



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

Benoît CANTARELLI

**Influence des peptides d'élastine sur l'apoptose
des fibroblastes dermiques humains
de sujets jeunes, matures et âgés.**

Soutenue publiquement le 22 septembre 2009

JURY

Président : Laurent MARTINY, Professeur des Universités, Reims

Rapporteurs : Marie Paule JACOB, Directeur de Recherche CNRS, Paris
Muriel LAFFARGUE, Chargé de Recherche CNRS, Toulouse

Examineurs : Olivier GALLET, Professeur des Universités, Cergy-Pontoise
Laurent DUCA, Maître de Conférences des Universités, Reims

Directeur de thèse : Laurent DEBELLE, Professeur des Universités, Reims

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur Laurent Martiny pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous suis aussi très reconnaissant d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Marie Paule Jacob et le Docteur Muriel Laffargue de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse, mais aussi les autres membres du jury, le Professeur Olivier Gallet et le Docteur Laurent Duca. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré à juger ce travail, me permettant ainsi de bénéficier de leur expertise scientifique. Je tiens vous exprimer ma respectueuse considération.

Je tiens à remercier le Professeur Laurent Debelle d'avoir assuré la direction de ces travaux de thèse. Merci d'avoir supervisé ce travail et pour les corrections que tu as apporté à cette thèse.

Je tiens à remercier le CNRS et la Communauté Européenne d'avoir financé ce travail dans le cadre du programme STREP FP6 ELAST-AGE.

Je tiens encore à remercier le Docteur Laurent Duca d'avoir été pour moi le meilleur des enseignants. Merci de m'avoir appris à manipuler correctement. Merci pour ta disponibilité et pour tes conseils toujours judicieux. Et merci d'être devenu au fil des années un des meilleurs amis sur lequel je puisse compter.

Je remercie Fanja Rabenoelina pour m'avoir formé à la PCR quantitative. Merci pour ton aide, pour ta disponibilité et tes conseils. Et merci d'avoir apporté tes corrections à ce manuscrit de thèse.

Je remercie le Docteur Stéphane Poitevin pour m'avoir aidé dans la réalisation des manipulations de cytométrie en flux. Merci de m'avoir consacré autant de votre précieux temps.

Je remercie tous les membres du projet ELAST-AGE auxquels j'ai été associé. Et j'aurais une pensée particulière pour le Professeur Antonio Tamburro qui nous a quittés beaucoup trop tôt et dont je n'oublierais jamais la gentillesse et la générosité.

Et bien qu'étant un travail de longue haleine, une thèse ne peut se réaliser dans de bonnes conditions que si l'on se trouve dans un environnement de travail idéal.

Je remercie donc tous les membres du laboratoire SiRMA de m'avoir fait passer de si agréables années en leur compagnie et c'est avec regret que je vous quitte.

Et je remercie aussi toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au sein de laboratoire et qui sont devenus mes amis au fil des ans.

Sommaire

Sommaire.....	1
Abréviations.....	5
Liste des Figures.....	7
Liste des tableaux.....	9
Introduction générale.....	11
I. Le vieillissement.....	11
1. Le vieillissement intrinsèque.....	11
a. La formation de dérivés réactifs de l'oxygène.....	12
i) Les radicaux libres oxygénés.....	12
ii) Les dérivés oxygénés réactifs non radicalaires.....	12
b. Les télomères.....	13
2. Le vieillissement extrinsèque.....	13
a. Les rayonnements ultraviolets.....	13
b. Le tabagisme.....	14
c. La pollution atmosphérique.....	15
II. Les fibres élastiques.....	15
1. Propriétés.....	15
2. Les microfibrilles.....	16
a. Les fibrillines.....	16
b. Les MAGP.....	17
c. Les protéoglycanes.....	18
d. Autres molécules.....	18
III. L'élastine.....	19
1. Elastogenèse.....	19
a. Le gène de l'élastine.....	20
b. Contrôle de l'expression du gène.....	21
c. Nature de la tropoélastine.....	21
d. Sécrétion et assemblage de la tropoélastine.....	22
2. L'élastine mature.....	22
IV. Les peptides d'élastine.....	25

1. Nature et origine	25
2. Activités biologiques	26
a. Effets sur le chimiotactisme cellulaire	26
b. Effets sur la prolifération.....	27
c. Effets sur la synthèse de protéases	28
3. Les récepteurs de l'élastine.....	30
a. Le complexe récepteur de l'élastine	30
i) Nature du complexe	30
ii) Ligands connus	33
b. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$	33
c. La galectine-3	34
4. Signalisation.....	35
V. Devenir cellulaire	36
1. Survie cellulaire	36
a. Facteurs de survie cellulaire	36
b. La voie de survie Ras-Raf-MEK-ERK.....	36
c. La voie de survie PI3K/Akt.....	37
i. La phosphoinositide-3 kinase	37
ii. La Ser/Thr kinase Akt.....	38
2. L'apoptose	39
a. Définition.....	39
b. Les voies apoptotiques	40
c. Les caspases.....	41
3. La sénescence	42
a. Définition.....	42
b. Caractéristiques des cellules sénescents.....	43
VI. Les céramides	43
1. Généralités	43
2. Propriétés physiques	44
3. Biosynthèse des céramides	45
4. Voies associées à leur formation.....	46
5. Céramides et vieillissement	48
But du travail	50
Matériels et Méthodes	53

I. Matériels	53
II. Cultures cellulaires.....	53
1. Modèle cellulaire utilisé.....	53
2. Obtention des fibroblastes dermiques à partir d'explant de peau.....	54
3. Entretien des cellules	55
4. Obtention de sous-culture par trypsination.....	55
5. Mise au repos des cellules	55
III. Préparation des peptides d'élastine.....	56
IV. Stimulation des cellules par les peptides d'élastine.....	56
V. Marquages nucléaires.....	57
VI. Cytométrie de flux.....	58
VII. Test d'activité caspase-9.....	59
VIII. Méthode d'analyse des protéines	60
1. Préparation des extraits cellulaires totaux	60
2. Dosage des protéines selon la méthode BCA	61
3. La technique de Western blot	61
4. Immunoprécipitation.....	62
IX. Les méthodes de biologie moléculaire	63
1. Extraction des ARN totaux	63
2. Vérification de l'intégrité des extraits d'ARN.....	64
3. La RT-PCR	64
a. La RT.....	64
b. PCR de vérification de la RT	65
4. La PCR quantitative.....	66
X. Analyse statistique des résultats	68
Rôle des peptides d'élastine dans la survie cellulaire	71
I. Effet des PE sur la survie cellulaire.....	73
II. Rôle du complexe récepteur de l'élastine	75
III. Implication de la voie ERK	79
IV. Implication de la voie PI3K/Akt	82
V. Influence des PE sur la phosphorylation d'Akt.....	85
VI. L'inhibition de la PI3K bloque l'activation d'Akt.....	87
VII. Influence des PE sur la phosphorylation de Bad.....	88
VIII. Influence des PE sur la phosphorylation de la caspase-9.....	89
IX. Effets des PE sur l'activation de la caspase-9.....	90

X. Influence des PE sur la phosphorylation de Foxo3a.....	91
XI. Influence des PE sur la séquestration de Foxo3a par la protéine 14-3-3 ζ	92
Complexe récepteur de l'élastine et vieillissement.....	94
I. Design des amorces pour la qPCR.....	95
1. Amorces discriminant l'EBP de la β-galactosidase.....	95
a. Test des amorces EBP et β-gal	96
b. Discrimination entre l'EBP et la β-gal	98
2. Amorces Neu-1 et PPCA	100
II. Expression basale du récepteur en fonction de l'âge	100
III. Influence des PE sur l'expression du récepteur	102
IV. Influence des PE sur l'expression du récepteur en fonction de l'âge.....	103
Discussion	106
Conclusions et perspectives	115
Références	120
Publications et communications.....	143

Abréviations

7AAD	7-amino-actinomycine D
ADN	Acide désoxyribonucléique
APAF-1	<i>Apoptosis Protease-Activating Factor-1</i>
Bad	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
BET	Bromure d'éthidium
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
CAPK/CAPP	<i>Ceramide- activated protein kinase/phosphatase</i>
CRE	Complexe récepteur de l'élastine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
dNTP	désoxynucléotide tri-phosphate
EBP	<i>Elastin Binding Protein</i>
ECL	<i>Electrochemical luminescence</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetra acetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
FAS	<i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FASL	<i>Apoptosis Stimulating Fragment Ligand</i>
FDH	Fibroblastes dermiques humains
FE	Fibres élastiques
FITC	<i>Fluorescein Iso Thio Cyanate</i>
FLICA	<i>Fluorescent inhibitor of caspase</i>
GAG	Glycosaminoglycanes
GEFs	<i>Guanine-nucleotide exchange factors</i>
GDP	Guanosine di-phosphate
GSH	Glutathion
GTP	Guanosine tri-phosphate
IAA	<i>Isoamyl alcohol</i>
IL	Interleukine

IGF-1	<i>Insulin growth factor 1</i>
MAGP	<i>Microfibril-associated glycoprotein</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase/ERK kinase</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Neu-1	Neuraminidase-1
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
pb	paire de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK-1	<i>3-Phosphoinositide-Dependant Protein Kinase-1</i>
PE	Peptides d'élastine
PH	<i>Pleckstrin Homology Domain</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	4,5-phosphatidylinositol-diphosphate
PIP3	3,4,5-phosphatidylinositol-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PG	Protéoglycanes
PPCA	Protéine protectrice / cathepsine A
qsp	quantité suffisante pour
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline Tween</i>
TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta-1</i>
Tm	<i>melting temperature</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SVF	Sérum de veau fœtal

Liste des Figures

Figure 1 : Fibre élastique en cours de synthèse.....	16
Figure 2 : Un ARNm de la tropoélastine humaine.....	20
Figure 3 : Sécrétion et assemblage de la tropoélastine.....	23
Figure 4 : Structure et voie de synthèse des desmosine et isodesmosine.....	24
Figure 5 : Modèles proposés pour l'élastine.	25
Figure 6 : Le complexe récepteur de l'élastine.	31
Figure 7 : Schéma représentant l'épissage du transcrit primaire de la β -Gal.	32
Figure 8 : Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par apoptose.	40
Figure 9 : Structure chimique des céramides	44
Figure 10 : Voies de biosynthèse des céramides.....	47
Figure 11 : Hoechst 33342	57
Figure 12 : Structure chimique de l'iodure de propidium.....	58
Figure 13 : Structure chimique de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).....	59
Figure 14 : Augmentation de la fluorescence au cours du temps.....	66
Figure 15 : Détermination du cycle seuil.	67
Figure 16 : Schéma de la N-acétyl-D-sphingosine ou C ₂ -céramide.....	72
Figure 17 : Influence des PE sur la survie cellulaire par double marquage nucléaire au Hoechst et à l'iodure de propidium.	74
Figure 18 : Influence des PE sur la survie cellulaire.....	75
Figure 19 : Effet du lactose sur la survie cellulaire induite par les PE.....	77
Figure 20 : Effet du lactose sur la survie cellulaire induite par les PE mesurée par cytométrie en flux.....	78
Figure 21 : Effet du U0126 sur la survie cellulaire induite par les PE.....	80

Figure 22 : Effet du U0126 sur la survie cellulaire induite par les PE mesurée par cytométrie en flux.....	81
Figure 23 : Effet du LY294002 sur la survie cellulaire induite par les PE.....	83
Figure 24 : Effet du LY294002 sur la survie cellulaire induite par les PE mesurée par cytométrie en flux.....	84
Figure 25 : Cinétique de phosphorylation d'Akt sur T308.....	85
Figure 26 : Cinétique de phosphorylation d'Akt sur S473.....	86
Figure 27 : Effet de l'inhibition de la PI3K sur la phosphorylation d'Akt.....	87
Figure 28 : Cinétique de phosphorylation de Bad sur S136.....	88
Figure 29 : Cinétique de phosphorylation de caspase-9 sur S196.....	89
Figure 30 : Inhibition par les PE de l'activité caspase-9 induite par les C ₂ -céramides.....	90
Figure 31 : Cinétique de phosphorylation de Foxo3a sur S253.....	91
Figure 32 : Séquestration de Foxo3a par la 14-3-3 ζ suivant un traitement aux PE.....	92
Figure 33 : Test des amorces EBP par PCR.....	97
Figure 34 : Test des amorces β -gal par PCR.....	98
Figure 35 : PCR par les amorces EBP.....	99
Figure 36 : PCR par les amorces β -gal.....	99
Figure 37 : Vérification de la qualité des amorces Neu-1 et PPCA par PCR.....	100
Figure 38 : L'expression basale des trois sous-unités du complexe récepteur de l'élastine et de la β -gal au cours de l'âge par PCR quantitative.....	101
Figure 39 : Influence des PE sur l'expression du récepteur.....	103
Figure 40 : Influence des PE sur l'expression du récepteur en fonction de l'âge.....	104
Figure 41 : Schéma général de la signalisation induite par des peptides d'élastine ayant trait à la survie cellulaire.....	118

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples d'effets biologiques de peptides d'élastine en fonction des cellules cibles.....	29
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative	68
Tableau 3 : Séquences des amorces EBP testées.	96

Introduction

Introduction générale

De nos jours, l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays développés nous amène à nous interroger sur les causes du vieillissement. Celui-ci est propre à chaque individu et touche tous les organes en provoquant des dégradations irréversibles (Berneburg et coll., 2000). Le vieillissement cutané est un phénomène particulièrement important. En effet, la peau est l'organe le plus exposé chez un individu. C'est donc un des tissus qui montre le premier des signes de vieillissement. Le vieillissement cutané est communément associé à un relâchement des tissus et à l'apparition de repliements de la peau, les rides.

I. Le vieillissement

Le vieillissement est un phénomène biologique complexe qui peut être décomposé en deux processus : un vieillissement intrinsèque qui est déterminé génétiquement et un vieillissement extrinsèque causé par des facteurs environnementaux.

1. Le vieillissement intrinsèque

Par définition, cette forme de vieillissement est inévitable et n'est pas causée par le comportement d'un individu. Elle est due au temps si bien que l'on parle aussi de vieillissement chronologique. Dans celui-ci, une altération plus ou moins profonde des molécules constituant l'individu est observée. Celle-ci s'accompagne de phénomènes physiques visibles macroscopiquement, comme, par exemple, l'augmentation de la fragilité de la peau et la perte de son élasticité.

Les principaux phénomènes intervenant dans ce vieillissement sont la formation de dérivés réactifs de l'oxygène et l'érosion des télomères.

a. La formation de dérivés réactifs de l'oxygène

L'oxygène est un gaz indispensable et nécessaire à tous les êtres vivants. Des enzymes spécifiques sont capables de faciliter sa consommation mais aussi la détoxification de ses métabolites réduits. Ces espèces réactives de l'oxygène sont beaucoup plus toxiques que l'oxygène lui-même. Elles sont produites de manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée. En dépit d'un système de défense efficace contre ces espèces, les dommages causés par leur accumulation affectent les membranes, les enzymes et l'ADN des cellules.

i) Les radicaux libres oxygénés.

Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre transitoire étant comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Des enzymes situées dans la membrane mitochondriale interne, telles que la NADPH-deshydrogénase peuvent conduire à la formation de radicaux $O_2^{\cdot-}$ appelés superoxydes. Par ailleurs, l'apparition de ces radicaux peut résulter de l'auto-oxydation de composés tels que les neuromédiateurs (adrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques par le cytochrome P450. Les radicaux superoxydes sont peu réactifs vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques (acides nucléiques, protéines, lipides). Cependant la toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer plutôt de manière indirecte. En effet, ils peuvent générer des radicaux hydroxyles $\cdot OH$. Ceux-ci sont des oxydants puissants qui attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...). Par exemple, dans le cas de l'ADN, les radicaux hydroxyles réagissent avec les bases azotées en s'additionnant sur leurs doubles liaisons. De même, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'altérer les fonctions enzymatiques en réagissant avec les résidus des sites actifs des enzymes.

ii) Les dérivés oxygénés réactifs non radicalaires

Alternativement, deux radicaux libres peuvent réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire. C'est notamment le cas entre deux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) ou entre le

superoxyde et le monoxyde d'azote (NO[•]). La première réaction engendrant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la seconde du peroxynitrite (ONOO⁻), ces deux molécules possédant une certaine toxicité. En effet, en réagissant avec l'eau oxygénée, les radicaux superoxydes peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles (•OH). De même, les ions peroxonitrites se décomposent assez rapidement en radicaux hydroxyles (Beckman et coll., 1990).

b. Les télomères

Les télomères sont des structures spécialisées trouvées aux extrémités des chromosomes eucaryotes. Il s'agit d'une séquence répétée d'acides nucléiques de type 5'-TTAGGG-3'. L'addition de ces séquences télomériques est assurée par une télomérase (Greider et Blackburn, 1985; Blackburn et coll., 1989). C'est une ribonucléoprotéine (ADN polymérase ARN dépendante) chargée de la bonne conservation des télomères au cours des divisions que subit une cellule. Malgré tout, la longueur de ces télomères diminue à chaque division cellulaire. L'érosion progressive de la séquence télomérique de plus de 150 pb à chaque mitose protège le chromosome contre une fusion de ses extrémités mais le protège aussi d'une dégradation prématurée (Harley et coll., 1990; Ning et coll., 2003). La majorité des cellules ont une capacité de doublement qui atteint 60 à 70 réplifications durant leur vie. Quand les télomères deviennent dramatiquement courts, les cellules entrent en sénescence répllicative ce qui informe la cellule de son âge avancé (Greider, 1990).

2. Le vieillissement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque est largement évitable. L'exposition solaire, le tabagisme, la pollution atmosphérique sont les principales causes du vieillissement cutané extrinsèque.

a. Les rayonnements ultraviolets

Parmi tous les facteurs environnementaux, les rayons ultraviolets contribuent à plus de 80% aux dommages de la peau. A la fois les UV-A (320-400 nm) et les UV-B (290-320 nm) sont responsables du vieillissement de la peau (Berneburg et coll., 2000).

Les UV-B produisent des altérations principalement au niveau de l'épiderme. Ils causent des dommages à l'ADN des kératinocytes et des mélanocytes. Ils sont aussi responsables de l'apparition de dimères de thymine, qui correspondent à la liaison covalente entre deux brins d'ADN (Young et coll., 1998). Avec l'âge, cette liaison ne se détruit plus rapidement et des mutations s'accumulent.

Les UV-A pénètrent plus profondément et causent des dommages à la fois au derme et à l'épiderme (Rosario et coll., 1979). Dans la lumière solaire, la quantité d'UV-A présente est 10 à 100 fois supérieure aux UV-B. Cependant, les UV-B ont des effets biologiques délétères 1000 fois supérieurs à ceux des UV-A. Le mécanisme exact par lequel les UV-A causent le vieillissement cutané n'est pas encore entièrement connu.

b. Le tabagisme

Le tabagisme est la cause de mortalité la plus évitable et est responsable de plus de trois millions de morts par an dans le monde (Smith et Fenske, 1996). Il a été établi depuis longtemps que le tabagisme a des effets délétères sur la peau (Daniell, 1971). Des études épidémiologiques indiquent que le tabagisme est un facteur environnemental important dans le vieillissement prématuré de la peau (Kadunce et coll., 1991; Grady et Ernster, 1992; Ernster et coll., 1995; Frances, 1998). Des études *in vitro* chez les fibroblastes dermiques humains montrent que la fumée de tabac nuit à la biosynthèse des collagènes alors qu'elle augmente la production des métalloprotéases matricielles (MMP) (Saarialho-Kere et coll., 1999; Lahmann et coll., 2001). Ces enzymes dégradent les protéines de la matrice telles que les collagènes, les fibres élastiques et les protéoglycanes, elles provoquent un déséquilibre entre biosynthèse et dégradation qui conduit à l'altération du tissu conjonctif cutané (Uitto et coll., 1989; Yin et coll., 2000). On pourra par exemple observer une production anormale de produits de dégradation de l'élastine (Boyd et coll., 1999).

Les espèces réactives de l'oxygène sont également impliquées dans le vieillissement prématuré de la peau induit par la fumée de tabac. Ceux-ci augmentent l'induction de l'expression des MMP (Yin et coll., 2000).

c. La pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est due à la libération dans l'environnement de molécules nocives telles que les oxydes d'azote et des composés volatils créés à partir des énergies fossiles. Les émissions de gaz par les usines et les véhicules motorisés sont les sources majeures de ces composés. Parmi ces gaz, l'un des principaux polluants est l'ozone.

L'ozone est un polluant secondaire qui n'est pas émis directement dans l'air mais résulte d'une réaction photochimique impliquant des précurseurs, des polluants issus de l'automobile, essentiellement les oxydes d'azote. Les cibles principales de l'ozone sont les couches superficielles de la peau. Il y cause une déplétion de molécules telles que l' α -tocophérol (vitamine E) ainsi que l'acide ascorbique (vitamine C) (Liebler et coll., 1986).

