gong N, Wei H, Chowdhury SH and Chatterjee S (2004) Lactosylceramide recruits PKC α /epsilon and phospholipase A2 to stimulate PECAM-1 expression in human monocytes and adhesion to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6490-5.
92. Gordon JA (1991) Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* **201**:477-82.
93. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C and Shi YE (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* **271**:30375-80.

94. Grosso LE and Scott M (1993a) PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine and human tropoelastin, is chemotactic for neutrophils and Lewis lung carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* **305**:401-4.
95. Grosso LE and Scott M (1993b) PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine tropoelastin, is a ligand for the 67-kDa bovine elastin receptor. *Matrix* **13**:157-64.
96. Gulbins E and Grassme H (2002) Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta* **1585**:139-45.
97. Gururajan R, Lahti JM, Grenet J, Easton J, Gruber I, Ambros PF and Kidd VJ (1998) Duplication of a genomic region containing the Cdc2L1-2 and MMP21-22 genes on human chromosome 1p36.3 and their linkage to D1Z2. *Genome Res* **8**:929-39.
98. Gutkind JS (2000) Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* **2000**:RE1.
99. Hagemann C and Rapp UR (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* **253**:34-46.
100. Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK and Thompson RW (2002) Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg* **35**:254-61.
101. Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM and Mainardi CL (1990) Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **265**:11421-4.
102. Hauck M, Seres I, Kiss I, Saulnier J, Mohacsi A, Wallach J and Fulop T, Jr. (1995) Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes. *Biochem Mol Biol Int* **37**:45-55.
103. Hayne C, Tzivion G and Luo Z (2000) Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem* **275**:31876-82.
104. Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P and Schonbeck U (2001) Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* **107**:1117-26.
105. Herrlich A, Kuhn B, Grosse R, Schmid A, Schultz G and Gudermann T (1996) Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem* **271**:16764-72.
106. Hew Y, Grzelczak Z, Lau C and Keeley FW (1999) Identification of a large region of secondary structure in the 3'-untranslated region of chicken elastin mRNA with implications for the regulation of mRNA stability. *J Biol Chem* **274**:14415-21.
107. Hinek A (1996) Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biol Chem* **377**:471-80.

108. Hinek A, Jung S and Rutka JT (1999) Cell surface aggregation of elastin receptor molecules caused by suramin amplified signals leading to proliferation of human glioma cells. *Acta Neuropathol (Berl)* **97**:399-407.
109. Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP and Baronides SH (1988) The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science* **239**:1539-41.
110. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F and Wymann MP (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**:1049-53.
111. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN and Ruiter DJ (2000) Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* **115**:337-44.
112. Hooper NM (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**:1-6.
113. Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC and Bellon G (2002) Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* **12**:231-41.
114. Houslay MD and Kolch W (2000) Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* **58**:659-68.
115. Hsu-Wong S, Katchman SD, Ledo I, Wu M, Khillan J, Bashir MM, Rosenbloom J and Uitto J (1994) Tissue-specific and developmentally regulated expression of human elastin promoter activity in transgenic mice. *J Biol Chem* **269**:18072-5.
116. Hu MC, Wang YP, Mikhail A, Qiu WR and Tan TH (1999) Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J Biol Chem* **274**:7095-102.
117. Huang S, Jiang Y, Li Z, Nishida E, Mathias P, Lin S, Ulevitch RJ, Nemerow GR and Han J (1997) Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity* **6**:739-49.
118. Hunter T (1995) When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* **83**:1-4.
119. Hurley JH (1999) Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **274**:7599-602.
120. Huser M, Lockett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun XM, Brown J, Marais R and Pritchard C (2001) MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* **20**:1940-51.
121. Iacovelli L, Sallese M, Mariggio S and de Blasi A (1999) Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Faseb J* **13**:1-8.
122. Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Kucich U, Abrams W, Rosenbloom JC and Rosenbloom J (1989) Structure of the elastin gene and alternative splicing of elastin mRNA: implications for human disease. *Am J Med Genet* **34**:81-90.

123. Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Sheppard P, Anderson N, Rosenbloom JC, Peltonen L and Rosenbloom J (1987a) Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:5680-4.
124. Indik Z, Yoon K, Morrow SD, Cicila G, Rosenbloom J and Ornstein-Goldstein N (1987b) Structure of the 3' region of the human elastin gene: great abundance of Alu repetitive sequences and few coding sequences. *Connect Tissue Res* **16**:197-211.
125. Inoue T, Yashiro M, Nishimura S, Maeda K, Sawada T, Ogawa Y, Sowa M and Chung KH (1999) Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* **4**:73-7.
126. Ip YT and Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**:205-19.
127. Isshiki M and Anderson RG (1999) Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium* **26**:201-8.
128. Ito T, Ito M, Shiozawa J, Naito S, Kanematsu T and Sekine I (1999) Expression of the MMP-1 in human pancreatic carcinoma: relationship with prognostic factor. *Mod Pathol* **12**:669-74.
129. Iwabuchi K and Nagaoka I (2002) Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood* **100**:1454-64.
130. Jacob MP (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* **57**:195-202.
131. Jacob MP, Fulop T, Jr., Foris G and Robert L (1987) Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:995-9.
132. Jacob MP and Hornebeck W (1985) Isolation and characterization of insoluble and kappa-elastins. *Front Matrix Biol* **10**:92-129.
133. Jaffer ZM and Chernoff J (2002) p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* **34**:713-7.
134. Jarousse N and Kelly RB (2000) Selective inhibition of adaptor complex-mediated vesiculation. *Traffic* **1**:378-84.
135. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S and Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* **271**:17920-6.
136. Johansson N, Ahonen M and Kahari VM (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* **57**:5-15.

137. Johansson N and Kahari VM (2000) Matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* **15**:225-37.
138. Johnson DJ, Robson P, Hew Y and Keeley FW (1995) Decreased elastin synthesis in normal development and in long-term aortic organ and cell cultures is related to rapid and selective destabilization of mRNA for elastin. *Circ Res* **77**:1107-13.
139. Johnson GL and Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**:1911-2.
140. Jung S, Rutka JT and Hinek A (1998) Tropoelastin and elastin degradation products promote proliferation of human astrocytoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**:439-48.
141. Kagan HM and Sullivan KA (1982) Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. *Methods Enzymol* **82 Pt A**:637-50.
142. Kagan HM, Vaccaro CA, Bronson RE, Tang SS and Brody JS (1986) Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *J Cell Biol* **103**:1121-8.
143. Kahari VM, Chen YQ, Bashir MM, Rosenbloom J and Uitto J (1992a) Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *J Biol Chem* **267**:26134-41.
144. Kahari VM, Olsen DR, Rhudy RW, Carrillo P, Chen YQ and Uitto J (1992b) Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation. *Lab Invest* **66**:580-8.
145. Kahari VM and Saarialho-Kere U (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* **6**:199-213.
146. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H and Seiki M (2001) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* **153**:893-904.
147. Kamisato S, Uemura Y, Takami N and Okamoto K (1997) Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis. *J Biochem (Tokyo)* **121**:862-7.
148. Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B and Hornebeck W (1995) Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun* **3**:273-81.
149. Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, Ogilvie L, Hedley D, Martin J, Marshall CJ, Springer CJ and Marais R (2004) B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*.
150. Karin M, Liu Z and Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:240-6.