II. Les fibres élastiques

1. Propriétés

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau tridimensionnel de macromolécules comme les collagènes, l'élastine, la fibronectine, la laminine ou les glycosaminoglycanes. Elle n'est pas seulement un échafaudage structural, car elle interagit aussi avec les cellules qu'elle entoure. La MEC transmet des signaux aux cellules en régulant l'adhérence cellulaire, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Dans la peau, la matrice est déposée par les fibroblastes dermiques selon un programme qui est génétiquement déterminé et qui évolue avec le temps. Les fibroblastes sont les principales cellules du derme. Ils sont essentiellement localisés dans le derme papillaire proche de l'épiderme et peu représentés dans le derme profond dit derme réticulaire. Ils sont spécialisés dans la synthèse de deux types de fibres : les fibres de collagène et les fibres élastiques. Les premières constituent 70% des protéines du derme et lui confèrent sa résistance aux tensions et aux tractions, tandis que les secondes lui donnent ses propriétés élastiques.

Les fibres élastiques (FE) sont des assemblages macromoléculaires qui forment un réseau complexe au sein de tissus tels que les artères, les poumons et la peau. Les FE sont constituées

d'une partie microfibrillaire constituée essentiellement de glycoprotéines et d'une partie élastique centrale constituée d'élastine (Vrhovski et Weiss, 1998; Kielty et coll., 2002) (Figure 1). Elles assurent l'élasticité du tissu.

Au niveau du derme réticulaire qui représente la majeure partie du derme, les fibres d'élastine et de collagène sont disposées de façon multidirectionnelle alors que dans le derme papillaire, les fibres d'élastine sont orientées principalement perpendiculairement à la surface de la peau.

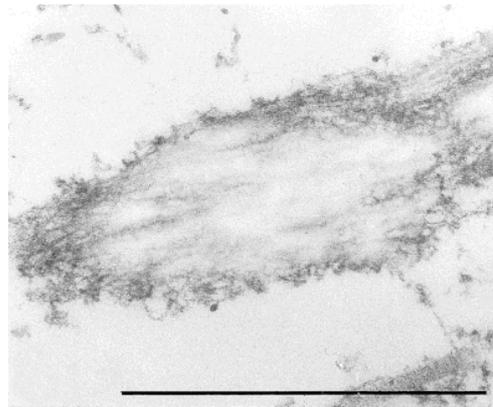


Figure 1 : Fibre élastique en cours de synthèse.

Cliché de microscopie électronique à transmission. Le centre de la fibre est composé d'un cœur d'élastine amorphe alors que la périphérie est entourée par les microfibrilles plus opaques aux électrons. La barre noire représente 1 μm . (Pasquali-Ronchetti et Baccarani-Contrì, 1997).

2. Les microfibrilles

Les microfibrilles sont particulièrement abondantes dans les tissus élastiques tels que l'aorte, les poumons et la peau, mais elles sont également présentes dans des tissus dynamiques qui n'expriment pas l'élastine comme les zonules de l'œil (Ashworth et coll., 2000). Les microfibrilles sont essentiellement constituées de fibrillines, de *microfibril-associated glycoproteins* (MAGP) et de protéoglycanes (PG).

a. Les fibrillines

La fibrilline-1, la plus répandue des fibrillines, est le principal constituant du manteau microfibrillaire et elle permet son maintien grâce à de nombreuses liaisons croisées (Kielty et

Shuttleworth, 1993). La fibrilline-1 humaine est une glycoprotéine modulaire de 347 kDa qui constitue le cœur des microfibrilles. La fibrilline-2 apparaît plus tôt dans le développement que la fibrilline-1. Elle semble servir de matrice de soutien à la fibrilline-1 dans la formation des fibres élastiques (Pereira et coll., 1997). Elle peut se lier avec la fibrilline-1 par sa région N-terminale (Tiedemann et coll., 2001). La fibrilline-3 n'est retrouvée que dans le cerveau (Nagase et coll., 2001).

L'assemblage des microfibrilles est en partie régulé par les cellules indépendamment de l'élastine. L'assemblage de la fibrilline-1 se fait suite à sa sécrétion (Ashworth et coll., 1999; Trask et coll., 1999) qui est assistée par une molécule chaperonne (Wallis et coll., 2003). Les cellules régulent la localisation péricellulaire des protéines secrétées et facilitent le clivage des extrémités N- et C-terminales de la fibrilline-1 par la furine (Raghunath et coll., 1999; Ritty et coll., 1999).

Les microfibrilles, grâce aux fibrillines, possèdent une certaine élasticité. Celle-ci est due à la présence (forme repliée) ou à l'absence (forme étendue) de calcium lié sur des domaines cbEGF. En coordonnant le calcium, ces modules se rigidifient (Downing et coll., 1996; Booms et coll., 2000; Reinhardt et coll., 2000; Whiteman et Handford, 2003).

b. Les MAGP

Le principal membre de cette famille de glycoprotéines est la *microfibril-associated glycoprotein-1* (MAGP-1), qui joue un rôle important dans l'assemblage et dans l'intégrité structurale des microfibrilles (Gibson et coll., 1989; Trask et coll., 2000a).

La MAGP-1 est une glycoprotéine de 31 kDa qui possède 2 domaines distincts : un domaine N-terminal, fortement acide, riche en proline et comportant une séquence riche en glutamine, et un domaine C-terminal possédant 13 cystéines et fortement chargé positivement (Henderson et coll., 1996; Kielty et Shuttleworth, 1997). Il existe plusieurs variants d'épissage de MAGP-1 provenant d'un transcrit unique. Chez l'homme, nous trouvons MAGP-1A (transcrit total), MAGP-1A', MAGP-1B (intracellulaire) et MAGP-1C (Segade et coll., 2000). La MAGP-1 est toujours associée aux microfibrilles sauf au niveau des cellules endothéliales de l'aorte et au niveau des zonules de l'œil (Davis, 1994; Henderson et coll.,

1996). Elle est liée à la fibrilline-1 par des ponts disulfures et des liaisons croisées obtenues par trans-glutamination. Leur liaison est dépendante du calcium (Jensen et coll., 2001).

MAGP-2 est une protéine de 170 à 173 kDa. Elle possède la même région centrale de 60 acides aminés que MAGP-1. Du fait de sa liaison potentielle avec les cellules et avec la fibrilline-1, elle semble être impliquée dans la formation des microfibrilles et dans l'élastogénèse (Gibson et coll., 1999; Segade et coll., 2002; Hanssen et coll., 2004).

c. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont constitués d'une protéine cœur qui porte des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Les petits protéoglycanes, tels que la décorine ou le biglycane, peuvent avoir différentes fonctions dont la régulation de l'assemblage de la MEC (Hocking et coll., 1998; Iozzo, 1998). Ce sont des *leucin-rich chondroitin sulphate PG*. Ils sont présents au niveau du derme. Le biglycane est localisé dans la composante amorphe d'élastine des FE et la décorine au niveau des microfibrilles associées à l'élastine.

MAGP-1 et la fibrilline-1 semblent se lier à la décorine. Le site de liaison à cette dernière est proche de la région riche en proline. La liaison à MAGP-1 semble nécessiter la sulfatation du PG (Trask et coll., 2000a).

d. Autres molécules

De nombreuses molécules autres que celles décrites ci-dessus interviennent dans la formation ou dans la structure des FE. On note par exemple la *latent TGF- β binding protein*, la *microfibril-associated protein*, d'autres PG à chondroïtine sulfate, le versicane ou encore le lectane dans la peau (Horrigan et coll., 1992; Zimmermann et coll., 1994; Kielty et coll., 1996; Sinha et coll., 1998; Hirano et coll., 2002).

Certaines de ces molécules se trouvent à l'interface élastine-microfibrilles ou à l'interface cellule-surface des FE. Ces molécules régulent le dépôt de l'élastine sur les microfibrilles ou la liaison des FE avec les cellules.

L'émiline, par exemple, est une glycoprotéine de 136 kDa qui se trouve à l'interface élastine-microfibrilles. Il existe 4 membres dans cette famille : émiline-1, -2, -3 et -4. Elles possèdent toutes une région centrale désorganisée. L'émiline-1 et l'émiline-2 possèdent une zone de triple hélice et de trimérisation. Jusqu'à aujourd'hui, seule l'émiline-1 a été identifiée sur les FE (Bressan et coll., 1993; Doliana et coll., 1999).

Les membres de la famille des fibulines semblent également présents à l'interface des FE. La fibuline-1 est localisée dans le coeur amorphe des fibres élastiques. La fibuline-2 et la fibuline-5 sont localisées à l'interface élastine-microfibrilles (Kostka et coll., 2001). La fibuline-5 joue un rôle essentiel dans l'élastogénèse (Nakamura et coll., 2002).

III. L'élastine

L'élastine est la protéine responsable de l'élasticité des tissus des vertébrés. Elle est traditionnellement décrite comme un polymère amorphe. C'est une protéine hydrophobe (Cleary et Gibson, 1996) qui est totalement insoluble dans l'eau, mais aussi dans des solvants organiques. Cette molécule est très difficilement dégradable et fait partie des protéines les plus résistantes de l'organisme.

En conditions physiologiques, le renouvellement de l'élastine est quasi nul. La demi-vie de l'élastine est estimée à 70 ans (Rucker et Tinker, 1977; Petersen et coll., 2002). L'élastine est un polymère insoluble synthétisé à partir d'un précurseur soluble appelé la tropoélastine (Uitto et coll., 1991; Mithieux et Weiss, 2005). Elle est obtenue par réticulation de résidus lysine. Cette opération s'effectue grâce aux lysyl oxydases (Kagan et Sullivan, 1982). Les tissus riches en élastine sont l'aorte (de 30% à 57%), les vaisseaux sanguins (de 28% à 32%), des ligaments (50%), les poumons (de 3% à 7%), les tendons (4%) et la peau (de 2% à 3%) (Vrhovski et Weiss, 1998; Mithieux et Weiss, 2005).

1. Elastogénèse

L'élastogénèse est un processus complexe qui comprend tous les événements conduisant à la construction de l'élastine fonctionnelle au sein des fibres élastiques.

Dans la plupart des tissus, la production d'élastine débute à mi-gestation et atteint un pic après la naissance et pendant la période néonatale (Uitto et coll., 1991). Elle diminue de façon spectaculaire et est presque complètement nulle à l'âge adulte (Swee et coll., 1995).

a. Le gène de l'élastine

Le gène humain qui code la tropoélastine (Figure 2) est situé sur le chromosome 7 (7q11.2) (Fazio et coll., 1991). Le transcrit primaire comprend environ 45 kb et est composé de petits exons qui se retrouvent entre de grands introns (Bashir et coll., 1989). Le rapport entre introns et exons est de 20:1, ce qui est exceptionnellement élevé (Vrhovski et Weiss, 1998; Piontkivska et coll., 2004). Cette séquence code pour un ARNm d'environ 3,5 kb, dont seulement 2,2 kb est traduit (Parks et Deak, 1990).

Le gène humain de la tropoélastine comprend 34 exons (de l'exon 1 à 33 et un exon 36). Deux exons 34 et 35 ont été perdus au cours de l'évolution et sont retrouvés dans les génomes d'autres mammifères tels que le lapin, le chat, le porc et le bœuf (Szabo et coll., 1999). La présence de l'exon 26A est spécifique au gène humain de la tropoélastine. C'est une séquence qui code pour un domaine hydrophile et dont la présence n'a été décrite à ce jour pour aucune autre espèce (Indik et coll., 1987; Bashir et coll., 1989).

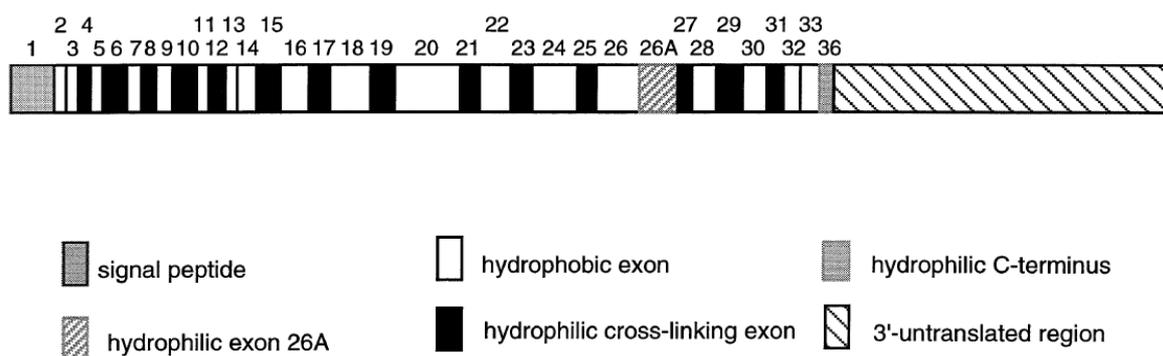


Figure 2 : Un ARNm de la tropoélastine humaine.

Les régions de l'ARNm codent une alternance de séquence de résidus hydrophobes et de séquence de pontage hydrophile. Le gène code pour un peptide signal situé en N-terminal et est ponctué par une séquence hydrophile en C-terminal en amont d'une région non traduite (d'après Vrhovski et Weiss, 1998).

La plupart des exons du gène de l'élastine codent pour l'un de ces deux types de domaines. Le peptide signal est codé par l'exon 1, et l'extrémité C-terminale hydrophile et chargée par l'exon 36. Par ailleurs, la séquence hydrophile correspondant à l'exon 26A (spécifique de l'homme) est rarement exprimée.

b. Contrôle de l'expression du gène

L'expression de l'élastine est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Par exemple, le TNF- α et le bFGF diminuent l'expression du gène de l'élastine (Kahari et coll., 1992; Rich et coll., 1999; Carreras et coll., 2002) alors que les glucocorticoïdes, l'IL-1 β , l'IL-10 et d'IGF-1 ont l'effet inverse (Mauviel et coll., 1993; Reitamo et coll., 1994; Pierce et coll., 1995). D'autre part, le TGF- β 1 augmente le dépôt d'élastine au niveau post-transcriptionnel en améliorant la stabilité de l'ARNm du gène de l'élastine (Kahari et coll., 1992; Zhang et coll., 1999; Kucich et coll., 2002). Cet effet semble être dépendant de la liaison de protéines cytosoliques à des positions spécifiques au niveau de l'ARNm. De même, il a été démontré qu'un grand domaine de structure secondaire présent dans la région non traduite en 3' de l'ARNm de l'élastine serait impliqué dans la stabilité des ARNm du gène de l'élastine (Hew et coll., 1999).

c. Nature de la tropoélastine

Les transcrits primaires du gène de l'élastine sont soumis à un épissage alternatif important aboutissant à la suppression d'exons entiers (Indik et coll., 1987). En conséquence, différentes isoformes de tropoélastine sont traduites. Néanmoins, quelque soit son mode d'épissage, la structure primaire de la tropoélastine est toujours constituée d'une alternance d'exons très hydrophobes et d'autres hydrophiles.

Les domaines hydrophobes contiennent de nombreuses alternances de séquences répétitives de résidus aliphatiques (P, A, V, L, I) interrompues par des résidus glycine. Les motifs fondamentaux de ces séquences particulières de l'élastine sont GX, PX, GGX et PGX, où X = G, A, V, L ou I. Les régions contenant de la lysine correspondent aux domaines de réticulation de la tropoélastine. Là, des résidus lysine se retrouvent en paires ou en triplets dans les tronçons riches en résidus alanine.

Les modifications post-traductionnelles de la tropoélastine incluent le clivage du peptide signal et l'hydroxylation de certains résidus proline. La tropoélastine humaine comporte 760 résidus pour une masse moléculaire de 70 kDa (Indik et coll., 1987; Bashir et coll., 1989).

d. Sécrétion et assemblage de la tropoélastine

Lorsque la tropoélastine est synthétisée (Figure 3), elle est rapidement associée à une protéine protectrice qui empêche son agrégation prématurée (Hinek et Rabinovitch, 1994). Cette molécule chaperonne, l'*Elastin Binding Protein* (EBP), est aussi une sous-unité du complexe récepteur de l'élastine. Cette association avec l'EBP persiste jusqu'à la sécrétion du complexe dans le proche voisinage d'une fibre élastique en cours de construction. Lorsque le complexe est sécrété, il s'associe avec les autres sous-unités du récepteur de l'élastine et finalement entre en contact étroit avec des galactosides de la composante microfibrillaire de la fibre, ce qui conduit à la libération locale de la molécule de tropoélastine (Brown-Augsburger et coll., 1996; Trask et coll., 2000b). Pendant que la chaperonne est recyclée, la tropoélastine interagit avec les microfibrilles et est correctement alignée sur la matrice d'élastine. Enfin, plusieurs des résidus lysine de la tropoélastine sont modifiés par une lysyl oxydase, enzyme Cu^{2+} dépendante, et le monomère activé est intégré dans le réseau élastique naissant par condensation spontanée. Cette réaction conduit à la formation des liaisons croisées majoritairement tétravalentes de l'élastine, appelées desmosine et isodesmosine. Cette polymérisation irréversible des monomères de tropoélastine solubles rend l'élastine insoluble.

2. L'élastine mature

Contrairement à la tropoélastine, l'élastine mature est totalement insoluble. Elle est composée de molécules de tropoélastine liées de façon covalente les unes aux autres par des liaisons croisées bi- (lysinonorleucine), tri- (merodesmosine) ou tétra-fonctionnelles (desmosine et isodesmosine) (Partridge et coll., 1964) (Figure 4).

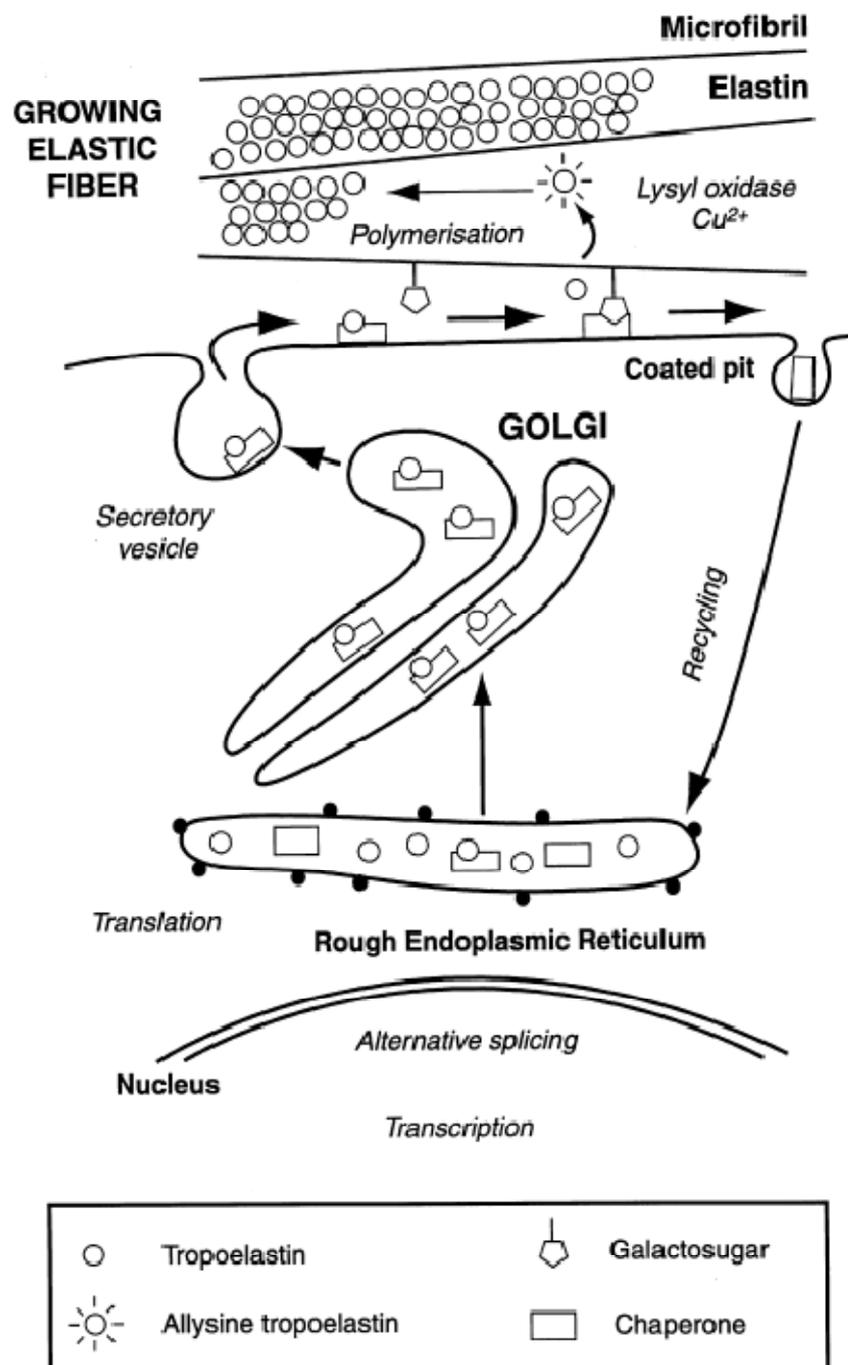


Figure 3 : Sécretion et assemblage de la tropoélastine.