151. Keesler GA, Bray J, Hunt J, Johnson DA, Gleason T, Yao Z, Wang SW, Parker C, Yamane H, Cole C and Lichenstein HS (1998) Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expr Purif* **14**:221-8.
152. Kielty CM, Sherratt MJ and Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* **115**:2817-28.
153. Kim OS, Park EJ, Joe EH and Jou I (2002) JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem* **277**:40594-601.
154. King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S and Marshall MS (1998) The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* **396**:180-3.
155. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsiichlis PN and Brugge JS (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* **17**:4406-18.
156. Koch WJ, Hawes BE, Allen LF and Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12706-10.
157. Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR and Rosenbloom J (2002) Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**:183-8.
158. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC and Young PR (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* **235**:533-8.
159. Kuroda K and Shinkai H (1997) Differential regulations of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in dermal fibroblasts by dibutyryl cyclic AMP. *J Dermatol Sci* **15**:95-100.
160. Lambert E, Dasse E, Haye B and Petitfrere E (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:187-98.
161. Landolfi NF and Cook RG (1986) Activated T-lymphocytes express class I molecules which are hyposialylated compared to other lymphocyte populations. *Mol Immunol* **23**:297-309.
162. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP and Edwards DR (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* **269**:9352-60.
163. Lee JS, See RH, Deng T and Shi Y (1996) Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol Cell Biol* **16**:4312-26.

164. Leever SJ, Vanhaesebroeck B and Waterfield MD (1999) Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* **11**:219-25.
165. Leppa S, Saffrich R, Ansorge W and Bohmann D (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *Embo J* **17**:4404-13.
166. Lewis TS, Shapiro PS and Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**:49-139.
167. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E and Keating MT (1998) Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* **393**:276-80.
168. Li DY, Toland AE, Boak BB, Atkinson DL, Ensing GJ, Morris CA and Keating MT (1997) Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* **6**:1021-8.
169. Li R, Liu Y and Ladisch S (2001a) Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of SRC kinase by gangliosides. *J Biol Chem* **276**:42782-92.
170. Li Y, Tennekoon GI, Birnbaum M, Marchionni MA and Rutkowski JL (2001b) Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci* **17**:761-7.
171. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV and Wu D (2000) Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* **287**:1046-9.
172. Liotta LA, Steeg PS and Stetler-Stevenson WG (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64**:327-36.
173. Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM and Webster NJ (2002) Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem* **277**:32099-108.
174. Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G and Lopez-Otin C (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* **59**:2570-6.
175. Long MM, King VJ, Prasad KU, Freeman BA and Urry DW (1989) Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* **140**:512-8.
176. Long MM, King VJ, Prasad KU and Urry DW (1988) Chemotaxis of fibroblasts toward nonapeptide of elastin. *Biochim Biophys Acta* **968**:300-11.
177. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS and Wetzker R (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* **275**:394-7.

178. Lowery MC, Morris CA, Ewart A, Brothman LJ, Zhu XL, Leonard CO, Carey JC, Keating M and Brothman AR (1995) Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am J Hum Genet* **57**:49-53.
179. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75.
180. Lukong KE, Landry K, Elsliger MA, Chang Y, Lefrancois S, Morales CR and Pshezhetsky AV (2001a) Mutations in sialidosis impair sialidase binding to the lysosomal multienzyme complex. *J Biol Chem* **276**:17286-90.
181. Lukong KE, Seyrantepe V, Landry K, Trudel S, Ahmad A, Gahl WA, Lefrancois S, Morales CR and Pshezhetsky AV (2001b) Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **276**:46172-81.
182. Malvagia S, Morrone A, Caciotti A, Bardelli T, d'Azzo A, Ancora G, Zammarchi E and Donati MA (2004) New mutations in the PPBG gene lead to loss of PPCA protein which affects the level of the beta-galactosidase/neuraminidase complex and the EBP-receptor. *Mol Genet Metab* **82**:48-55.
183. Marti A, Luo Z, Cunningham C, Ohta Y, Hartwig J, Stossel TP, Kyriakis JM and Avruch J (1997) Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem* **272**:2620-8.
184. Mas VM, Hernandez H, Plo I, Bezombes C, Maestre N, Quillet-Mary A, Filomenko R, Demur C, Jaffrezou JP and Laurent G (2003) Protein kinase Czeta mediated Raf-1/extracellular-regulated kinase activation by daunorubicin. *Blood* **101**:1543-50.
185. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ and Marais R (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* **18**:2137-48.
186. Matozaki T, Nakanishi H and Takai Y (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* **12**:515-24.
187. Mauviel A, Chen YQ, Kahari VM, Ledo I, Wu M, Rudnicka L and Uitto J (1993) Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **268**:6520-4.
188. Mecham RP and Davis EC (1994) Elastic fiber structure and assembly, in *Extracellular matrix assembly and structure* (Yurvhenko PD, Birk DE et Mecham RP eds) pp 281-344, New York, Academic Press.
189. Mecham RP (1991) Elastin synthesis and fiber assembly. *Ann N Y Acad Sci* **624**:137-46.