Le gène de la tropoélastine est transcrit dans le noyau. Le messager résultant subit un épissage alternatif avant d'être traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux. Il s'associe ensuite à une protéine chaperonne (l'EBP) qui le conduit à la membrane plasmique vers le site de construction des fibres élastiques. Une lysyl oxydase permet sa polymérisation au sein de ces fibres (d'après Debelle et Tamburro, 1999).

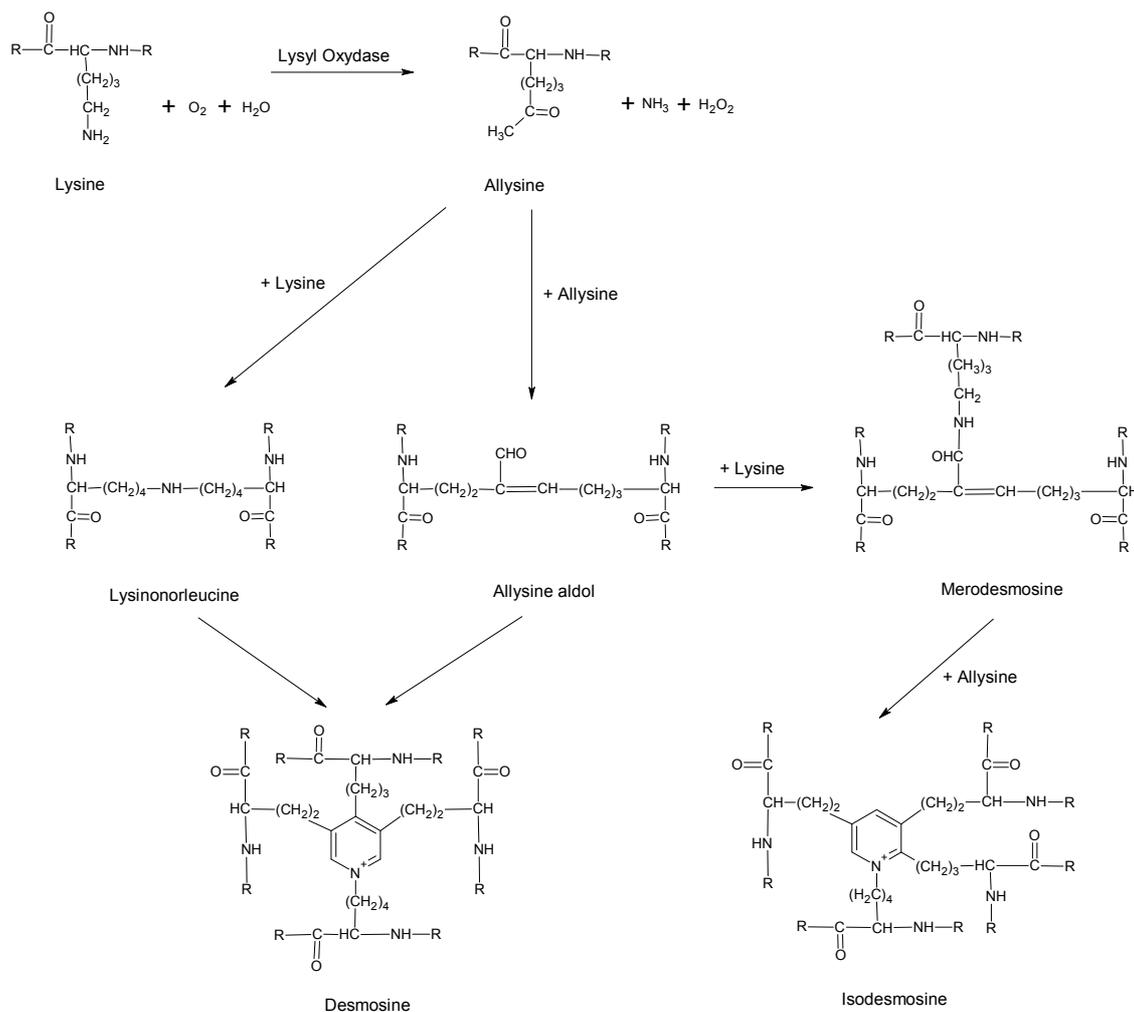


Figure 4 : Structure et voie de synthèse des desmosine et isodesmosine

La position des pontages de l'élastine mature n'est pas bien connue. On sait néanmoins que les premiers pontages à se former sont ceux impliquant les séquences codées par les exons 10, 19 et 25 de l'élastine humaine (Brown-Augsburger et coll., 1995). L'apparition des pontages de l'élastine augmente considérablement son hydrophobie et sa stabilité.

Entre ces domaines étroitement liés se trouvent des segments de la molécule très dynamiques et hydrophobes (Debelle et coll., 1998). Ces domaines sont appelés domaines élastiques de l'élastine car ils sont à l'origine de son élasticité. Dominés par des conformations transitoires et extrêmement mobiles, ces chaînes présentent un comportement très entropique qui est accentué quand l'élastine est hydratée. L'hydratation de l'élastine est essentielle à son élasticité. L'eau agit comme un plastifiant pour ce macropolymère et, de ce fait, accentue le caractère entropique du système (Debelle et Tamburro, 1999).

Aujourd'hui, deux modèles visant tant à décrire l'architecture du réseau d'élastine que son élasticité co-existent (Figure 5).

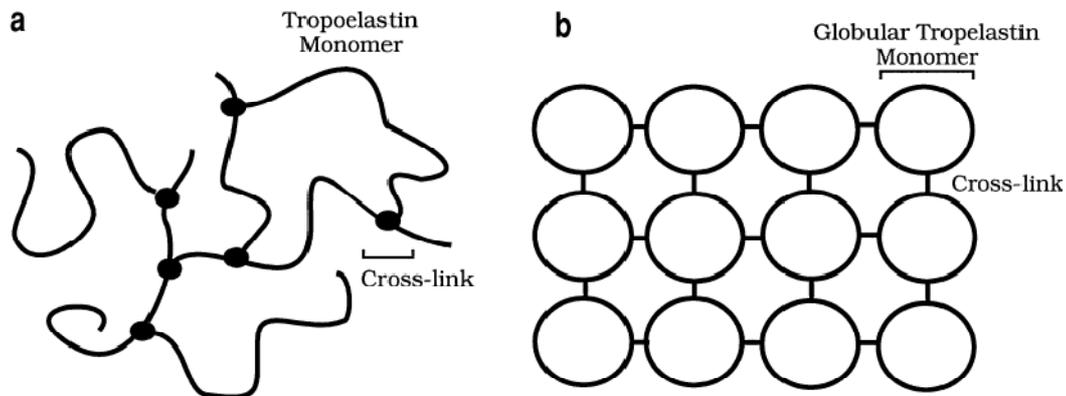


Figure 5 : Modèles proposés pour l'élastine.

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. (d'après Vrhovski et Weiss, 1998).

IV. Les peptides d'élastine

1. Nature et origine

Le terme "peptides d'élastine" désigne à la fois les peptides produits par dégradation enzymatique et chimique de l'élastine insoluble.

Les premiers sont les résultats de la digestion d'élastine par des élastases. Ils sont souvent qualifiés de lysat d'élastine. Ces peptides d'élastine sont produits au cours de plusieurs processus physiopathologiques par action des élastases (Pardo et Selman, 1999; Hornebeck et coll., 2002; Ntayi et coll., 2004). Des MMP comme la gélatinase A (MMP-2), la gélatinase B (MMP-9), la matrilysine (MMP-7) et la métallo-élastase des macrophages (MMP-12) sont des élastases exprimées dans diverses pathologies associées à une forte dégradation de l'élastine. Au cours du processus inflammatoire, la libération de l'élastase leucocytaire conduit à une dégradation spectaculaire du réseau d'élastine (Pardo et Selman, 1999).

Les seconds correspondent soit à des peptides synthétiques, soit à un mélange de peptides obtenu après hydrolyse chimique de l'élastine insoluble par de l'acide oxalique, ce qui donne

l' α -élastine (Partridge et coll., 1955; Tamburro et coll., 1977), ou de l'hydroxyde de potassium, ce qui donne la κ -élastine (kE) (Jacob et Hornebeck, 1985).

Chez l'homme, le domaine codé par l'exon 24 présente six répétitions de l'hexapeptide Val–Gly–Val–Ala–Pro–Gly ou VGVAPG qui possède des activités biologiques quand il est libéré (Brassart et coll., 2001). Cette séquence d'élastine agit dans le chimiotactisme des monocytes et des fibroblastes (Senior et coll., 1984).

2. Activités biologiques

Les peptides d'élastine peuvent moduler la physiologie des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales, des neutrophiles, des leucocytes, et des monocytes. Le Tableau 1 présente une liste non exhaustive de ces activités biologiques.

Le chimiotactisme, la prolifération et la synthèse de protéases sont parmi les effets les plus importants provoqués par les PE.

Parmi les peptides dérivant de l'élastine, ceux qui contiennent une séquence XGXXPG, sont ceux possédant les activités biologiques les plus variées. Celles-ci seraient dues à la présence d'une structure en coude β de type VIII au sein de ces peptides (Fuchs et coll., 2001).

a. Effets sur le chimiotactisme cellulaire

Le chimiotactisme correspond à une migration cellulaire en réponse à un gradient chimique. Il intervient dans les phénomènes de cicatrisation, de développement, d'immunité et de progression tumorale (Kundra et coll., 1994). Ce phénomène a été constaté lors de la stimulation de la migration de certaines cellules par des peptides d'élastine. Dans de nombreuses pathologies, les monocytes, précurseurs des macrophages, subissent l'attraction par des chimioattracteurs au niveau des zones pathologiques (Hunninghake et coll., 1981). Lors de l'anévrisme de l'aorte abdominale, le recrutement des monocytes serait dû aux peptides d'élastine (Hance et coll., 2002). Des études portant sur l'hypertension pulmonaire ont démontré l'implication de peptides issus de l'exon 26A dans cette pathologie et leurs effets chimioattracteurs sur les monocytes (Bisaccia et coll., 1994). D'autres peptides de type

GXXPG, présents dans l'exon 24 de la tropoélastine, induisent également la migration cellulaire (Castiglione Morelli et coll., 1997).

La réponse intracellulaire suite à la stimulation des cellules par les peptides d'élastine semble impliquer une augmentation du niveau de GMPc intracellulaire et une protéine kinase G. Il n'y a par contre ni variation du taux d'AMPc, ni d'activation d'une protéine kinase A, d'une protéine kinase C ou de tyrosine kinase. Ces travaux ont été effectués à la fois sur des monocytes (Uemura et Okamoto, 1997) et des macrophages (Kamisato et coll., 1997). Les peptides d'élastine exercent également une activité chimiotactique sur d'autres types cellulaires. C'est le cas des fibroblastes (Senior et coll., 1984) et des cellules musculaires lisses (Ooyama et coll., 1987).

b. Effets sur la prolifération

De nombreux éléments extracellulaires sont responsables de la stimulation de la prolifération cellulaire. Les peptides d'élastine en font partie.

Dans les fibroblastes dermiques humains, les peptides d'élastine se fixent sur les cellules via un récepteur et déclenchent une réaction intracellulaire menant à la prolifération. L'effet semble médié par une protéine G sensible à la toxine pertussique qui activerait une phospholipase C (PLC). La PLC à son tour déclencherait la voie de l'inositol phosphate et augmenterait la quantité d'inositol-tris-phosphate (IP₃). Ainsi, les canaux calciques s'ouvrent et la quantité intracellulaire de calcium augmente (Ghuysen-Itard et coll., 1992). Cet effet, qui est inhibé par le lactose, est obtenu à la fois avec de la κ -élastine et avec de l'hexapeptide VGVAPG qui est répété 6 fois dans la séquence codée par l'exon 24 du gène de l'élastine (Kamoun et coll., 1995; Tajima et coll., 1997).

La prolifération induite par les peptides d'élastine ainsi que les mécanismes intracellulaires qui en découlent (Mochizuki et coll., 2002) ont également été étudiés sur les cellules musculaires lisses (CML). Les peptides, après fixation sur le complexe récepteur de l'élastine, induisent un signal intracellulaire. Après activation d'une protéine G, ouvrant les canaux calciques, des tyrosine kinases sont activées et la cascade de phosphorylation Ras/Raf/MEK/ERK est induite conduisant à la progression dans le cycle cellulaire (Mochizuki et coll., 2002). Les cyclines sont activées et le cytosquelette est réorganisé.

En conclusion, les peptides d'élastine régulent différemment la prolifération cellulaire selon le type cellulaire et selon leur concentration.

c. Effets sur la synthèse de protéases

Des protéases de type élastase ont été retrouvées à la surface de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les plaquettes, les monocytes et les macrophages (Jacob et coll., 1987). Cette constatation laisse à penser que ces enzymes, MMPs ou sérine protéases, sont sécrétées par ces cellules.

La synthèse de protéases par des cellules tumorales, des cellules du système immunitaire ou des cellules stromales influence grandement leur environnement matriciel et donc leur comportement. Ces protéases peuvent être retrouvées dans des processus aussi bien physiologiques que pathologiques. Par exemple, les peptides d'élastine régulent la production de pro-MMP-1 dans les fibroblastes et la lignée de fibrosarcome HT-1080 (Brassart et coll., 2001; Huet et coll., 2002). Les signaux intracellulaires conduisant à la production de la pro-MMP-1 dans les fibroblastes dermiques humains commencent à être élucidés. La stimulation de ces cellules par les peptides d'élastine entraîne une activation de la cascade Raf/MEK/ERK par deux voies : la voie de la protéine kinase A et la voie phosphatidylinositol-3-kinase. Cette stimulation conduit à l'activation de facteurs de transcription de type AP-1 qui déclenchent la production de pro-MMP-1 (Duca et coll., 2002). Cette protéase sera ensuite activée après sa sécrétion.

La conséquence de cette production de protéases induite par les peptides d'élastine est de contribuer à un renouvellement du *pool* de protéases et donc au maintien de matrikines dans le milieu. Les matrikines à leur tour stimulent alors les cellules présentes localement et réorientent leur physiologie.

		VGVPAG	PGAIPG	LGTPG	GFGVGAGVP	GLGVGAGVP
Chimiotactisme	Monocytes	(Senior et coll., 1980) (Bisaccia et coll., 1994) (Hance et coll., 2002)				
	Neutrophiles		(Grosso et Scott, 1993a)			
	Fibroblastes	(Senior et coll., 1980)	(Grosso et Scott, 1993b)	(Mecham et coll., 1989)	(Long et coll., 1988)	
	Cellules endothéliales	(Long et coll., 1989)			(Long et coll., 1989)	(Long et coll., 1989)
Prolifération	Fibroblastes	(Kamisato et coll., 1997) (Tajima et coll., 1997)				
	Cellules musculaires lisses	(Mochizuki et coll., 2002)				
Synthèse de protéases	Fibroblastes	(Brassart et coll., 2001)	(Brassart et coll., 2001)	(Brassart et coll., 2001)		
	Leucocytes	(Hauck et coll., 1995)				

Tableau 1 : Exemples d'effets biologiques de peptides d'élastine en fonction des cellules cibles.

3. Les récepteurs de l'élastine

L'existence d'un récepteur membranaire pour les peptides d'élastine a été suggérée par Senior et collaborateurs dès 1980 quand ils ont démontré une réponse chimiotactique spécifique des leucocytes et des fibroblastes pour la tropoélastine et les fragments protéolytiques d'élastine insoluble (Senior et coll., 1980).

A ce jour, trois récepteurs capables d'interagir avec la tropoélastine ou les peptides d'élastine sont connus : le complexe récepteur de l'élastine (CRE), l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la galectine-3.

a. Le complexe récepteur de l'élastine

i) Nature du complexe

Le complexe récepteur de l'élastine est dérivé du complexe lysosomal de la β -galactosidase. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires (Hinek et coll., 1988). Il est composé de trois sous-unités : une protéine périphérique de 67 kDa qui lie les peptides d'élastine nommée *Elastin-Binding Protein* (EBP), une protéine protectrice / cathepsine A de 55 kDa et une neuraminidase-1 de 61 kDa qui est associée à la membrane (Figure 6). L'EBP est un variant d'épissage de la β -galactosidase lysosomale (Hinek et coll., 1988). La β -galactosidase humaine (β -Gal, EC 3.2.1.23) est une enzyme qui hydrolyse les résidus galactosyls terminaux liés en β . Sa forme active est une protéine de 64 kDa localisée au niveau du lysosome où elle participe à la dégradation des molécules intracellulaires.

La β -galactosidase est codée par le gène *gbl1* situé au locus p21.33 du chromosome 3. Celui-ci produit 2 transcrits de 2,4 kb et 2 kb de longueur. Le plus long transcrit comprend les 16 exons du gène et semble exprimé 10 fois plus que la forme courte. Il code pour la β -galactosidase. Celle-ci est d'abord exprimée sous forme d'un précurseur de 84 kDa qui, après clivage par une cathepsine B, devient la forme active de la β -galactosidase de 64 kDa (Okamura-Oho et coll., 1997).

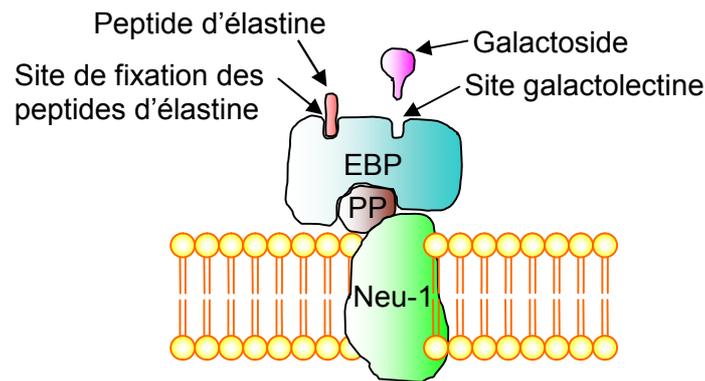


Figure 6 : Le complexe récepteur de l'élastine.

Composé de trois sous-unités : la neuraminidase-1 transmembranaire (*Neu1*), la protéine protectrice (*PP*) et l'Elastin-Binding Protein (*EBP*) qui possède un site de fixation aux peptides d'élastine et un site galactoelectine qui fixe des galactosides.

Le second transcrite code pour une forme enzymatiquement inactive d'environ 59 kDa. L'épissage alternatif qu'il subit consiste en deux délétions successives (Figure 7). La première concerne les exons 3, 4 et induit un décalage du cadre de lecture de l'exon 5. La seconde concerne l'exon 6 et restitue le cadre de lecture initial. Les séquences codées par les exons 1, 2 et 7 à 16 sont donc identiques à celles de la β -galactosidase. Cette forme inactive est appelée S-Gal pour *spliced galactosidase* ou EBP. Contrairement à la β -galactosidase active qui est adressée au lysosome, l'EBP est enzymatiquement inactive et est adressée à la membrane (Privitera et coll., 1998).

L'EBP possède deux sites d'interaction. Un site d'interaction avec les peptides d'élastine où elle lie VGVAPG avec une grande affinité (Blood et coll., 1988). Elle possède également un site galactoelectine dont l'occupation par des galactosides réduit considérablement l'affinité du site récepteur pour ses ligands. C'est pourquoi le lactose est communément utilisé comme antagoniste de ce récepteur.

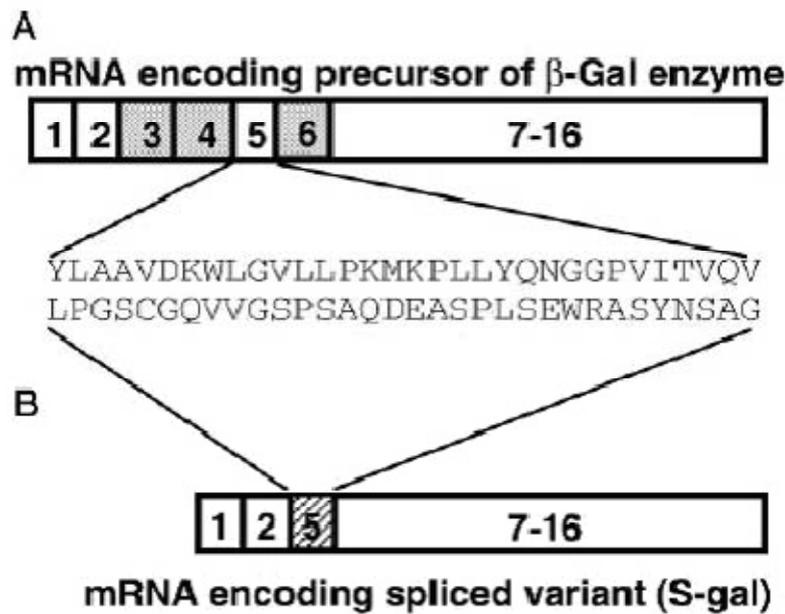


Figure 7 : Schéma représentant l'épissage du transcrit primaire de la β -Gal.