190. Mecham RP, Hinek A, Entwistle R, Wrenn DS, Griffin GL and Senior RM (1989a) Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry* **28**:3716-22.
191. Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM and Liotta LA (1989b) The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem* **264**:16652-7.
192. Mercer KE and Pritchard CA (2003) Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* **1653**:25-40.
193. Meuillet EJ, Kroes R, Yamamoto H, Warner TG, Ferrari J, Mania-Farnell B, George D, Rebbaa A, Moskal JR and Bremer EG (1999) Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431. *Cancer Res* **59**:234-40.
194. Meuillet EJ, Mania-Farnell B, George D, Inokuchi JI and Bremer EG (2000) Modulation of EGF receptor activity by changes in the GM3 content in a human epidermoid carcinoma cell line, A431. *Exp Cell Res* **256**:74-82.
195. Miles MJ and McMaster TJ (1993) Protein assemblies and single molecules imaged by STM, in *STM and SFM in biology* (Marti O et Amrein M eds) pp 177-204, San Diego, Academic Press.
196. Miljan EA and Bremer EG (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE* **2002**:RE15.
197. Minden A and Karin M (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* **1333**:F85-104.
198. Mochizuki S, Brassart B and Hinek A (2002) Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:44854-63.
199. Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT and d'Azzo A (1989) Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem* **264**:20655-63.
200. Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS and Banda MJ (2000) Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J Biol Chem* **275**:1384-90.
201. Muiznieks LD, Jensen SA and Weiss AS (2003) Structural changes and facilitated association of tropoelastin. *Arch Biochem Biophys* **410**:317-23.
202. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT and Fothergill JE (1996) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* **2**:461-2.
203. Nagase H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* **378**:151-60.

204. Nagase H, Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Chung L, Bode W, Maskos K and Brew K (1999) Engineering of selective TIMPs. *Ann N Y Acad Sci* **878**:1-11.
205. Nagata K, Puls A, Futter C, Aspenstrom P, Schaefer E, Nakata T, Hirokawa N and Hall A (1998) The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *Embo J* **17**:149-58.
206. Nath D, Williamson NJ, Jarvis R and Murphy G (2001) Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* **114**:1213-20.
207. Netzer KO, Suzuki K, Itoh Y, Hudson BG and Khalifah RG (1998) Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. *Protein Sci* **7**:1340-51.
208. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM and Mareel M (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* **114**:111-118.
209. Noel A, Emonard H, Polette M, Birembaut P and Foidart JM (1994) Role of matrix, fibroblasts and type IV collagenases in tumor progression and invasion. *Pathol Res Pract* **190**:934-41.
210. Norum JH, Hart K and Levy FO (2003) Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT4(b) and 5-HT7(a). *J Biol Chem* **278**:3098-104.
211. Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W and Bernard P (2004) Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* **122**:256-65.
212. Ogura K and Sweeley CC (1992) Mitogenic effects of bacterial neuroaminidase and lactosylceramide on human cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* **199**:169-73.
213. O'Hagan RC, Tozer RG, Symons M, McCormick F and Hassell JA (1996) The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* **13**:1323-33.
214. Okkenhaug K and Vanhaesebroeck B (2003) PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* **3**:317-30.
215. Olson TM, Michels VV, Urban Z, Csiszar K, Christiano AM, Driscoll DJ, Feldt RH, Boyd CD and Thibodeau SN (1995) A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* **4**:1677-9.
216. Ono K and Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**:1-13.

217. Ooyama T, Fukuda K, Oda H, Nakamura H and Hikita Y (1987) Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. *Arteriosclerosis* **7**:593-8.
218. Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G and Eychene A (1998) Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *J Biol Chem* **273**:24939-47.
219. Paratcha G and Ibanez CF (2002) Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol* **12**:542-9.
220. Pardo A and Selman M (1999) Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: the role of metalloproteinases in lung damage. *Histol Histopathol* **14**:227-33.
221. Parks WC, Secrist H, Wu LC and Mecham RP (1988) Developmental regulation of tropoelastin isoforms. *J Biol Chem* **263**:4416-23.
222. Parton RG, Joggerst B and Simons K (1994) Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **127**:1199-215.
223. Partridge SM, Davis HF and Adair GS (1955) The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J* **61**:11-21.
224. Paruchuri S, Hallberg B, Juhas M, Larsson C and Sjolander A (2002) Leukotriene D(4) activates MAPK through a Ras-independent but PKCepsilon-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J Cell Sci* **115**:1883-93.
225. Pasco S, Ramont L, Maquart FX and Monboisse JC (2004) Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:221-33.
226. Pasquali-Ronchetti I and Baccarani-Contri M (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* **38**:428-35.
227. Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M, Fornieri C, Mori G and Quaglino D (1993) Structure and composition of the elastin fibre in normal and pathological conditions. *Micron*, **24**:75-89.
228. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ and Black RA (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**:1281-4.
229. Peterszegi G, Texier S and Robert L (1999) Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur J Clin Invest* **29**:166-72.
230. Pierce RA, Mariencheck WI, Sandefur S, Crouch EC and Parks WC (1995) Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am J Physiol* **268**:L491-500.

231. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G and et al. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**:2419-23.
232. Privitera S, Prody CA, Callahan JW and Hinek A (1998) The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem* **273**:6319-26.
233. Qiu W, Zhuang S, von Lintig FC, Boss GR and Pilz RB (2000) Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* **275**:31921-9.
234. Rameh LE and Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**:8347-50.
235. Reiser K, McCormick RJ and Rucker RB (1992) Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J* **6**:2439-49.
236. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I and Uitto J (1994) Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *Biochem J* **302** (Pt 2):331-3.
237. Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J and Kahari VM (2002) Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem* **277**:32360-8.
238. Reunanen N, Westermarck J, Hakkinen L, Holmstrom TH, Elo I, Eriksson JE and Kahari VM (1998) Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* **273**:5137-45.
239. Rich CB, Fontanilla MR, Nugent M and Foster JA (1999) Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an AP1/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter. *J Biol Chem* **274**:33433-9.
240. Rich CB, Goud HD, Bashir M, Rosenbloom J and Foster JA (1993) Developmental regulation of aortic elastin gene expression involves disruption of an IGF-I sensitive repressor complex. *Biochem Biophys Res Commun* **196**:1316-22.
241. Robinson MJ and Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**:180-6.
242. Robinet A (2003) Régulation de l'expression et/ou de l'activation de la gélatinase A par deux peptides issus de la thrombospondine et de l'élastine : Implication dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse. *Thèse de Doctorat nouveau régime, Université de Reims Champagne-Ardenne*.
243. Roche S, Downward J, Raynal P and Courtneidge SA (1998) A function for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* **18**:7119-29.