A) transcrit complet conduisant à la traduction de la β -galactosidase, B) transcrit épissé conduisant à la traduction de S-Gal (Privitera et coll., 1998).

La protéine protectrice / cathepsine A (PPCA, EC 3.4.16.1) est synthétisée comme un zymogène de 54 kDa et, dans le lysosome, elle est transformée en deux sous-unités de 32 et 20 kDa, reliées entre elles par des ponts disulfures (Galjart et coll., 1990). Dans le lysosome, PPCA possède une activité sérine protéase. PPCA semble protéger la neuraminidase et la β -galactosidase de la digestion intralysosomale. Des études ont montré qu'aucune activité catalytique n'est requise pour cette fonction de protection (Bonten et coll., 1995).

La neuraminidase lysosomale (Neu-1, EC 3.2.1.18) est synthétisée sous forme d'une préproenzyme de 45,5 kDa qui peut être glycosylée et maturée en une protéine de 48,3 kDa. Cette enzyme est responsable du clivage des acides sialiques terminaux de différents sialoconjugués (Achyuthan et Achyuthan, 2001; Seyrantepe et coll., 2003). Dans les cellules, la PPCA et la Neu-1 sont associées dans le lysosome et à la surface cellulaire. Lorsque le signal d'internalisation C-terminal de Neu-1 est phosphorylé, le complexe PPCA/Neu-1 se retrouve en abondance à la surface des cellules (Hinek et coll., 2006).

ii) Ligands connus

La spécificité de l'EBP ne se limite pas au VGVAPG ou aux séquences peptidiques produites par la dégradation de l'élastine. En effet, la laminine a également été montrée comme pouvant se lier à l'EBP avec une affinité proche de celle de l'élastine (Mecham et coll., 1989). La séquence reconnue par l'EBP est LGTIPG, un segment hydrophobe trouvé dans le domaine V de la chaîne de la laminine B1. En outre, le domaine 7S du collagène de type IV a été présenté comme étant chimiotactique pour les neutrophiles par l'intermédiaire de sa liaison à un récepteur membranaire de 67 kDa qui présentait une composition en acide aminé très semblable à celle de l'EBP (Senior et coll., 1989). Ces résultats suggèrent que le complexe récepteur de l'élastine pourrait avoir un large éventail de ligands.

A ce jour, on connaît de nombreuses séquences pouvant interagir avec ce récepteur. On y note notamment celles comportant la séquence consensus XGXXPG, comme les peptides d'élastine VGVAPG et PGAIPG mais également d'autres séquences comme VAPG ou VGV (Hauck et coll., 1995; Faury et coll., 1998). De tous les ligands connus pour le CRE, la séquence VGVAPG est sans doute celle qui a été la plus étudiée et caractérisée.

b. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$

Les intégrines sont des récepteurs d'adhérence de type hétérodimères $\alpha\beta$ qui relaient des signaux externes en provenance de la matrice extracellulaire vers le cytosquelette et des effecteurs de signalisation (Vicente-Manzanares et coll., 2009). Parmi la famille des intégrines, seule l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ semble interagir avec la tropoélastine. Cette interaction, démontrée en 2004, n'implique pas le motif RGD classiquement reconnu par ce récepteur (Rodgers et Weiss, 2004).

La séquence reconnue par l'intégrine semble localisée dans la partie C-terminale de la tropoélastine. Le rôle précis de cette interaction reste incertain même s'il est couramment admis que celle-ci pourrait être importante dans le cadre de l'élastogénèse.

c. La galectine-3

Les galectines sont des lectines animales et humaines qui lient les β -galactosides (Barondes et coll., 1994). À ce jour, 14 membres de la famille des galectines ont été identifiés (Hirabayashi et coll., 2002).

La galectine-3 possède une courte extrémité N-terminale de 12 acides aminés qui contient un site de phosphorylation sur une sérine qui régleme son ciblage cellulaire. Elle présente par ailleurs une répétition de type collagène riche en résidus glycine et proline, qui sert de substrat pour les MMP, et un domaine C-terminal d'environ 130 acides aminés qui lui permet de reconnaître les sucres (Barondes et coll., 1994; Gong et coll., 1999). La galectine-3 est principalement localisée dans le cytoplasme. Toutefois, bien que la galectine-3 ne contienne pas de séquence signal consensus pour sa sécrétion ou sa translocation nucléaires, elle peut migrer vers le noyau et/ou être sécrétée hors de la cellule par l'intermédiaire de la voie non-classique de sécrétion après sa synthèse (Moutsatsos et coll., 1987; Hughes, 1999).

La galectine-3 est largement exprimée dans les cellules normales et tumorales et est impliquée dans la croissance cellulaire, l'adhérence cellulaire, la différenciation cellulaire et la progression tumorale (Liu et coll., 2002; Rabinovich et coll., 2002; Takenaka et coll., 2004). Des évidences cliniques ont montré une corrélation entre le taux élevé d'expression de la galectine-3 dans les cellules tumorales malignes et les propriétés de plusieurs types de cancer (Lotan et coll., 1994; Xu et coll., 1995). En conséquence, la galectine-3 semble être une protéine associée au cancer qui joue un rôle important au cours de la cancérogenèse et/ou la progression tumorale

Certaines données de la littérature laissent à penser que la galectine-3 peut interagir avec l'élastine fibreuse et transduire les signaux des peptides d'élastine (Ochieng et coll., 1999; Pocza et coll., 2008). C'est pourquoi, certains auteurs considèrent que la galectine-3 pourrait être un récepteur de l'élastine. Toutefois, des études additionnelles doivent être produites pour étayer cette théorie.

4. Signalisation

Les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine semblent être très différentes selon le type de cellules stimulées (cf. Tableau 1, page 29). Les voies les mieux connues sont celles en aval du complexe récepteur de l'élastine.

Ces phénomènes sont souvent dépendants d'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique libre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fulop et coll., 1986). C'est pourquoi de nombreuses études ont porté dans un premier temps sur l'étude de l'effet des peptides d'élastine sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Les peptides d'élastine augmentent la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et inhibent sa sortie chez les fibroblastes dermiques, les monocytes et les cellules musculaires lisses artérielles. Le blocage de la sortie de calcium se ferait via une pompe Ca^{2+} calmoduline dépendante (Jacob et coll., 1987) et la stimulation par un récepteur couplé à une protéine G (Fulop et coll., 1986; Hauck et coll., 1995).

Chez les fibroblastes dermiques humains, les PE augmentent l'expression de procollagenase-1, dont la forme est essentiellement active dans la réaction stromale (Brassart et coll., 2001). La voie des MAP Kinases tient un rôle central dans la signalisation conduisant à ce phénomène (Duca et coll., 2002). Dans ce système, ERK 1/2 est activée à la fois par la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA) et par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). L'activation de ERK 1/2 nécessite sa phosphorylation par des protéines kinases extracellulaires activées par des mitogènes (MEK 1/2), qui sont elles-mêmes généralement phosphorylées et activées par les kinases nommées Raf (Houslay et Kolch, 2000). Chez les mammifères, la famille Raf est composée de trois membres: Raf-1, A-Raf et B-Raf. Par rapport à Raf-1, B-Raf est un activateur fort de la voie ERK, tandis que A-Raf est plus faible (Chong et coll., 2003; Mercer et Pritchard, 2003). Raf-1 est activé par la protéine Ras, mais d'autres activateurs tels que la protéine kinase C ou la PI3K ont également été signalés (Dhillon et Kolch, 2002). La phosphorylation de Raf-1 sur Ser338 est essentielle pour son activation (Mason et coll., 1999). Trois classes de PI3K ont été caractérisées (Anderson et Jackson, 2003), mais seulement celles qui appartiennent à la classe I, qui comprend les sous-classes IA et IB, ont été démontrées pour activer ERK 1/2. Cette activation se fait au niveau de Raf-1 ou MEK 1/2 (King et coll., 1997; Takeda et coll., 1999; Mas et coll., 2003).

V. Devenir cellulaire

1. Survie cellulaire

a. Facteurs de survie cellulaire

La survie des cellules dépend de différents facteurs à action autocrine ou paracrine. Expérimentalement, une cellule isolée de ses voisines entre en apoptose si elle n'est pas supplémentée par le ou les facteurs de survie approprié(s). Diverses hormones, cytokines et facteurs de croissance jouent un rôle de facteur de survie. Cependant, toutes les hormones ou cytokines ne sont pas des facteurs de survie, certaines sont de puissants inducteurs d'apoptose (Kiess et Gallaher, 1998). L'IGF-1 et l'*interleukine 3* (IL-3) régulent l'apoptose de nombreux types cellulaires. D'autres molécules de signalisation ont une action restreinte à un ou quelques tissus cibles. L'IGF-1 agit en tant que facteur de survie en activant la voie Ras/MAPK (mitogen activated protein kinase) et/ou la voie PI3K/Akt.

b. La voie de survie Ras-Raf-MEK-ERK

Les trois membres de la famille Ras, H, N et K-Ras, sont des régulateurs clés des voies de transduction des signaux de prolifération cellulaire, de différenciation, de survie et d'apoptose (Omerovic et Prior, 2009). Ras est activé par une grande variété de stimuli extracellulaires, y compris les facteurs de croissance, les hormones et les contacts entre les cellules et la matrice extracellulaire. Le haut degré d'homologie des différentes isoformes de Ras suggère qu'elles sont fonctionnellement identiques mais une accumulation de preuves révèle que l'activation des effecteurs s'effectue par les différentes isoformes de Ras. Les isoformes de Ras sont également situées sur différents microdomaines membranaires, renforçant l'idée d'une fonctionnalité et d'une régulation distincte de ces protéines (Wolfman, 2001; Omerovic et coll., 2007).

La forme active de Ras est liée à un GTP alors que la forme inactive est liée à un GDP. Le cycle de Ras est régulé par des facteurs d'échange de nucléotide guanine (*guanine-nucleotide exchange factors*, GEFs) qui favorisent le remplacement des nucléotides liés à Ras, favorisant l'état actif lié au GTP. Suite à une stimulation extracellulaire, Ras est activé suite

au recrutement de GEFs à la membrane plasmique, où est situé Ras (Overbeck et coll., 1995). Ras lié au GTP active alors un certain nombre d'effecteurs en aval.

La cible de Ras la mieux caractérisée est la sérine/thréonine kinase Raf, qui conduit à l'activation de la voie ERK qui joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire et la différenciation (Ramos, 2008).

L'activation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK est en mesure de promouvoir des processus cellulaires différents et parfois opposés. Par exemple, une activation longue et importante de la voie ERK induit un arrêt du cycle cellulaire qui peut provoquer la sénescence (Tresini et coll., 2007), l'apoptose (Tang et coll., 2002) ou la différenciation (Cowley et coll., 1994), alors qu'une activation soutenue, mais de plus faible niveau de ERK, est une caractéristique commune de prolifération cellulaire dans de nombreux systèmes (Pages et coll., 1993).

Plusieurs études ont suggéré que Ras et ses effecteurs en aval Raf/MEK/ERK sont des médiateurs importants de la survie induite par les facteurs de croissance dans de nombreux types cellulaires (Borasio et coll., 1989; Borasio et coll., 1993; Nobes et Tolkovsky, 1995).

Il est aussi établi que la voie Raf/MEK/ERK promeut dans certaines circonstances la survie cellulaire (Xia et coll., 1995; Parrizas et coll., 1997; Anderson et Tolkovsky, 1999; Bonni et coll., 1999).

c. La voie de survie PI3K/Akt

i. La phosphoinositide-3 kinase

Les lipides transmembranaires jouent un rôle important dans la transduction du signal. Par exemple, le 4,5-phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂) peut être activé en 3,4,5-phosphatidylinositol-triphosphate (PIP₃) par phosphorylation en position 3' par une PI3K. Il existe trois classes de PI3K qui diffèrent en fonction de la spécificité du substrat et de leurs sous-unités catalytiques et régulatrices (Anderson et Jackson, 2003). Les PI3K possèdent un domaine catalytique (PI3Kc) qui est retrouvé dans les PI4-kinases (Wymann et Pirola, 1998; Vanhaesebroeck et coll., 2001). Les PI3K présentent également un site d'homologie avec la

protein kinase C (domaine C2) et les PI3-kinases I et II possèdent un site de fixation à la petite protéine G Ras (domaine RasB).

Les produits des PI3K que sont le PIP₂ et le PIP₃ se fixent aux domaines pleckstrine (domaine PH) de diverses molécules de signalisation. La protéine-kinase-1 phospho-inositide-dépendante (PDK1) est une de ces molécules.

Il devint rapidement clair que la PI3K est l'une des principales voies anti-apoptotiques en réponse à l'activation d'un large éventail de signaux tels que les facteurs de croissance et d'attachement à la matrice extracellulaire (Cantley, 2002). La protéine sérine/thréonine kinases Akt (aussi appelée protéine-kinase B, PKB) est le principal effecteur transduisant les signaux de survie en aval de la PI3K.

ii. *La Ser/Thr kinase Akt*

Akt est une protéine d'environ 480 résidus qui comporte un domaine PH en N-terminal et un domaine kinase C-terminal homologue à ceux de la PKA et de la PKC (Brazil et coll., 2002). Les organismes multicellulaires expriment trois isoformes d'Akt : α , β , γ .

Le domaine PH qui est très conservé entre les 3 isoformes est crucial pour l'activation de la kinase. Il fixe le PIP₃ et permet son recrutement à la membrane (Andjelkovic et coll., 1997; Frech et coll., 1997). Seulement, Akt n'est pas activée par la liaison de ses lipides cibles à son domaine PH. L'activation requiert la phosphorylation de sa Thr 308, qui est située dans la boucle d'activation d'Akt. Cette phosphorylation est catalysée par la PDK-1, kinase constitutivement active dont le domaine PH fixe également les 3-phospho-inositides. PDK-1 phosphoryle aussi la Ser 473 d'Akt qui est nécessaire à sa complète activation. Muter les résidus du domaine PH d'Akt nécessaires à la fixation des lipides bloque sa phosphorylation *in vitro* par la PDK-1. Cependant, l'élimination de ce domaine PH affranchit Akt du besoin de 3-phospho-inositides. Ceci suggère que la liaison d'Akt à ces lipides ancrés dans la membrane induit un changement de conformation qui permet à la PDK-1 de phosphoryler et donc d'activer Akt. C'est donc la colocalisation d'Akt et de la PDK-1, assurée par les 3-phospho-inositides, qui conduit à l'activation d'Akt. C'est ainsi l'action de la PI3K qui est fonctionnellement responsable de ce processus.

2. L'apoptose

a. Définition

L'apoptose est un programme physiologique de "suicide cellulaire" essentiel pour le développement embryonnaire, le fonctionnement du système immunitaire et le maintien de l'homéostasie des tissus des organismes multicellulaires.

L'apoptose est un phénomène particulièrement conservé au cours de l'évolution, qu'il s'agisse des phases de son déroulement ou des gènes impliqués dans son exécution et sa régulation. Ainsi quelque soit le type cellulaire et l'inducteur, les cellules subissant le processus d'apoptose présentent des modifications morphologiques et biochimiques identiques et caractéristiques.

Sur le plan morphologique, la chromatine d'une cellule en apoptose se condense, formant des masses denses accolées à l'enveloppe nucléaire. La cellule perd ensuite ses contacts avec les cellules adjacentes. Simultanément, la cellule se rétracte, présente un aspect "bourgeonnant" puis se fragmente, donnant naissance à des corps apoptotiques (Figure 8). Au cours du processus d'apoptose, les organites ne présentent pas d'altérations particulières et la membrane plasmique conserve son intégrité structurale et fonctionnelle. Le devenir des corps apoptotiques dépend du système cellulaire considéré. *In vivo*, ils sont phagocytés par des macrophages ou des cellules avoisinantes. *In vitro*, les cellules apoptotiques se détachent du support de culture et subissent une lyse cellulaire. Sur le plan biochimique, une série d'événements aboutit à la cessation irréversible des activités cellulaires. On peut citer le clivage de l'ADN en fragments de tailles variables, la translocation des phosphatidylsérines du feuillet cytoplasmique au feuillet externe de la membrane plasmique ou des altérations du cytosquelette (clivage de diverses protéines de structure comme l'actine par exemple). Ces altérations résultent de l'action de protéases, les caspases, spécifiquement activées au cours de la phase d'engagement des cellules dans le processus d'apoptose.

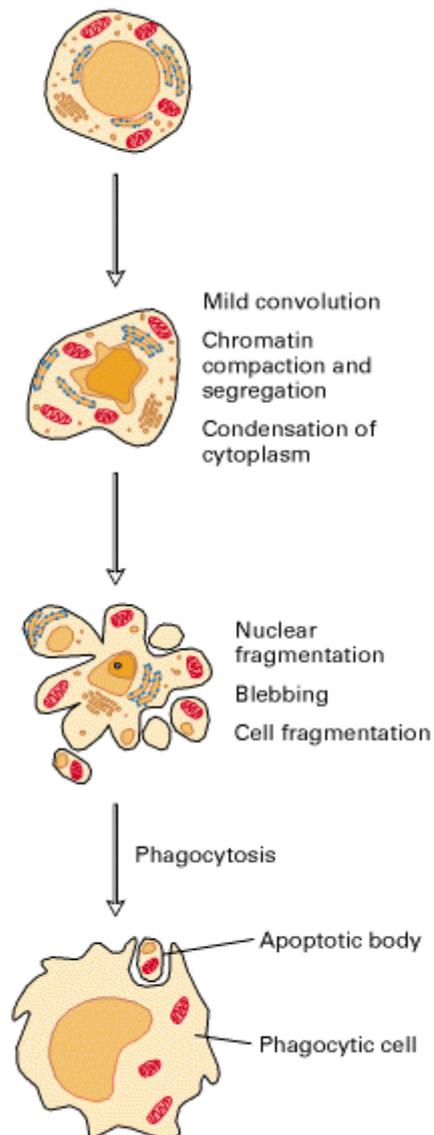


Figure 8 : Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par apoptose.

Schéma illustrant les changements morphologiques au cours de l'apoptose. Au début, la chromatine se condense en périphérie du noyau. Le corps cellulaire rétrécit, bien que la plupart des organites restent intacts. Plus tard, le noyau et le cytoplasme se fragmentent, formant des corps apoptotiques qui sont phagocytés par des cellules proches (Kuby, 1997).

b. Les voies apoptotiques

Il existe deux voies par lesquelles l'activation des caspases est déclenchée : la voie apoptotique extrinsèque et la voie intrinsèque.

La voie extrinsèque est activée par l'engagement des récepteurs de mort à la surface cellulaire (Ashkenazi et Dixit, 1998). La liaison de ligands tels que FasL et le TNF aux récepteurs Fas et du TNF (TNFR), induit la formation d'un complexe de signalisation, qui, à son tour, recrute la caspase-8 et promeut l'activation de la cascade des procaspases (Boldin et coll., 1996; Muzio et coll., 1996).

La voie intrinsèque est déclenchée par divers stimuli extracellulaires et intracellulaires, comme le retrait de facteurs de croissance (Letai, 2006), l'hypoxie (Weinmann et coll., 2004), les dommages à l'ADN (Zhang et Xu, 2000) et l'induction d'oncogènes (Canman et Kastan, 1995). Les signaux qui sont transduits en réponse à ces stress convergent principalement aux mitochondries.

Des protéines de la famille Bcl-2 peuvent gouverner la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe provoquant la libération du cytochrome c. Des membres pro-apoptotiques tels que Bad, Bak, Bax et Bcl-X_S induisent ce phénomène alors que des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-X_L et Bcl-w l'empêchent.

La protéine Bad (Bcl-2 associated death promoter) est un membre pro-apoptotique impliqué dans le déclenchement de l'apoptose. Contrairement à la plupart des protéines de la famille Bcl-2, elle ne possède pas de domaine Ct transmembranaire à la membrane externe de la mitochondrie ni de séquence de ciblage nucléaire. Quand elle est déphosphorylée, celle-ci forme un hétérodimère avec Bcl-2 et Bcl-X_L, permettant de les inactiver. L'apoptose est alors déclenchée par la formation de pores au niveau de la membrane externe mitochondriale grâce aux protéines Bax/Bak. Le cytochrome c est alors libéré dans le cytoplasme où un large complexe protéique, nommé apoptosome, contenant le cytochrome c, le facteur activant les protéases apoptotiques (APAF1) et la caspase-9, va provoquer l'activation des caspases en aval comme la caspase-3 (Zou et coll., 1997).

c. Les caspases

L'apoptose dans les cellules de mammifères est médiée par une famille des protéases connues sous le nom de caspases (Cohen, 1997). Les caspases sont des cystéine-protéases ayant une cystéine dans une séquence conservée QACXG de leur site actif. Elles clivent leurs substrats protéiques après un résidu aspartate situé dans des séquences consensus de type

DEVD, YVHD, VEID, etc. Ces deux caractéristiques sont à l'origine du terme caspase (*CysteinyI aspartate-specific proteinase*). Pour maintenir le programme apoptotique sous contrôle, les caspases sont d'abord exprimées dans les cellules sous forme de précurseurs inactifs ou procaspases. Lorsque les caspases initiatrices, telles que la caspase-8 et la caspase-9, sont activées par oligomérisation, elles clivent les précurseurs des caspases effectrices, comme la caspase-3, la caspase-6 et la caspase-7. Les caspases initiatrices sont capables d'auto-activation et ont généralement un long prodomaine. Des études cristallographiques ont révélées que la caspase active est un tétramère de deux hétérodimères, donc contenant deux sites actifs (Walker et coll., 1994; Wilson et coll., 1994; Rotonda et coll., 1996). Les caspases effectrices ont besoin des caspases initiatrices pour leur activation par clivage. Les caspases effectrices activées vont à leur tour cliver un ensemble spécifique de substrats protéiques.