244. Rosenbloom J, Abrams WR and Mecham R (1993) Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J* **7**:1208-18.
245. Rosenbloom J, Bashir M, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Fazio M, Kahari VM and Uitto J (1991) Regulation of elastin gene expression. *Ann N Y Acad Sci* **624**:116-36.
246. Rosenbloom J and Cywinski A (1976) Inhibition of proline hydroxylation does not inhibit secretion of tropoelastin by chick aorta cells. *FEBS Lett* **65**:246-50.
247. Ross R and Bornstein P (1969) The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol* **40**:366-81.
248. Rusnati M, Tanghetti E, Urbinati C, Tulipano G, Marchesini S, Ziche M and Presta M (1999) Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. *Mol Biol Cell* **10**:313-27.
249. Sage H and Gray WR (1979) Studies on the evolution of elastin--I. Phylogenetic distribution. *Comp Biochem Physiol B* **64**:313-27.
250. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A and Penninger JM (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287**:1040-6.
251. Saunders NA and Grant ME (1984) Elastin biosynthesis in chick-embryo arteries. Studies on the intracellular site of synthesis of tropoelastin. *Biochem J* **221**:393-400.
252. Schenk S and Quaranta V (2003) Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol* **13**:366-75.
253. Schmitt JM and Stork PJ (2002) Galpha and Gbeta gamma require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and Ras. *J Biol Chem* **277**:43024-32.
254. Seidel MG, Klinger M, Freissmuth M and Holler C (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**:25833-41.
255. Senior RM, Griffin GL and Mecham RP (1980) Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* **66**:859-62.
256. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU and Urry DW (1984) Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol* **99**:870-4.
257. Senior RM, Hinek A, Griffin GL, Pipoly DJ, Crouch EC and Mecham RP (1989) Neutrophils show chemotaxis to type IV collagen and its 7S domain and contain a 67 kD type IV collagen binding protein with lectin properties. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1**:479-87.
258. Seyrantepe V, Poupetova H, Froissart R, Zobot MT, Maire I and Pshezhetsky AV (2003) Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis. *Hum Mutat* **22**:343-52.

259. Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* **10**:602-8.
260. Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y and Yates PR (1997) The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* **29**:1371-87.
261. Shin JS, Gao Z and Abraham SN (2000) Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* **289**:785-8.
262. Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B and Martiny L (2004) Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:245-58.
263. Simons K and Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:31-9.
264. Smart EJ, Ying Y, Donzell WC and Anderson RG (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* **271**:29427-35.
265. Stamatos NM, Curreli S, Zella D and Cross AS (2004) Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related kinases ERK 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines. *J Leukoc Biol* **75**:307-13.
266. Steffensen B, Hakkinen L and Larjava H (2001) Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**:373-98.
267. Stein RB and Hanauer SB (2000) Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* **23**:429-48.
268. Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P and Hawkins PT (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**:105-14.
269. Sternlicht MD and Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:463-516.
270. Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Schumacher B, Frank S, Ruegg MA, Engel J and Kammerer RA (2001) The laminin-binding domain of agrin is structurally related to N-TIMP-1. *Nat Struct Biol* **8**:705-9.
271. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC and Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* **264**:17374-8.
272. Stork PJ and Schmitt JM (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* **12**:258-66.

273. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B and et al. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**:690-3.
274. Suire S, Hawkins P and Stephens L (2002) Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Curr Biol* **12**:1068-75.
275. Suki B, Lutchen KR and Ingenito EP (2003) On the progressive nature of emphysema: roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med* **168**:516-21.
276. Sun H, King AJ, Diaz HB and Marshall MS (2000) Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol* **10**:281-4.
277. Tajima S, Wachi H, Uemura Y and Okamoto K (1997) Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **289**:489-92.
278. Takeda H, Matozaki T, Takada T, Noguchi T, Yamao T, Tsuda M, Ochi F, Fukunaga K, Inagaki K and Kasuga M (1999) PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *Embo J* **18**:386-95.
279. Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M and Read AP (1997) Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* **6**:1029-36.
280. Tassabehji M, Metcalfe K, Fergusson WD, Carette MJ, Dore JK, Donnai D, Read AP, Proschel C, Gutowski NJ, Mao X and Sheer D (1996) LIM-kinase deleted in Williams syndrome. *Nat Genet* **13**:272-3.
281. Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR and Lassam NJ (1996) MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J* **15**:7026-35.
282. Timar J, Lapis K, Fulop T, Varga ZS, Tixier JM, Robert L and Hornebeck W (1991) Interaction between elastin and tumor cell lines with different metastatic potential; in vitro and in vivo studies. *J Cancer Res Clin Oncol* **117**:232-8.
283. Tinker D, Romero-Chapman N, Reiser K, Hyde D and Rucker R (1990) Elastin metabolism during recovery from impaired crosslink formation. *Arch Biochem Biophys* **278**:326-32.
284. Toker A and Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**:673-6.
285. Travis J and Salvesen GS (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* **52**:655-709.

286. Uemura Y and Okamoto K (1997) Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. *Biochem Mol Biol Int* **41**:1085-92.
287. Uitto J, Fazio M, Bashir M and Rosenbloom J (1991) Elastic Fibers of the connective tissue, in *Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of the skin* (Goldsmith LA ed) pp530-557, Oxford University Press, New York.
288. Uitto J and Ryhänen LJ (1987) Pathology of the elastic fibers, in *Connective tissue disease : molecular pathology of the extracellular matrix* (Uitto T and Perejda AJ eds) pp399-422, Dekker, New York.
289. Uitto J (1979) Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J Invest Dermatol* **72**:1-10.
290. Uitto J, Hoffmann HP and Prockop DJ (1976) Synthesis of elastin and procollagen by cells from embryonic aorta. Differences in the role of hydroxyproline and the effects of proline analogs on the secretion of the two proteins. *Arch Biochem Biophys* **173**:187-200.
291. Urry DW, Sugano H, Prasad KU, Long MM and Bhatnagar RS (1979) Prolyl hydroxylation of the polypentapeptide model of elastin impairs fiber formation. *Biochem Biophys Res Commun* **90**:194-8.
292. Van Brocklyn J, Bremer EG and Yates AJ (1993) Gangliosides inhibit platelet-derived growth factor-stimulated receptor dimerization in human glioma U-1242MG and Swiss 3T3 cells. *J Neurochem* **61**:371-4.
293. van der Horst GT, Galjart NJ, d'Azzo A, Galjaard H and Verheijen FW (1989) Identification and in vitro reconstitution of lysosomal neuraminidase from human placenta. *J Biol Chem* **264**:1317-22.
294. Vanhaesebroeck B, Higashi K, Raven C, Welham M, Anderson S, Brennan P, Ward SG and Waterfield MD (1999) Autophosphorylation of p110delta phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *Embo J* **18**:1292-302.
295. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ and Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**:535-602.
296. Varga Z, Jacob MP, Csongor J, Robert L, Leovey A and Fulop T, Jr. (1990) Altered phosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly. *Mech Ageing Dev* **52**:61-70.
297. Varga Z, Jacob MP, Robert L, Csongor J and Fulop T, Jr. (1997) Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis. *Exp Gerontol* **32**:653-62.
298. Varga Z, Jacob MP, Robert L and Fulop T, Jr. (1989) Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Lett* **258**:5-8.

299. Varga Z, Kovacs EM, Paragh G, Jacob MP, Robert L and Fulop T, Jr. (1988) Effect of elastin peptides and N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine on cytosolic free calcium in polymorphonuclear leukocytes of healthy middle-aged and elderly subjects. *Clin Biochem* **21**:127-30.
300. Varma R and Mayor S (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**:798-801.
301. Vecchi M, Rudolph-Owen LA, Brown CL, Dempsey PJ and Carpenter G (1998) Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin. *J Biol Chem* **273**:20589-95.
302. Versteeg HH, Evertzen MW, van Deventer SJ and Peppelenbosch MP (2000) The role of phosphatidylinositide-3-kinase in basal mitogen-activated protein kinase activity and cell survival. *FEBS Lett* **465**:69-73.
303. Vincenti MP (2001) The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol Biol* **151**:121-48.
304. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U and Brinckerhoff CE (1996) Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**:391-411.
305. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY and Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**:5241-8.
306. Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**:73-82.
307. Vrhovski B and Weiss AS (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**:1-18.
308. Westermarck J, Holmstrom T, Ahonen M, Eriksson JE and Kahari VM (1998) Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38. *Matrix Biol* **17**:547-57.
309. Westermarck J and Kahari VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* **13**:781-92.
310. Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J and Kahari VM (2001) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol* **21**:2373-83.
311. Westermarck J, Seth A and Kahari VM (1997) Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* **14**:2651-60.