Certains membres de cette famille de protéines (caspase-1, -11) sont impliqués dans le clivage intracellulaire de cytokines pro-inflammatoires spécifiques, incluant l'IL-1 et l'IL-18 (Fantuzzi et Dinarello, 1999). D'autres effecteurs, tels que la caspase-3 et -7, sont les effecteurs de l'apoptose puisque le clivage de leurs substrats conduit aux modifications morphologiques associées à l'apoptose, dont la dégradation de l'ADN, la condensation de la chromatine, et de la formation de corps apoptotiques (Lakhani et coll., 2006).

3. La sénescence

a. Définition

Le mot sénescence dérive du latin *senex* qui veut dire âgé. La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois par Moorhead et Hayflick en 1961 (Hayflick et Moorhead, 1961). Ils ont découvert qu'après de nombreux doublements, la prolifération des fibroblastes dermiques humains diminuait. Les cellules entrent alors dans une forme d'arrêt du cycle cellulaire permanent qui est connu sous le nom de sénescence réplivative. Ces cellules qui sont viables sont incapables de se diviser pendant de nombreuses semaines en culture malgré la présence de nutriments et de facteurs de croissance.

Peu de temps après cette découverte, la constatation que les cellules normales ne prolifèrent pas indéfiniment a engendré deux hypothèses. La première hypothèse découle du fait que de nombreuses cellules cancéreuses prolifèrent indéfiniment en culture. La

sénescence cellulaire a été proposée comme un mécanisme anticancéreux ou suppresseur de tumeur. Dans ce contexte, la sénescence a été jugée bénéfique, car elle protégeait les organismes du cancer. La deuxième hypothèse découle du fait que la régénération et la réparation tissulaire se dégradent avec l'âge. La sénescence cellulaire mime le vieillissement, ou la perte de capacité de régénération, des cellules *in vivo*. Dans ce contexte, la sénescence cellulaire a été jugée néfaste, car elle diminue la capacité de renouvellement des tissus et contribue à leur perte de fonction.

b. Caractéristiques des cellules sénescentes

Une cellule sénescente montre des changements morphologiques typiques, comme un cytoplasme aplati de granularité accrue.

Les fibroblastes dermiques humains sénescents sont généralement plus grands, moins mobiles, et présentent une densité de saturation diminuée par rapport au fibroblaste en début de culture. En outre, la taille du noyau et la quantité d'ARN, de protéines, de glycogène, des lipides et des lysosomes sont tous augmentés.

Au niveau biochimique, la sénescence est accompagnée par des changements dans le métabolisme et l'induction de la β -galactosidase acide (Dimri et coll., 1995). Au niveau génétique, des modifications de la structure chromatinienne et de l'expression génique sont observées.

VI. Les céramides

1. Généralités

Les céramides sont des sphingolipides au même titre que la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate. Toutes ces molécules sont des messagers primordiaux impliqués dans divers processus biologiques et, notamment, la réponse cellulaire au stress, l'induction de l'apoptose, la différenciation et la régulation de la croissance cellulaire (Perry et Hannun, 1998).

Les céramides sont composés d'un squelette sphingosine lié à un acide gras par une liaison amide (Figure 9). Les propriétés fondamentales de cette molécule se retrouvent sur les carbones 1 à 5 du squelette sphingosine. Des groupes hydroxyles primaire et secondaire sont en positions C₁ et C₃. Un groupe aminé sert à la liaison de l'acide gras en C₂ et une double liaison en trans est localisée entre le C₄ et le C₅. Cette double liaison est importante car elle donne au céramides une conformation qui les rendent biologiquement actifs (Hannun, 1994). La formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire a lieu entre les groupes hydroxyles en C₁ et C₃ qui est stabilisée par la présence de la double liaison (Simon et Gear, 1998).

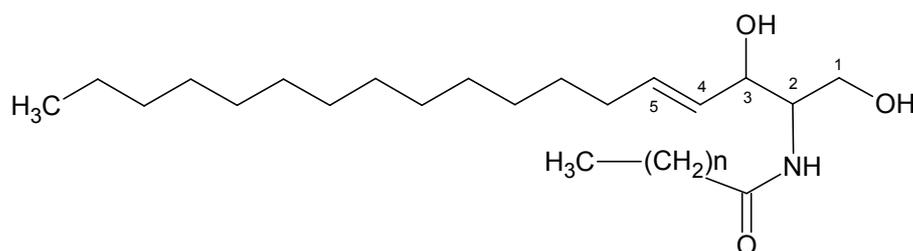


Figure 9 : Structure chimique des céramides

Il existe des céramides avec des acides gras contenant de 2 à 28 atomes de carbone, soit saturé ou mono insaturé.

Quand un céramide sert de précurseur à d'autres sphingolipides, son site majeur de modification se situe sur le groupe hydroxyle en C₁. Celui-ci peut alors servir comme accepteur de glucose dans la première étape de synthèse des glycosphingolipides (Popa et Portoukalian, 2003) ou comme un accepteur de phosphorylcholine pour obtenir de la sphingomyéline (Bernert et Ullman, 1981). Inversement, dans la voie catabolique, le céramide est clivé sur la liaison amide pour obtenir de la sphingosine et un acide gras. Le céramide constitue aussi le squelette hydrophobe de tous les sphingolipides complexes (sphingomyéline, cérébroside, ganglioside, etc.).

2. Propriétés physiques

Les céramides avec une chaîne d'acide gras de 16 carbones ou plus sont les plus retrouvés au niveau cellulaire (Kolesnick et coll., 2000). Les céramides sont extrêmement hydrophobes, en comparaison avec d'autres lipides membranaires. En conséquence, les céramides libres ne peuvent pas exister en solution dans les fluides biologiques. L'hydrophobie des céramides

explique leur abondance dans la couche cornée, la barrière qui évite à l'eau de s'évaporer à travers la peau (Wertz et Downing, 1983).

Les céramides ne peuvent exercer leurs actions qu'au niveau membranaire, où ils peuvent agir sur des protéines membranaires, liées en permanence ou transitoirement à la membrane. Leur action peut avoir lieu de deux manières.

Sur les protéines qui ne présentent pas de sites de fixation spécifique pour eux, les céramides semblent agir en induisant des changements locaux des propriétés physiques de la membrane ; par exemple, en augmentant l'ordre des chaînes de lipides qui peuvent en retour modifier l'activité enzymatique. Les protéines intégrales sont très sensibles aux changements dans la double couche lipidique et/ou à la fluidité (Watts, 1993). Dans certains cas, les changements induits par les céramides peuvent agir sur l'affinité de la protéine pour la membrane (Sawai et coll., 1997; Igarashi et coll., 1999).

Les céramides peuvent également se fixer à des sites spécifiques sur la protéine cible et moduler ainsi son action enzymatique. Ce mécanisme peut opérer non seulement sur les protéines qui sont liées en permanence aux membranes (van Blitterswijk, 1998) mais aussi aux protéines transitoirement recrutées à la bicouche où les céramides sont localisés (Chalfant et coll., 1999).

3. Biosynthèse des céramides

Comme présenté sur la Figure 10, les céramides résultent de la condensation *de novo* d'une sérine avec un acyl-coA, le palmitoyl-coA étant le plus couramment utilisé (Williams et coll., 1984). Cette réaction libère la 3-cétosphinganine ensuite réduite en dihydrosphingosine sous l'action d'une oxydoréductase NADPH dépendante (Stoffel et Henning, 1968). La céramide synthase (dihydrocéramide synthase ou sphinganine acyl-transféase) catalyse alors l'acylation de la dihydrosphingosine en dihydrocéramide (N-acylsphinganine). La céramide synthase existe probablement sous plusieurs isoformes, différant selon leur spécificité de substrat et leur localisation tissulaire (Pewzner-Jung et coll., 2006).

Les céramides sont ensuite formés sous l'action d'une désaturase (dihydrocéramide réductase) intervenant en C_{4,5} de l'amine sphingoïde (Rother et coll., 1992), réaction de désaturation NAD-dépendante. Alternativement, les céramides pourraient résulter de

l'acylation de la sphingosine sous l'action d'une N-acyltransférase non encore identifiée (Narimatsu et coll., 1986). Il semble que les céramidases puissent exercer une synthèse inverse des céramides via un processus ATP-dépendant en l'absence d'acyl-coA (Gatt, 1966).

Les céramides s'accumulent sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique lisse (Mandon et coll., 1992) où ils peuvent être réorientés vers d'autres compartiments subcellulaires (translocation à la membrane plasmique ou transit intra-golgien notamment) et être utilisés comme précurseurs dans la synthèse de sphingolipides complexes (sphingomyéline, glycosphingolipides).

La sphingomyéline (SM) peut être pour sa part une source non négligeable de céramide par l'action de sphingomyélinases spécifiques (SMases) (Gomez-Munoz, 1998). Il a été montré que de nombreux agonistes incluant le TNF- α , l'endotoxine, l'interferon γ , les interleukines, le NGF, les radiations ionisantes, les agents chimiothérapeutiques et la chaleur stimule l'hydrolyse de la SM pour produire des céramides et de la phosphorylcholine (Hannun, 1994; Heller et Kronke, 1994; Hannun, 1996).

4. Voies associées à leur formation

Les céramides sont de puissants activateurs de sérine/thréonine protéines kinases et phosphatases, appelées CAPK ou CAPP pour *ceramide activated protein kinase/phosphatase* (Dobrowsky et Hannun, 1992), dont le rôle a récemment été évoqué en tant que médiateurs de l'apoptose et dans l'arrêt de croissance cellulaire induits par les céramides (Wolff et coll., 1994; Nickels et Broach, 1996; Reyes et coll., 1996). Ces enzymes ont pour cibles d'importants régulateurs de croissance et d'apoptose comme *c-jun* (Reyes et coll., 1996), Akt (Salinas et coll., 2000), la protéine kinase C α (Lee, 1996) et Bcl-2 (Ruvolo et coll., 1999). Les céramides peuvent également inhiber la phospholipase D mais aussi favoriser la diminution d'expression de *c-myc*, induire la libération de prostaglandine E2 et réguler de nombreuses protéines kinases et d'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (Mathias et coll., 1993; Hannun et Luberto, 2000).

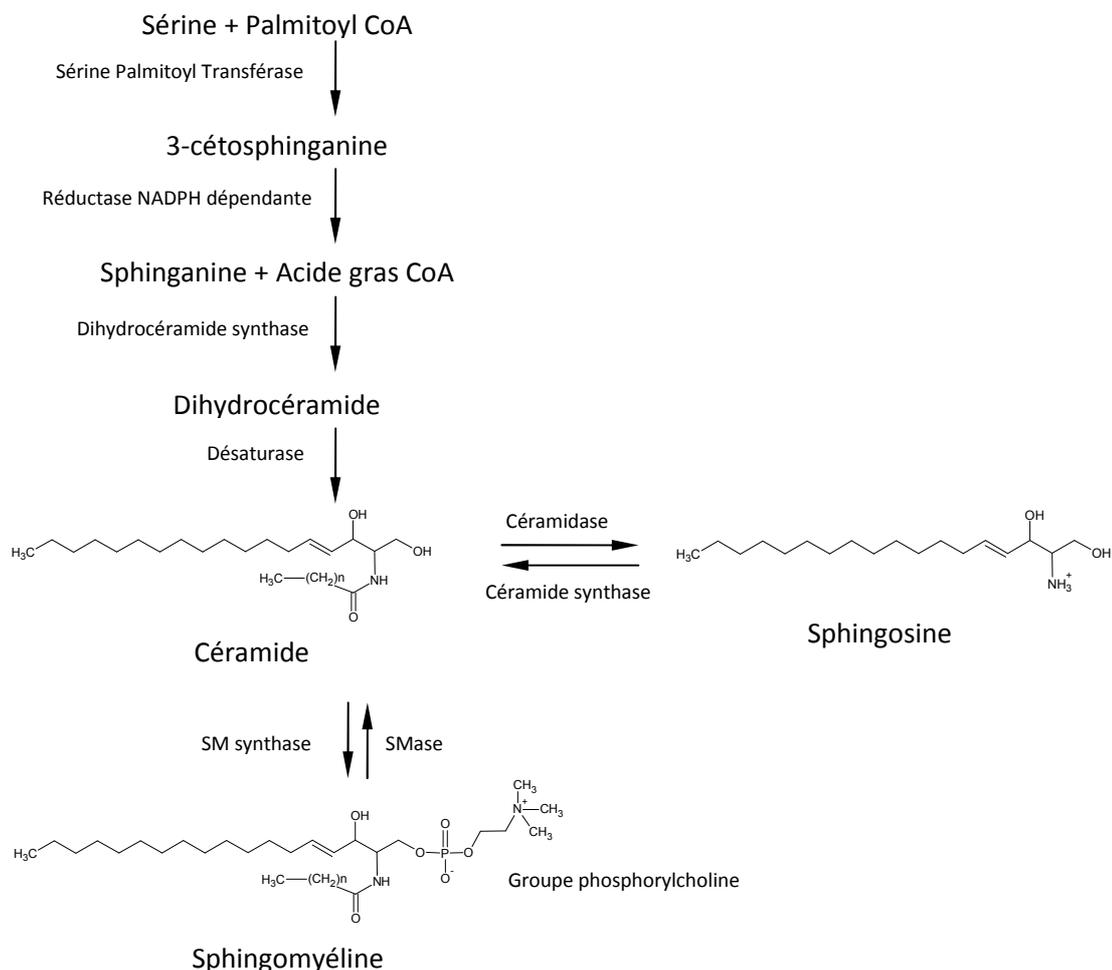


Figure 10 : Voies de biosynthèse des céramides

Les céramides peuvent également cibler de façon directe ou indirecte la mitochondrie et altérer la transition de perméabilité membranaire, à l'origine de la libération de ROS et de la libre diffusion de facteurs apoptotiques (caspases, cytochrome c). L'accumulation de céramides mitochondriaux a ainsi été mise en évidence dans les hépatocytes traités par le TNF- α (Garcia-Ruiz et coll., 1997). Ce pool issu de sphingomyélines mitochondriales peut induire le relargage du cytochrome c (Birbes et coll., 2001) mais aussi initier les signaux de mort cellulaire en agissant directement sur l'activité des protéines de la famille Bcl-2, en favorisant leur déphosphorylation, à la fois par l'activation d'une phosphatase mitochondriale (Ruvolo et coll., 1999) et l'inhibition de la protéine kinase C α (Lee, 1996) (Ruvolo et coll., 1998). L'accumulation de céramides dans la mitochondrie pourrait également induire un

découplage de la chaîne respiratoire menant à la génération de ROS (Garcia-Ruiz et coll., 2000).

De nombreux agonistes physiologiques ou environnementaux, stimuli de stress ou agents cytotoxiques, sont capables de moduler la synthèse et la dégradation des céramides. Ce mode de transduction en réponse à différents agonistes est aujourd'hui bien décrit. Le TNF- α (Jayadev et coll., 1994), l'IL-1- β (Mathias et coll., 1993), l'interféron γ (Kim et coll., 1991), certaines hormones et cytokines (Quintans et coll., 1994; Strum et coll., 1995; Catalan et coll., 1996), le ligand de Fas (Cifone et coll., 1994), différents stress environnementaux comme les radiations ionisantes (Wright et coll., 1996), le choc thermique (Chang et coll., 1995), l'hypoxie (Turinsky et coll., 1991), de nombreux agents pharmacologiques (Jaffrezou et coll., 1995; Chmura et coll., 1996; Tettamanti et coll., 1996) et de drogues chimiothérapeutiques (Hannun, 1996; Mathias et coll., 1998) sont autant de stimuli agissant via une régulation des sphingolipides endogènes, résultant en l'augmentation des taux de céramides et/ou de sphingosines intracellulaires, générateurs d'un arrêt de la croissance cellulaire, de différenciation ou d'apoptose.

5. Céramides et vieillissement

Dans les cellules de mammifères, les céramides sont impliqués dans le programme de sénescence cellulaire. La concentration intracellulaire de céramides endogènes est élevée chez les FDH en sénescence. L'ajout de céramides à des fibroblastes en culture induit la déphosphorylation (et donc l'activation) de la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb), inhibe le régulateur du cycle cellulaire CDK2 (Lee et coll., 2000), augmente les concentrations des inhibiteurs de cdk p21/Sdi et p27/Kip1 (Ciacci-Zanella et coll., 1998), provoque un arrêt du cycle cellulaire (Jayadev et coll., 1995) et induit la sénescence cellulaire (Venable et coll., 1995; Mouton et Venable, 2000). Plus récemment, les céramides endogènes ont été impliqués dans l'inhibition de l'activité de la télomérase dans des lignées cellulaires humaines en inhibant la transcription du gène de la télomérase humaine hTERT (Ogretmen et coll., 2001b), fournissant ainsi un lien entre la sénescence induite par les céramides et la télomérase. Un mécanisme de cette inhibition implique une dégradation de l'oncoprotéine c-Myc médiée par l'ubiquitine, un régulateur important de la transcription de

hTERT (Ogretmen et coll., 2001a). Toutes ces études corroborent fortement un rôle important des céramides dans la régulation de la voie de la sénescence cellulaire.

Le stress oxydatif, un processus clé dans la formation des espèces réactives de l'oxygène, a clairement été impliqué dans le vieillissement cellulaire et des organismes (Sohal et Weindruch, 1996). La voie des céramides est régulée par le stress oxydatif, la concentration cellulaire de glutathion (GSH) régulant l'hydrolyse de la sphingomyéline afin de générer des céramides (Liu et Hannun, 1997). Il a été proposé que, lorsque la concentration de GSH baisse, l'hydrolyse de la sphingomyéline se produit, conduisant à la production de quantités importantes de céramides. Récemment, la production de céramides médiée par le stress oxydatif a été liée à la maladie neurodégénérative appelée sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot (Cutler et coll., 2002; Acharya et coll., 2003). Plus précisément, la concentration de céramides est sensiblement élevée dans la moelle épinière des tissus provenant de patients atteints de SLA avec des mutations de la superoxyde dismutase Cu/Zn. L'inhibition de la synthèse des sphingolipides empêche la mort des cellules neuronales, indiquant un possible dérèglement dans une enzyme de synthèse *de novo* des sphingolipides. Une des possibilités est que l'enzyme des protéines de la famille LAG (*Longevity Assurance Gene*) est altéré dans la SLA. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le stress oxydatif affecte la formation des céramides et ils impliquent les céramides dans la médiation de certains des effets du stress oxydatif sur la sénescence et l'apoptose. En outre, le stress oxydatif régule le gène suppresseur de tumeur p53 (Sharpless et DePinho, 2002) qui est un régulateur de la sénescence. Des études ont montré que l'induction de p53 entraîne une élévation de la concentration en céramides (Dbaibo et coll., 1998) par le biais d'un mécanisme encore non identifié.

Les mécanismes par lesquels le céramide peut conduire au vieillissement cellulaire ou de l'organisme sont variés. Dans certains cas, cela concerne la signalisation des céramides par elle-même et, dans les autres cas, cela concerne les précurseurs et/ou les produits de dégradation des sphingosines. Les études chez la levure et d'autres organismes modèles comme la drosophile commencent à discerner les liens entre le métabolisme des sphingolipides, la réponse au stress et le contrôle métabolique. Des études supplémentaires sont attendues pour clarifier ces liens et leurs mécanismes dans la régulation de la durée de vie de l'organisme.

But du travail

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de SiRMa "Signalisation et récepteurs matriciels" de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims, appartenant à l'UMR CNRS 6237 MEDyC "Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire". La thématique développée dans l'Unité est l'étude des interactions Matrice Extracellulaire-Cellules dans les conditions physiopathologiques. Une des équipes du laboratoire SiRMa travaille en particulier sur l'élastine et l'implication des peptides dans la signalisation cellulaire. Son champ de recherche s'étend de l'étude de la progression tumorale à l'étude du processus de vieillissement.

L'élastine est une protéine de la matrice extracellulaire responsable de l'élasticité des tissus. Cependant, la dégradation de ce polymère au cours du vieillissement génère des peptides bioactifs appelés peptides d'élastine (PE). Les PE sont capables de réguler la prolifération cellulaire, le chimiotactisme et l'expression de protéases.

Quand des fibroblastes dermiques humains sont stimulés par des PE, une activation importante de la voie Raf-1/MEK1/2/ERK1/2 par la PI3K/p110 γ est observée. Elle aboutit à la production d'une métalloprotéinase matricielle, la MMP-1. Cette activation peut être abolie par des galactosides tels que le lactose.

Les voies Raf-1/MEK1/2/ERK1/2 et la voie PI3K/Akt sont des voies de signalisation liées à la survie cellulaire. Comme les peptides d'élastine sont produits au cours du vieillissement, nous avons émis l'hypothèse qu'ils pourraient modifier l'homéostasie tissulaire en favorisant la survie de cellules qui devraient normalement être éliminées par apoptose, notamment des cellules ayant accumulé des dommages au niveau de leur ADN.

Le but de notre travail a donc été dans un premier temps d'étudier cette action possible des PE sur des fibroblastes dermiques humains issus de sujets matures. Pour cela, nous avons induit la mort cellulaire en traitant ces cellules avec des céramides en présence ou absence de PE. Les résultats de cette étude constituent la partie 1 des résultats.

Au cours du vieillissement, les cellules perdent leur capacité de signalisation suite à une stimulation par les PE. Ce phénomène inexplicé est appelé "découplage du récepteur".

Comme l'explication la plus simple pourrait être la diminution de l'expression du complexe récepteur de l'élastine, nous avons, dans un second temps, étudié l'expression de ce récepteur en fonction de l'âge et l'influence des peptides d'élastine sur l'expression de ce complexe. Ces résultats sont rapportés dans la partie 2.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I. Matériels

Le milieu de culture est du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM+1000mg/L Glucose+GlutaMax ITM+Pyruvate). Il provient, ainsi que la trypsine, de Life Technologies (Cergy Pontoise, France).

Le sérum de veau fœtal (SVF) est fourni par la société PAN-Biotech-GmbH (Dutcher S.A., Brumath, France).

Les anticorps polyclonaux de lapin anti-phospho-Akt (Thr308 et Ser473) et anti-phospho-Bad (Ser136), le U0126 (inhibiteur de MEK 1/2) et le LY294002 (inhibiteur de PI3K) proviennent de Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France).

Le tampon PBS, les antibiotiques, l'anticorps monoclonal de souris anti- β -actine, l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de Raifort, l'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de Raifort, le bisbenzimidazole H33342 (Hoechst), les C₂-céramides et les autres réactifs ont été achetés chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Le kit de dosage protéique BCA provient de la société Interchim (Montluçon, France). Le réactif de chimioluminescence (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus) provient de Perkin-Elmer Life Sciences (Villebon-sur-Yvette, France).

II. Cultures cellulaires

1. Modèle cellulaire utilisé

Dans notre étude, nous avons utilisé des fibroblastes dermiques humains (FDH). Le fibroblaste est une cellule différenciée d'origine mésenchymateuse qui présente de longs prolongements cytoplasmiques (Tarin et Croft, 1969). 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 (Tomasek et coll., 2002). 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 (Zeisberg et coll., 2000). Les fibroblastes prédominent dans les tissus conjonctifs, synthétisent les éléments de la MEC incluant la tropoélastine, les collagènes de type I et III, des protéoglycanes, la thrombospondine, la fibronectine, etc. : cette matrice leur permet de maintenir leur caractère différencié (Chang et coll., 2002; Tomasek et coll., 2002). Ils synthétisent également les protéases intervenant dans le catabolisme et le renouvellement des constituants matriciels dont de nombreuses MMPs (Simian et coll., 2001). Les fibroblastes se distinguent de beaucoup de types cellulaires par leurs capacités à conserver sa morphologie en 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).

2. Obtention des fibroblastes dermiques à partir d'explant de peau

Les fibroblastes sont isolés à partir de biopsies de peau de patients sains d'âge contrôlé, après obtention de leur consentement et sous couvert d'anonymat. Les explants de peau sont placés dans du PBS stérile, et débarrassés de leur couche adipeuse avant d'être réduits en petits fragments. Ceux-ci sont placés dans une flasque de culture de 75 cm² et sont recouverts de milieu de culture composé de DMEM contenant du Glutamax[®] comme source de glutamine supplémenté de 20% de sérum de veau foetal (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 à 5 semaines environ, les premières cellules sortent des explants et arrivent rapidement à confluence. Les cellules sont alors trypsinées pour être réensemencées.

3. Entretien des cellules

Les cellules sont cultivées en flasques de 75 cm² dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Leur croissance s'effectue dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et des antibiotiques à raison de 200 U de pénicilline/ml et 50 µg de streptomycine/ml. Le temps de doublement des FDH est de 48 heures.

4. Obtention de sous-culture par trypsination

Au bout d'une semaine, les fibroblastes vont recouvrir la totalité de la surface des flasques: c'est ce qu'on appelle un état de confluence. Ils subissent alors un "passage": les cellules sont incubées pendant 5 min en présence de trypsine (0,05% p/v) à 37°C pour les détacher de leur support et les individualiser puis elles sont diluées au quart dans un milieu nouvellement préparé aux concentrations vues précédemment. Les cellules sont utilisées du 3^{ème} au 7^{ème} passage.

5. Mise au repos des cellules

La mise au repos des cellules 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, cultivées dans les conditions précédemment citées et ayant atteint un taux de confluence de 90%, sont lavées 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 pendant 24 h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

III. Préparation des peptides d'élastine

L'élastine fibreuse insoluble extraite du ligament de la nuque de boeuf peut être solubilisée par la potasse en milieu éthanolique (Jacob et Hornebeck, 1985). Cette méthode d'hydrolyse génère des peptides d'élastine solubles en milieu aqueux appelés κ -élastine.

L'élastine (1 g) est mise en solution dans 100 ml d'un mélange d'éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1 M. Le mélange est agité pendant 1 h à 37°C. Cette température favorise la solubilisation de l'élastine. Le surnageant est récupéré par centrifugation (12500 g, 4°C, 10 min). 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 1 M. 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 kE est dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Les peptides ainsi générés sont appelés peptides d'élastine (PE). Ils 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, dont la masse moléculaire est de 75 kDa, a été retenue pour nos différentes expérimentations.

IV. Stimulation des cellules par les peptides d'élastine

Pour l'extraction protéique, les fibroblastes sontensemencés à raison de 6×10^5 cellules par flasques de 25 cm². Pour les marquages nucléaires, les fibroblastes sontensemencés à raison de 5×10^4 cellules par puits dans des plaques 24 puits (1,88 cm²/puits).

Les cellules sont mises à incuber à 37°C sous 5% de CO₂. Celles-ci recouvrent entièrement le fond des puits en 48 heures. Après 2 lavages au PBS, elles sont mises au repos pendant 24 heures. Le jour de l'expérience, les cellules sont rincées 2 fois avec du tampon PBS puis incubées avec de la kE à 50 µg/ml dans du DMEM à différent temps.

Pour mesurer l'apoptose, les fibroblastes sont cultivés et stimulés comme précédemment mais, dans ce cas, des C₂-céramides (20 µM dilués dans du DMSO) sont utilisés pour induire la mort cellulaire.

Dans le cas de l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, ces derniers sont incubés de 1 h à 3 h en fonction de l'inhibiteur dans du milieu DMEM avant de stimuler les cellules.

V. Marquages nucléaires

L'une des caractéristiques de l'apoptose est la formation de corps apoptotiques. Ce phénomène sera accompagné d'une condensation et d'une fragmentation de la chromatine.

Les fibroblastes en apoptose sont mis en évidence par marquage au Hoechst 33342 (Figure 11).

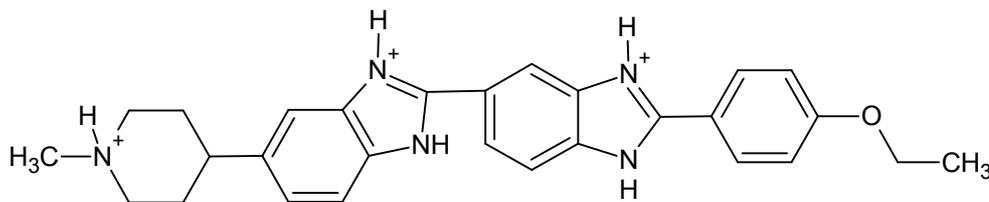


Figure 11 : Hoechst 33342

Cette molécule est un marqueur fluorescent qui se fixe à l'ADN double brin au niveau de séquences riches en Adénine-Thymine. Son maximum d'excitation se trouve à 340 nm (violet) et son maximum d'émission à 465 nm (bleu).

Les fibroblastes en nécrose sont mis en évidence par marquage à l'iodure de propidium (Figure 12). Ce fluorochrome se fixe à l'ADN double brin. Il pénètre facilement dans les cellules nécrosées pour les marquer mais il ne peut pas traverser la membrane plasmique des cellules vivantes.

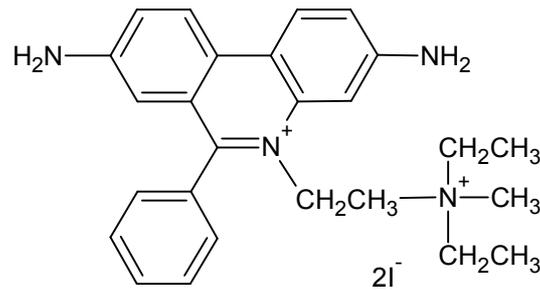


Figure 12 : Structure chimique de l'iodure de propidium

Cette molécule absorbe les radiations dans le bleu-vert (493 nm) et émet une fluorescence dans le rouge (630 nm).

Les fibroblastes sont traités avec de la kE et des C₂-céramides comme décrit plus haut. Dans le cas où des inhibiteurs sont utilisés (LY294002 et U0126), ils sont pré-incubés 1 heure avant la stimulation. Le lactose est, pour sa part, pré-incubé 3 heures avant.

La solution mère de Hoechst (10⁻² M dans de l'eau distillée) est diluée au 1/1000 dans du PBS. Après 20 heures de stimulation, les puits sont vidés de leur milieu et du Hoechst est ajouté. Les cellules sont incubées 15 min à 37°C. L'iodure de propidium est alors ajouté (10 mg/ml dilués au 1/1000 dans du PBS). Le marquage et la morphologie des noyaux sont évalués en utilisant un microscope à fluorescence Nikon Eclipse TE300.

Les cellules en apoptose sont identifiées par un marquage bleu intense de la chromatine condensée ou une fragmentation nucléaire. Les cellules en nécrose sont caractérisées par une fluorescence rouge émise par la chromatine.

VI. Cytométrie de flux

Pour l'analyse de l'apoptose, nous avons utilisé le MACS® Annexin V-FITC Kit (Miltenyi biotec, Paris, France). Les cellules apoptotiques sont marquées à l'annexine V.

Dans les cellules, la phosphatidylsérine (PS) est localisée au niveau du feuillet intracellulaire de la double couche lipidique. Dès les premières étapes de l'apoptose, une redistribution des molécules de PS a lieu vers le feuillet extracellulaire. L'annexine V est une protéine de 35 kDa qui a une haute affinité pour la PS en présence de concentrations

physiologiques de calcium. Afin de visualiser les molécules d'annexine V qui se sont fixées sur les membranes cellulaires, celles-ci sont couplées à un fluorophore appelé FITC (*Fluorescein Iso Thio Cyanate*) (Figure 13). Celui-ci émet des radiations dans le vert à 520 nm.

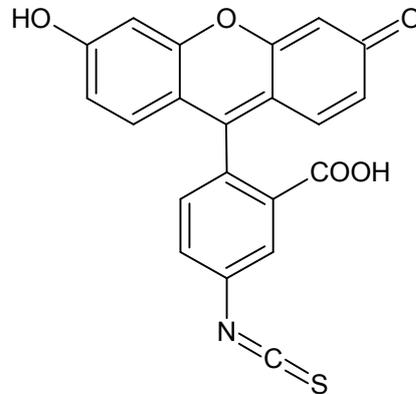


Figure 13 : Structure chimique de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

Comme le conjugué annexine V-FITC se fixe aussi au niveau des cellules en nécrose, un marquage au 7AAD (7-amino-actinomycine D) est également utilisé. Le 7AAD s'intercale entre les doubles brins de l'hélice d'ADN. Il est exclu par les cellules viables mais peut facilement pénétrer les membranes cellulaires des cellules en nécrose.

Les cellules sont cultivées et stimulées en plaque 6 puits. La stimulation est arrêtée par ajout de PBS froid et les cellules sont remises en suspension dans un tampon de fixation. Elles sont ensuite incubées avec le conjugué annexine V-FITC pendant 15 min à température ambiante et incubées pendant 10 min avec du 7AAD. La fluorescence est analysée par cytométrie de flux par un appareil FACScalibur.

VII. Test d'activité caspase-9

Le test d'activité caspase-9 est réalisé à l'aide d'un kit commercial appelé *FLICA Apoptosis Detection Kit* (Serotec, Düsseldorf, Allemagne). Il utilise une nouvelle approche pour détecter les caspases actives. La méthode est basée sur l'utilisation d'un fluorochrome inhibiteur de caspase (FLICA). Ces inhibiteurs sont perméables à la membrane cellulaire et

non cytotoxiques. Une fois à l'intérieur de la cellule, une molécule de type *FAM-LEHD-FMK* se fixe de façon covalente sur les caspase-9 actives.

Cette molécule possède la séquence polypeptidique LEHD qui se fixe de façon spécifique sur la caspase-9. En N-terminal, cette séquence présente de la carboxyfluorescéine (FAM) pouvant émettre des radiations vertes. Elle possède un groupement fluorométhyl cétone terminal (FMK) en C-terminal. Quand le *FAM-LEHD-FMK* (FLICA) entre dans le site actif d'une caspase-9 active (grâce à sa séquence LEHD), le groupement FMK réagit avec le résidu cystéyl catalytique de l'enzyme ce qui permet au FLICA de fluorescer dans un panel de longueurs d'onde allant de 515 nm à 535 nm par excitation à 488 – 492 nm. Les réactifs qui ne se sont pas fixés diffusent dans le milieu de culture sans émettre de fluorescence.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits au fond desquels sont placées des lames de microscopes. Après une mise au repos de 24 heures, les cellules sont stimulées avec les différents traitements aux temps étudiés. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par un nouveau milieu contenant une solution de FLICA 30X à un ratio de 1/30. Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu est à nouveau éliminé et remplacé par un milieu contenant du Hoechst 33342 (0,5% v/v). Les cellules sont incubées 5 min à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu est éliminé et les cellules subissent 2 lavages de tampon (Washing Buffer 1X). Les cellules sont ensuite fixées par l'agent fixant livré avec le kit et montées sur une lame de microscope.

Les cellules sont placées sous un microscope à fluorescence utilisant une longueur d'onde d'excitation de 490nm et qui permet de visualiser radiations émises à 520 nm pour observer la fluorescence indiquant la présence de caspases actives. Le marquage au Hoechst peut être visualisé en utilisant un filtre UV d'excitation à 365 nm et d'émission à 480 nm.

VIII. Méthode d'analyse des protéines

1. Préparation des extraits cellulaires totaux

Pour étudier les phosphorylations de protéines, les cellules sont stimulées au cours d'une cinétique suivant les temps indiqués.

La réaction est arrêtée par ajout de PBS froid contenant 50 μM d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), un inhibiteur de phosphotyrosyl phosphatases. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec le même tampon, puis elles sont récoltées par grattage et centrifugées 10 min à 400 g et 4°C. Cette opération est répétée 2 fois. Les culots obtenus sont remis en suspension dans du tampon de lyse (0,5% v/v Triton X-100, 80 mM β -glycérophosphate, EGTA à 50 mM, Na_3VO_4 à 1 mM et des inhibiteurs de protéases dans du PBS à pH 7,4). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20000 g pendant 30 min à 4°C. Les protéines des surnageants sont utilisées pour le Western blot. L'ajustement de la concentration en protéine est réalisé grâce à un dosage protéique.

2. Dosage des protéines selon la méthode BCA

Cette méthode de dosage des protéines (Pierce Chemical, Rockford, IL ; distribué par Interchim, Montluçon, France) utilise l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith et coll., 1985). Elle consiste en la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines. Le BCA chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité pour former un complexe soluble coloré en violet. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu^+ final à une longueur d'onde de 562 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique.

La concentration des protéines totales est obtenue en dosant les protéines totales d'échantillons récoltés lors des différentes fractions obtenues au cours de la purification. Les échantillons sont dilués dans le PBS. La concentration protéique est calculée à partir de la DO à 562 nm à partir d'une gamme de concentrations connues en sérum albumine bovine.

200 μl de réactif BCA sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits. 25 μl de chaque standard sont ajoutés au réactif BCA dans les puits. La plaque est incubée à 37°C. Après 30 min l'absorbance à 562 nm est mesurée pour la gamme et les échantillons.

3. La technique de Western blot

Les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100°C dans un tampon échantillon réducteur (Tris/HCl 0,25 M pH 6,8 ; bleu de bromophénol 0,1% p/v; SDS 2% p/v; saccharose

4% p/v; β -mercaptoéthanol 37,5% v/v). Ils sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10% en présence de 0,1% de SDS (SDS-PAGE). La migration s'effectue pendant une nuit à température ambiante sous une tension constante de 65 V. Les protéines ainsi séparées sont transférées pendant 1h30 à 4°C, sur une membrane de nitrocellulose (PROTRAN-Schleicher & Schuell, Dutcher, Brumath, France) par un système de transfert en milieu liquide (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau S 0,2% dilué dans de l'acide trichloracétique 3%. La membrane est saturée pendant une heure à température ambiante avec une solution à 5% de lait écrémé dans du TBS-T (Tris/HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM et 0,1% v/v Tween-20) puis elle est incubée pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires de lapin : anti-phospho-Thr308-Akt (1/400), anti-phospho-Ser473-Akt (1/400) ou anti-phospho-S136-Bad (1/500). Après 5 lavages de 5 min avec du TBS-T, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de Raifort (1/1000). La membrane est encore lavée 5 fois 5 min au TBS-T puis 2 fois 10 min au TBS. Les immunocomplexes sont détectés par chimiluminescence grâce au kit ECL (Perkin-Elmer Life Sciences, Villebon-sur-Yvette, France) et exposés à un film Kodak BioMax MR.

Pour vérifier l'égalité du dépôt protéique, la membrane est déshybridée dans un tampon adéquat (Tris/HCl 62,5 mM pH 6,7, β -mercaptoéthanol 10 mM, SDS 2% p/v) à 55°C pendant 30 min. Après 5 lavages de 1 h dans du TBS-T/azide 0,02% p/v, elle est saturée et incubée une nuit à 4°C avec un anticorps de souris anti- β -actine (1/5000) dilué dans la solution de blocage. Le lendemain, après 5 lavages de 5 min avec du TBS-T, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de Raifort (1/10000). Les immunocomplexes sont détectés par chimiluminescence grâce au kit ECL et exposés à un film Kodak BioMax MR.

4. Immunoprécipitation

Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS froid contenant 50 μ M de Na_3VO_4 , grattés puis centrifugés (400g, 10min, 4°C). Les culots cellulaires sont traités avec du tampon de lyse 1% (1% v/v Brij-98 (Sigma) ; 10 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 10% v/v glycérol ; 1 mM Na_3VO_4) et un cocktail d'inhibiteur de protéase pendant 15 min à 4°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (20000g, 20 min, 4°C). La

concentration protéique est déterminée selon la méthode BCA. Des quantités égales de protéines sont incubées avec une quantité appropriée d'anti-14-3-3 ζ pendant 1 h à 4°C. Les complexes antigène/anticorps sont précipités par incubation avec 40 μ l de protéine G-Sépharose pendant 1 h. Les complexes antigène/anticorps sont lavés avec du tampon de lyse 1%, puis 3 fois avec du tampon de lyse 0,1% (0.1% v/v Brij-98 ; 10 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 10% v/v glycérol; 1 mM Na₃VO₄). Les protéines immunoprécipitées sont solubilisées et chauffées pendant 5 min à 100°C dans du tampon de charge de Laemmli. Les billes sont éliminées par centrifugation (10000g, 1 min, 4°C). Les protéines immunoprécipitées sont séparées par SDS-PAGE en condition réductrice.

IX. Les méthodes de biologie moléculaire

1. Extraction des ARN totaux

Après traitement de 24 h à la kE (50 μ g/ml) les cellules sont centrifugées 10 min à 400g. Le milieu est éliminé et 1 ml de Trizol (Sigma Aldrich, St Quentin en Yvelines, France) est ajouté sur le culot cellulaire. Celui-ci est remis en suspension par des aller/retour à la pipette puis en vortexant le tube. Après une incubation de 5 min à température ambiante, 200 μ l de chloroforme/IAA (24:1 v/v) sont ajoutés. Chaque échantillon est agité vigoureusement deux fois puis incubé 3 min à température ambiante. Après une centrifugation de 15 min à 12 000 g à 4°C, la phase aqueuse est récupérée. Les étapes à partir de l'ajout de chloroforme sont effectuées une deuxième fois. 500 μ l d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse récupérée. Les échantillons sont agités doucement par inversion des tubes puis incubés 10 min à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et un culot blanc apparaît. Celui-ci est lavé avec 1 ml d'éthanol 75% et subit une centrifugation de 7500 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est séché à température ambiante. Une fois sec, le culot est remis en suspension dans 30 μ l d'eau bidistillée (RNase-free).