312. Wetzker R and Rommel C (2004) Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des* **10**:1915-22.
313. Whitmarsh AJ and Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**:589-607.
314. Woessner JF (1998) The matrix metalloproteinase family, in *Matrix Metalloproteinase* (Parks WC et Mecham RP eds) pp1-14, San Diego, Academic press.
315. Wrenn DS, Hinek A and Mecham RP (1988) Kinetics of receptor-mediated binding of tropoelastin to ligament fibroblasts. *J Biol Chem* **263**:2280-4.
316. Wymann MP and Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* **1436**:127-50.
317. Yart A, Chap H and Raynal P (2002) Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim Biophys Acta* **1582**:107-11.
318. Yusa T, Blood CH and Zetter BR (1989) Tumor cell interactions with elastin: implications for pulmonary metastasis. *Am Rev Respir Dis* **140**:1458-62.
319. Zajchowski LD and Robbins SM (2002) Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem* **269**:737-52.
320. Zang M, Waelde CA, Xiang X, Rana A, Wen R and Luo Z (2001) Microtubule integrity regulates Pak leading to Ras-independent activation of Raf-1. insights into mechanisms of Raf-1 activation. *J Biol Chem* **276**:25157-65.
321. Zhang BH and Guan KL (2000) Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* **19**:5429-39.
322. Zhang M, Pierce RA, Wachi H, Mecham RP and Parks WC (1999) An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* **19**:7314-26.
323. Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ and Bokoch GM (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* **270**:23934-6.
324. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T and Yazaki Y (1999) Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* **274**:9760-70.

Résumé

L'élastine est la protéine de la matrice extracellulaire responsable de la résilience des tissus nécessitant la capacité de se déformer tels que la peau, les artères ou les poumons. Cependant, son rôle n'est pas restreint à la simple fonction d'élasticité : la dégradation de l'élastine par diverses protéases lors de la progression tumorale conduit à la genèse de peptides d'élastine possédant de nombreuses activités biologiques. Parmi celles-ci, on distingue la capacité qu'ont ces peptides à induire l'expression de pro-MMP-1 par les fibroblastes dermiques, métalloprotéinase matricielle fondamentalement impliquée dans l'invasion tumorale.

Nous montrons par l'utilisation d'approches pharmacologiques et génétiques que les peptides d'élastine induisent l'expression de la pro-MMP-1 par la voie MAPK ERK1/2. Les facteurs de transcriptions de la famille AP-1, cruciaux pour l'expression de cette MMP sont activés par cette voie. L'activation de ERK1/2 met en jeu deux voies complémentaires composées des modules protéine G_0/G_i / p110 γ / Raf-1 / MEK1/2 et AMPc / PKA / B-Raf / MEK1/2. La voie dépendante de p110 γ est activée par l'hétérodimère $\beta\gamma$ dérivé de la protéine G_0/G_i . La transfection transitoire des fibroblastes dermiques avec un mutant dominant négatif de Ras démontre que cette petite protéine G n'est pas impliquée dans l'activation de la voie ERK1/2.

L'analyse préliminaire du mode de fonctionnement du récepteur de l'élastine suggère que l'activité neuraminidase d'une de ses sous-unités est stimulée par les peptides d'élastine et qu'elle est le point d'initiation de la transduction du signal de ce récepteur. Une analyse par microscopie confocale montre que ce dernier est localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. La destruction des radeaux lipidiques par déplétion du cholestérol qu'ils contiennent met en évidence le rôle crucial de ces microdomaines dans la transduction du signal du récepteur. Enfin, la stimulation des cellules par les peptides d'élastine induit la production de lactosylcéramide, second messenger pouvant être généré par l'action de la neuraminidase et qui pourrait être responsable de l'activation de la voie ERK1/2.

Discipline – Spécialité Doctorale

Biochimie

Mots Clés

fibroblastes dermiques humains ; peptides d'élastine ; signalisation ; ERK1/2 ; Raf-1 ; B-Raf ; p110 γ ; neuraminidase ; radeaux lipidiques ; lactosylcéramide ; pro-MMP-1 ; réaction stromale.