2. Vérification de l'intégrité des extraits d'ARN

Le dosage de la concentration d'ARN des échantillons est effectué par spectrophotométrie à 260 nm et est exprimé en µg/mL. La valeur est mesurée par la formule :

$$[ARN] = DO_{260} \times 40 \times \text{facteur de dilution}$$

Le rapport des densités optiques mesurées à 260 nm et 280 nm permet de détecter une éventuelle contamination en protéines des ARN. Si le rapport est supérieur à 1,8, on considère qu'il n'y a pas de contamination.

La migration des extraits d'ARN dans un gel d'agarose 1% (p/v) permet de vérifier la qualité des ARN et l'absence d'ADN génomique, en présence de bromure d'éthidium (BET). Celui-ci est un agent intercalant des acides nucléiques qui lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée. La présence d'ADN génomique est mise en évidence par la présence de bandes ayant peu migré dans le gel.

3. La RT-PCR

L'acronyme RT-PCR signifie *Reverse Transcriptase-PCR*, soit une PCR après transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Il s'agit donc d'une PCR classique réalisée sur un ADNc.

a. La RT

La RT a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est certainement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier), les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule. Dans ce but elle est souvent réalisée *in situ* c'est à dire sur du matériel biologique fixé.

L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation des ARN qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique. La RT est réalisée grâce au kit *Verso cDNA* (Thermoscientific, Courtaboeuf, France).

Pour cette manipulation, 1 µg d'ARN totaux par échantillon est utilisé. Pour un tube, la réaction de RT est effectuée en utilisant 4 µl de cDNA synthesis buffer 5X, 2 µl de dNTP 5 mM, 0,25 µl d'oligoDT, 0,75 µl d'hexamères, 1 µl de Verso[®] enzyme, 1 µl de RT Enhancer, QSP 20 µl d'eau.

Le RT Enhancer est inclus pour optimiser la réaction de RT et éliminer une contamination éventuelle en ADN génomique. La réaction est réalisée dans un appareil de type eppendorf Mastercycler[®]. Les échantillons sont incubés 30 min à 42°C, puis l'enzyme Verso[®] est inactivée par incubation à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont conservés à -20°C.

b. PCR de vérification de la RT

En 1983, Kary Mullis inventa un procédé qu'il appela PCR, permettant de résoudre un problème en génétique : copier et amplifier des brins d'ADN (Mullis et coll., 1986).

PCR est l'abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne par polymérase (le terme français équivalent, Amplification en Chaîne par Polymérisation ou ACP, est rarement utilisé).

La PCR utilise les molécules biologiques que la nature utilise pour copier de l'ADN : deux amorces qui balisent le début et la fin de la séquence d'ADN à copier ; une enzyme appelée polymérase qui parcourt la séquence d'ADN, lisant le code génétique et fabriquant une copie ; et les acides nucléiques nécessaires à la polymérase.

La réaction se fait en différentes étapes : 1) Dénaturation de l'ADN cible ; 2) Hybridation des amorces ; 3) Extension des amorces. Ces 3 étapes se font à des températures différentes. La PCR consiste à répéter ce cycle de 3 étapes thermiques dans un même tube afin d'obtenir un grand nombre de copies d'ADN.

Afin de vérifier que la RT a été capable de produire les ADNc, nous effectuons une PCR avec des amorces actine. La PCR est réalisée grâce au kit *Eurobluetaq ADN Polymerase* (Eurobio, Les Ulis, France).

Pour un tube, la PCR est effectuée en utilisant 2,5 µl de tampon 10X, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 1 µl d'amorces (sens et antisens 10 µM chacun), 0,1 µl

d'Eurobluetaq[®] et QSP 24,5 µl d'eau. 0,5 µl de produit de RT est ajouté et sert de matrice de départ.

La réaction, réalisée dans un appareil de type Eppendorf Mastercycler[®], est débutée par une activation de l'Eurobluetaq de 3 min à 94°C suivi de 30 cycles définis comme suit : 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation amorces), 1 min à 72°C (élongation). La réaction est terminée par une étape à 72°C de 10 min. Les produits de réaction sont observés en présence de BET sous UV après séparation sur un gel d'agarose à 1,8% (p/v).

4. La PCR quantitative

Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet de mesurer quantitativement l'expression des gènes. Pour appliquer la PCR à l'étude de l'expression des gènes, une étape supplémentaire, précédant l'étape d'amplification a été nécessaire : il s'agit de la RT qui a permis de convertir des ARNm en ADN complémentaires ou ADNc. La PCR se fait ensuite en présence d'un fluorophore et la cinétique d'accumulation de la fluorescence qui traduit la quantité initiale d'ARN messagers est mesurée. L'évolution de cette cinétique peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde (Figure 14).

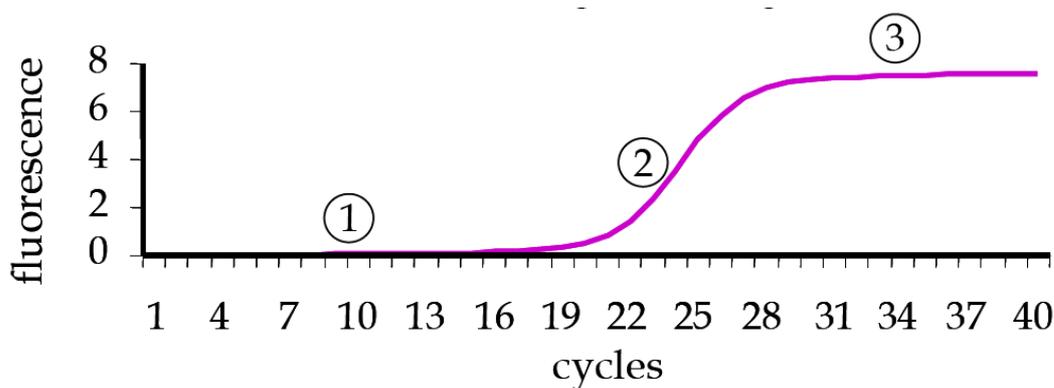


Figure 14 : Augmentation de la fluorescence au cours du temps

Cette courbe peut être divisée en 3 phases. Pendant la première phase la fluorescence ne se démarque pas du bruit de fond. Puis la visualisation de l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle (deuxième phase) avant de ralentir et atteindre un plateau (dernière phase). Pendant la phase exponentielle, la quantité de produit de PCR obtenue est directement proportionnelle au nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié.

Pendant la phase exponentielle, la quantité d'ADN (N) dépend de la concentration initiale en ADN (N_0) du nombre de cycle (C) et de l'efficacité (E).

$$N = N_0 \times E^C$$

La phase en plateau correspond à un ralentissement de l'amplification qui est dû le plus souvent à l'épuisement d'un des réactifs de la PCR comme les amorces. La PCR quantitative repose sur un nouveau principe de quantification : "on n'observe plus combien mais à quel moment". Ce moment correspond à un nombre de cycles appelé C_t (Cycle seuil ou Threshold Cycle). Le seuil, déterminé par l'utilisateur après analyse des profils de fluorescence, correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond.

Le C_t correspond au nombre de cycles pour lequel la barre seuil coupe la courbe d'amplification (Figure 15).

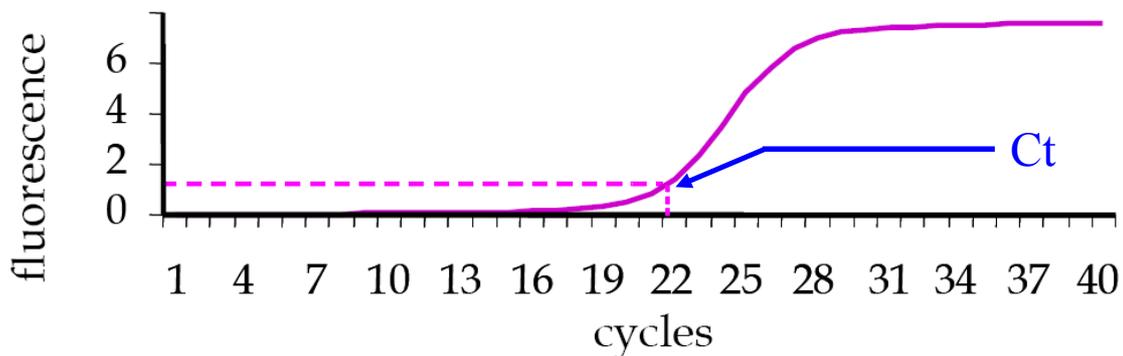


Figure 15 : Détermination du cycle seuil.

Plusieurs technologies permettent de mesurer la fluorescence. Nous avons utilisé la technique du SYBR Green.

La molécule SYBR Green n'émet un signal fluorescent que si elle se fixe dans le petit sillon de l'ADN double brin. Ainsi, lors d'une PCR en présence de SYBR Green, l'augmentation de la fluorescence va refléter l'augmentation de la quantité d'ADN double brin va générer un signal fluorescent. Grâce à un système d'enregistrement de la fluorescence, la progression de l'amplification peut être suivie à chaque cycle et en temps réel. Une limitation de ce système de détection est due au fait que la fluorescence mesurée soit non spécifique. Chaque molécule d'ADN double brin présente dans une PCR est quantifiée, y

compris donc les produits PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorce. Une analyse des courbes de dissociation est donc nécessaire pour s'assurer que la fluorescence mesurée correspond bien au produit d'amplification attendu.

Les produits sont détectés grâce à un appareil de type Chromo4™ Real-time PCR Detector (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Le kit utilisé est le Absolute SYBR Green Rox Mix (Thermoscientific, Courtaboeuf, France). La réaction débute par l'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 min suivi de 40 cycles définis comme suit: 10 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. L'acquisition et le traitement des données se faisant grâce au logiciel Opticon Monitor v3.1.32.

Pour cette PCR quantitative, nous avons utilisé des amorces spécifiques des gènes d'intérêt (Tableau 2).

Transcrit	Séquences des amorces	Taille (pb)	Tm (°C)
Actine	Sens : 5'-GTGTGACGTGGACATCCGC-3' Antisens : 5'-CTGCATCCTGTCGGCAATG-3'	91	60
EBP	Sens : 5'-TCCAGACATTACCTGGCAGCT-3' Antisens : 5'-ATGTTGCTGCCTGCACTGTT-3'	110	
β -Gal	Sens : 5'-GCTGGTTATCCTGAGGCC-3' Antisens : 5'-CGGAGGAGCGGAGAAGAATA-3'	104	
PPCA	Sens : 5'-AATCTCTATGCCCGTGTGCT-3' Antisens : 5'-TGGCAGGCGAGTGAAGATG-3'	102	
Neu-1	Sens : 5'-AATGCCCGAAACCAGAACAAC-3' Antisens : 5'-CGCCATGAGGTACCATTGCT-3'	239	

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative

X. Analyse statistique des résultats

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et en triplicate. Les résultats sont exprimés en tant que la moyenne affectée de l'erreur standard à la moyenne (SEM). La comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test *t* de Student pour des échantillons non appariés. Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs à $p < 0,05$.

Résultats

1^{ère} partie :

*Rôle des peptides d'élastine dans la
survie cellulaire*

Rôle des peptides d'élastine dans la survie cellulaire

Au cours du vieillissement, les cellules normales telles que les FDH subissent une accumulation de stress du à l'environnement, la nutrition ou des modifications génétiques (Bree et coll., 2002). Elles accumulent ainsi des structures endommagées qui, suivant la gravité de la lésion, sont soit éliminées par autophagie ou déclenchent un phénomène apoptotique (Terman et coll., 2007). C'est pourquoi les cellules saines ont une durée de vie limitée et meurent naturellement par apoptose ou entrent dans un état d'arrêt du cycle cellulaire appelé sénescence répllicative.

Les céramides sont des molécules endogènes produites naturellement par l'organisme. Physiologiquement, les céramides ont des effets contradictoires suivant leur concentration. A faible concentration, ces composés provoquent la division cellulaire mais, à forte concentration, ils induisent l'apoptose (Cutler et Mattson, 2001). De nombreuses études ont souligné que les céramides s'accumulent dans les tissus au cours du vieillissement en provoquant l'apoptose cellulaire (Lightle et coll., 2000).

Un céramide se caractérise par son incapacité à se transférer spontanément entre les bicouches lipidiques. La demi-vie d'échange des céramides dans la bicouche lipidique se compte en jours (Simon et coll., 1999). Ainsi, même si les céramides sont produits localement à des concentrations élevées dans les membranes biologiques, des échanges spontanés entre couches ne peuvent pas jouer un rôle dans la médiation de ses effets biologiques. Cette propriété a au moins trois conséquences pour la compréhension du mode de fonctionnement des céramides dans les voies de signalisation.

Tout d'abord, les molécules de signalisation en aval des céramides doivent être transportées à la membrane, plutôt que ce soit les céramides qui quittent la membrane pour être transportés au cytosol. Les céramides vont ainsi interagir avec un certain nombre de protéines cibles, telles que la kinase suppresseur de Ras, la protéine kinase c-Raf et la protéine kinase C (van Blitterswijk, 1998). Deuxièmement, les céramides doivent interagir avec les molécules cibles à l'intérieur de la bicouche. Cela pourrait se produire par la protrusion de la chaîne alkyle des céramides de la double couche lipidique (Kronke, 1999). Mais il n'existe

pas de preuves expérimentales à l'appui de ce modèle pour les longues chaînes acyles saturés trouvées dans les céramides. Il convient de souligner que les difficultés rencontrées par les céramides dans la médiation des signaux cellulaires sont similaires à celles rencontrées par le diacylglycérol, un cousin de structure des céramides, qui ne subit pas d'échanges entre couches. Ainsi, le diacylglycérol active la protéine kinase C seulement après que cette dernière ait été transportée à la membrane (Goni et Alonso, 1999). Troisièmement, les différentes sous-unités des cibles en amont pourraient interagir avec les céramides, en fonction de la membrane intracellulaire dans laquelle ils sont produits. Il a d'abord été supposé que les céramides sont produits exclusivement à la membrane plasmique par hydrolyse de la sphingomyéline par des sphingomyelinases. Toutefois, il est de plus en plus évident que les céramides peuvent être générés par le réticulum endoplasmique (Bose et coll., 1995) et, éventuellement, la mitochondrie (El Bawab et coll., 2000), les lysosomes ou endosomes (Heinrich et coll., 1999) et dans la membrane nucléaire (Tsugane et coll., 1999), soit par des voies de synthèse ou de dégradation.

En plus de leurs propriétés biophysiques, les céramides naturels sont insolubles en milieu aqueux. Ils sont donc difficiles à introduire dans la bicouche lipidique. Les céramides à chaînes courtes, particulièrement la N-acétyl-D-sphingosine (C_2 -céramide) (Figure 16), sont des analogues synthétiques solubilisés par l'action du DMSO et perméables aux membranes. Ils provoquent l'apoptose cellulaire de la même manière que les céramides endogènes. Dans notre cas, les C_2 -céramides seront utilisés à une concentration de 20 μ M, celle-ci ayant été déterminée à partir de données bibliographiques et d'expériences préliminaires de mort cellulaire réalisées au laboratoire.

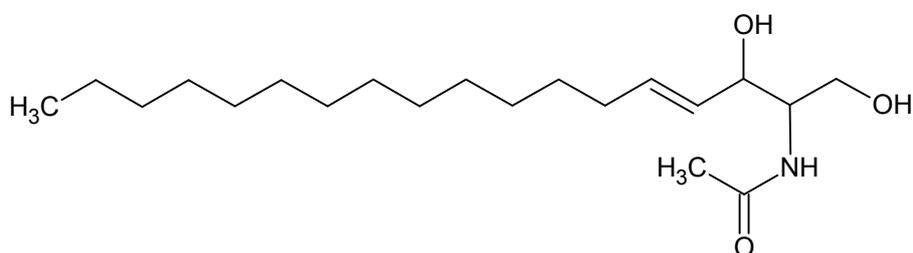


Figure 16 : Schéma de la N-acétyl-D-sphingosine ou C_2 -céramide.

L'utilisation de céramides à courte chaîne acyle (C_2 -céramide) a été beaucoup discutée bien qu'ils se soient révélés extrêmement utiles dans l'étude de nombreux aspects des voies de signalisation dans lesquels ils sont impliqués. Remarquablement, ces C_2 -céramides existent

naturellement dans la nature, notamment chez les mammifères, suggérant qu'ils pourraient être plus qu'un simple outil de laboratoire (Lee et coll., 1996; Karasawa et coll., 1999).

I. Effet des PE sur la survie cellulaire

Afin de caractériser la mort cellulaire provoquée par les C₂-céramides, nous avons effectué un marquage des noyaux cellulaires. Le bisbenzimidazole ou Hoechst 33342 est un fluorochrome qui pénètre facilement les membranes cellulaires. Il va se fixer sur l'ADN pour marquer les noyaux cellulaires par émission de fluorescence bleue. Il permet de mettre en évidence les fragmentations nucléaires et les condensations chromatiniennes spécifiques de l'apoptose. L'iodure de propidium va, pour sa part, permettre d'observer les cellules en nécrose. Il pénètre facilement aux travers des cellules dont les membranes sont lésées tout en étant exclu des cellules saines. Il apparaît une fluorescence rouge des noyaux suite à sa fixation sur l'ADN.

Après une mise au repos de 24 h, les fibroblastes sont incubés en présence ou en absence de PE (50 µg/ml) et de C₂-céramides (20 µM) durant 20 h. Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au Hoechst 33342 et à l'iodure de propidium (Figure 17).

Les cellules qui n'ont reçu aucun traitement aux C₂-céramides présentent un aspect et une taille normale (Figure 17A et B). Après 20 h, il apparaît que le traitement aux C₂-céramides provoque une condensation et une fragmentation de la chromatine caractéristiques de l'apoptose (Figure 17C).

En présence de PE et de C₂-céramides, nous observons une forte diminution du nombre de cellules en apoptose (Figure 17D). Le marquage à l'iodure de propidium ne permet, quant à lui, de ne marquer qu'un nombre plus restreint de cellules, confirmant le rôle des C₂-céramides dans l'induction de l'apoptose et non de la nécrose.

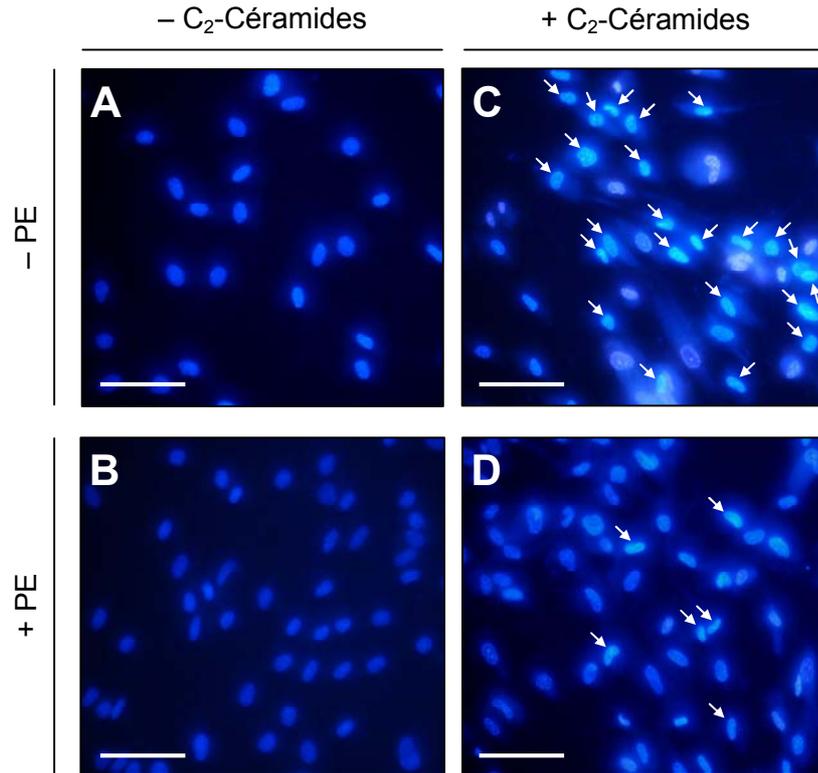


Figure 17 : Influence des PE sur la survie cellulaire par double marquage nucléaire au Hoechst et à l'iodure de propidium.

Les fibroblastes sont incubés pendant 20 h en présence ou en absence de PE (50 $\mu\text{g/ml}$) et de C_2 -céramides (20 μM). Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au Hoechst et à l'iodure de propidium puis observés en microscopie à fluorescence (grandissement $\times 40$). La barre blanche représente 100 μm .

Afin d'avoir de plus amples informations sur l'effet des PE sur l'apoptose induite par les C_2 -céramides, ce phénomène a été analysé de manière qualitative par cytométrie de flux (Figure 18). En absence de traitement (Figure 18A), le taux de survie est estimé à 87%. En accord avec la littérature, ce taux chute à 5% quand les cellules sont traitées avec des C_2 -céramides pendant 20 h (Figure 18B). L'effet pro-apoptotique des C_2 -céramides est fortement atténué (28%) quand les PE sont présents dans le milieu au cours du traitement (Figure 18D).

Il est à noter que, tout en favorisant la survie des cellules (Figure 18D, quadrant 3 comparativement à Figure 18B, quadrant 3), les PE semblent également accélérer l'apoptose induite par les C_2 -céramides, comme en témoigne l'apparition de cellules en apoptose tardive (Figure 18B et D, quadrant 2). Ce phénomène est inexplicable.

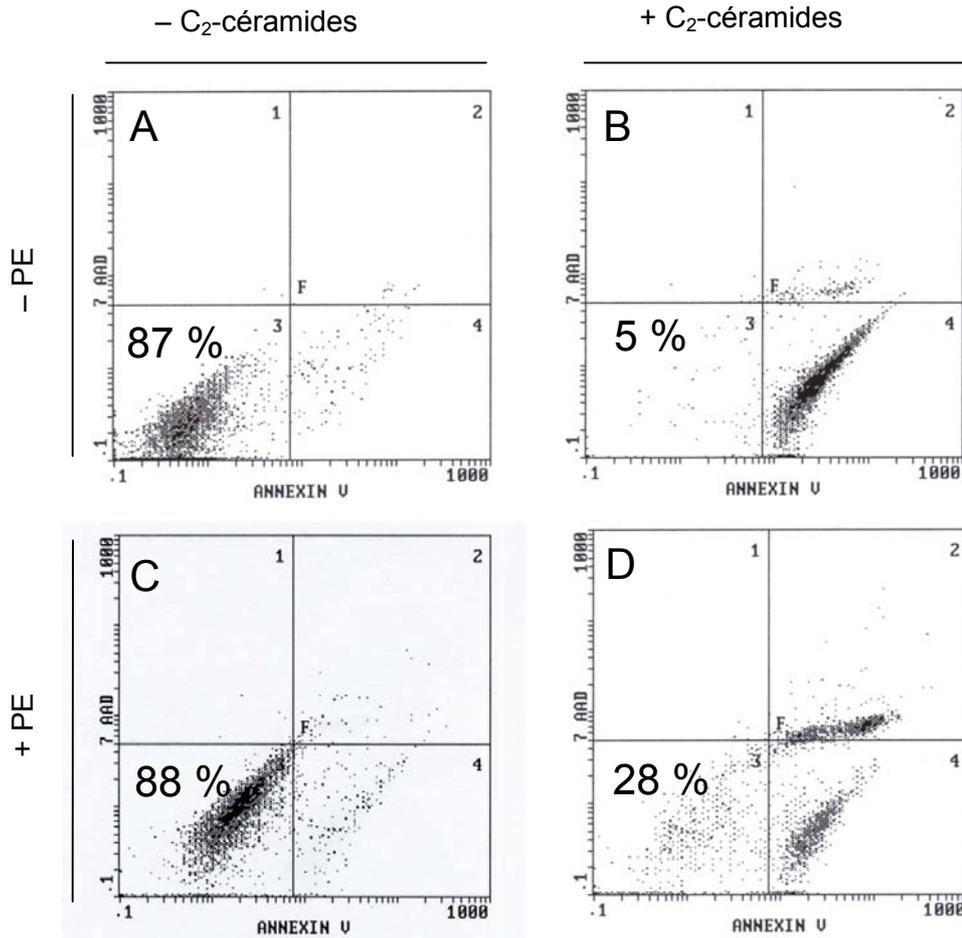


Figure 18 : Influence des PE sur la survie cellulaire

Les fibroblastes sont incubés avec de l'annexine V-FITC et du 7AAD puis analysés par cytométrie en flux : sans traitement (A), après incubation avec des C₂-céramides (B), des PE (C) et des PE/C₂-céramides (D) pendant 20 h. La survie cellulaire est estimée comme un pourcentage déterminé par le quadrant 3. Les cellules en phases apoptotiques précoce et tardive correspondent au quadrant 4 et 2 respectivement.

Ces expériences montrent que les PE réduisent l'apoptose induite par les C₂-céramides. Les PE pourraient donc avoir un effet protecteur et contribuer à la survie cellulaire de cellules destinées à mourir.

II. Rôle du complexe récepteur de l'élastine

Les PE sont des produits de dégradation de l'élastine. Ils sont formés de nombreux oligopeptides de 70 kDa de masse moyenne. Certaines séquences se trouvant dans ces oligopeptides sont reconnues par un récepteur membranaire appelé le complexe récepteur de

l'élastine (CRE). Au sein de ce complexe, c'est l'*Elastin Binding Protein* (EBP) qui interagit avec les peptides d'élastine. L'action des PE sur l'EBP va générer de nombreux signaux. Le lactose (1 mM) permet de bloquer la signalisation induite par le complexe récepteur de l'élastine en se fixant sur le site galactoelectine de l'EBP. Cela entraîne une dissociation de l'EBP du complexe et l'impossibilité de générer un signal.

Nous avons montré précédemment que les PE ont un effet sur la survie cellulaire. Afin de montrer l'importance du CRE dans le phénomène de survie, les cellules sont traitées avec des C₂-céramides, des PE et/ou du lactose (Figure 19). Conformément aux expériences précédentes, il y a apparition de nombreux corps apoptotiques en présence de C₂-céramides (Figure 19A) et réduction de l'effet par les PE (Figure 19D). En présence de 1 mM de lactose, les cellules traitées aux C₂-céramides (Figure 19B) et aux C₂-céramides/PE (Figure 19E) présentent une proportion apparente similaire de corps apoptotiques. Le lactose semble donc empêcher le rôle protecteur des PE.

Les études en cytométrie de flux montrent que le taux de survie en absence de C₂-céramides (Figure 20A) n'est pas affecté par la présence de lactose (Figure 20D). Le taux de survie après traitement aux céramides est de 5% sans adjonction de lactose (Figure 20B) et de 17% chez les cellules traitées (Figure 20E). Dans les cellules traitées à la fois par les C₂-céramides et les PE, le taux de survie reste à un taux comparable (15%) (Figure 20F). Ces données montrent que l'effet protecteur des PE sur l'apoptose induite par les C₂-céramides est réduit en présence de lactose (28% sans lactose, Figure 20C ; 15% avec lactose, Figure 20F). L'effet inhibiteur du lactose sur l'effet protecteur des PE suggère que le CRE est impliqué dans le phénomène. La galectine-3 peut être exclue car il a été montré récemment que le CRE est le récepteur conduisant les effets des PE chez les FDH (Duca et coll., 2007).

On remarque que l'apoptose tardive des cellules est plus importante en présence de lactose (Figure 20E, quadrant 2) qu'en absence (Figure 20B, quadrant 2). Ce phénomène persiste quand on ajoute des PE (Figure 20F, quadrant 2). Un phénomène similaire est également observé sur les cellules sans traitement aux céramides. Le lactose seul n'a pas d'effet sur la survie des cellules mais on peut toutefois remarquer que, quand il est présent, les cellules non viables sont plutôt en apoptose tardive (quadrant 2) alors que, quand il est absent, elles sont surtout en apoptose (quadrant 4). Il pourrait donc s'agir d'une réaction cellulaire à une modification de leur environnement immédiat. Cette réaction serait amplifiée par les céramides.

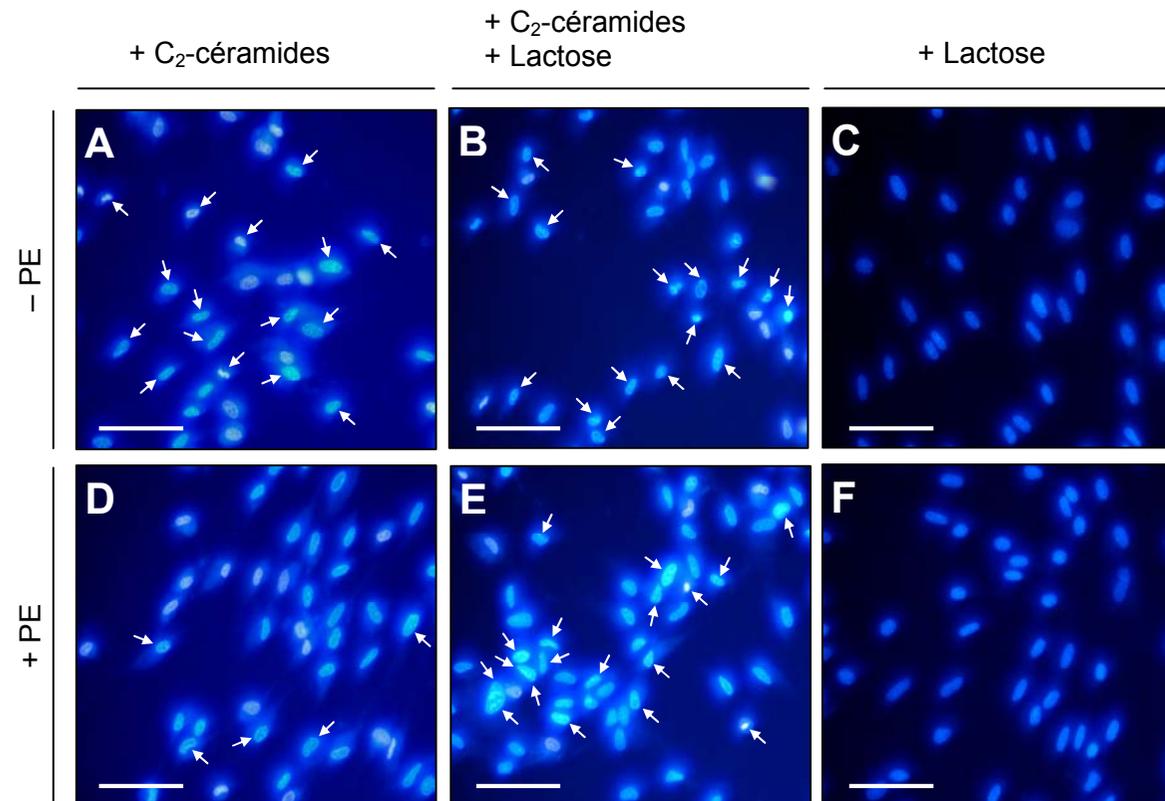


Figure 19 : Effet du lactose sur la survie cellulaire induite par les PE.

Les fibroblastes sont incubés pendant 20 h : en présence C_2 -céramides ($20 \mu\text{M}$) (A) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu\text{M}$) avec du lactose (1mM) (B) ; en présence de lactose (1mM) (C) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu\text{M}$) avec des PE ($50 \mu\text{g/ml}$) (D) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu\text{M}$) avec des PE ($50 \mu\text{g/ml}$) et du lactose (1mM) (E) ; en présence de lactose (1mM) avec des PE ($50 \mu\text{g/ml}$) (F). Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au Hoechst et à l'iodure de propidium puis observés en microscopie à fluorescence (grandissement $\times 40$). La barre blanche représente $100 \mu\text{m}$.

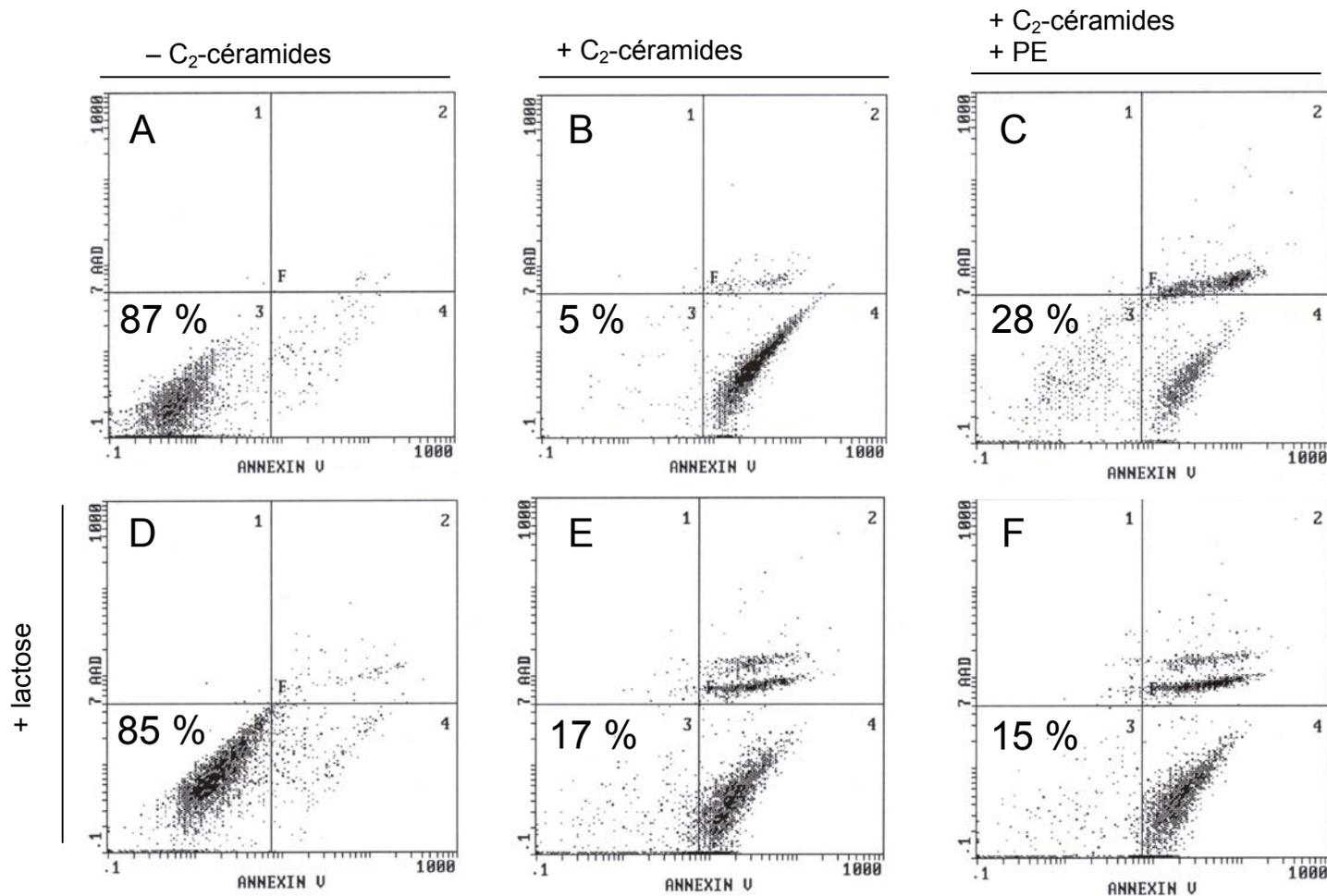


Figure 20 : Effet du lactose sur la survie cellulaire induite par les PE mesurée par cytométrie en flux.

Les conditions testées sont : sans traitement (A), traitement aux C₂-céramides (20 μ M) pendant 20 h en absence (B) ou en présence de 50 μ g de PE /ml (C), en présence de lactose (1mM) seul (D) ou avec traitement conjoint aux C₂-céramides (20 μ M) pendant 20 h, en absence (E) ou en présence de PE (50 μ g/ml) (F). Les fibroblastes sont ensuite incubés avec de l'annexine V-FITC et du 7AAD puis analysés par cytométrie en flux. La survie cellulaire est estimée en pourcentage à partir du quadrant 3. Les cellules en phases apoptotiques précoce et tardive correspondent aux quadrants 4 et 2 respectivement.

III. Implication de la voie ERK

La signalisation passant par les protéines Raf-MEK-ERK est l'une des principales voies de survie cellulaire. Celle-ci est activée par les PE dans les FDH (Brassart et coll., 2001). Nous avons donc naturellement étudié le rôle de cette voie dans la survie cellulaire après stimulation avec des PE. Pour cela, nous utiliserons un inhibiteur hautement spécifique des protéines MEK1/2 appelé U0126 et permettant ainsi de bloquer l'activation de la voie ERK1/2 (Favata et coll., 1998).

Après une mise au repos de 24 h, les fibroblastes sont pré-incubés 1 h avec le U0126 à 10 μ M. Ils sont ensuite stimulés avec des C₂-céramides (20 μ M) et des PE (50 μ g/ml) dans du milieu de culture contenant l'inhibiteur (Figure 21).

En présence ou en absence de U0126, les céramides provoquent l'apparition de nombreux corps apoptotiques (Figure 21A et B). L'effet protecteur des PE est visiblement conservé qu'il y ait (Figure 21E) ou pas de U0126 (Figure 21D).

L'addition de U0126 n'a pas d'effet notable sur les cellules en absence (77 % ; Figure 22D comparée à 87 % ; Figure 22A) ou en présence de C₂-céramides (10 % ; Figure 22E comparée à 5 % ; Figure 22B). De même, le taux de survie des cellules en présence de PE (Figure 22F) n'est pas très différent de celui observé chez les cellules sans traitement au U0126 (Figure 22C) (respectivement 38% et 29%).

La voie Raf-MEK-ERK ne semble donc pas intervenir dans la survie cellulaire induite par les PE. Pour expliquer l'effet des PE, il faut donc se tourner vers une autre voie de survie cellulaire utilisée par les fibroblastes.

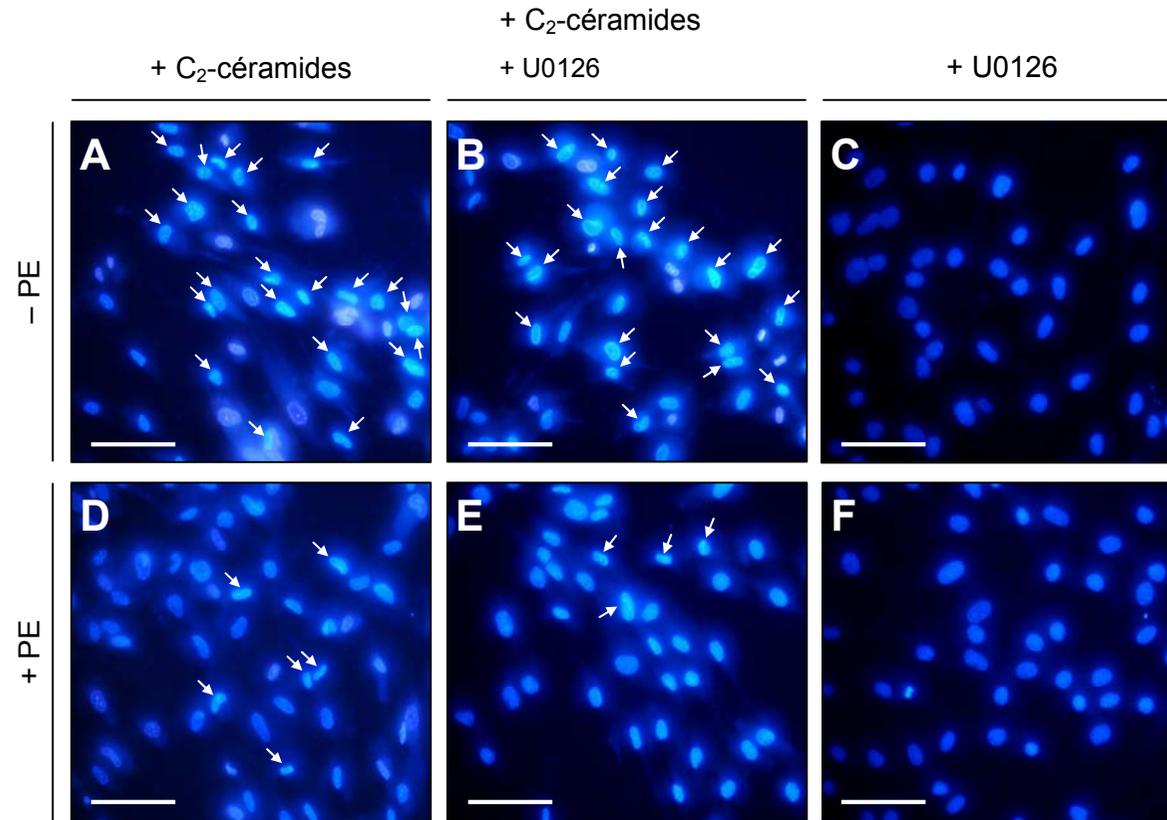


Figure 21 : Effet du U0126 sur la survie cellulaire induite par les PE.

Les fibroblastes sont incubés pendant 20 h : en présence C_2 -céramides ($20 \mu M$) (A) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu M$) avec du U0126 ($10 \mu M$) (B) ; en présence de lactose ($1mM$) (C) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu M$) avec des PE ($50 \mu g/ml$) (D) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu M$) avec des PE ($50 \mu g/ml$) et du U0126 ($10 \mu M$) (E) ; en présence de U0126 ($10 \mu M$) avec des PE ($50 \mu g/ml$) (F). Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au Hoechst et à l'iodure de propidium puis observés en microscopie à fluorescence (grandissement $\times 40$). La barre blanche représente $100 \mu m$.

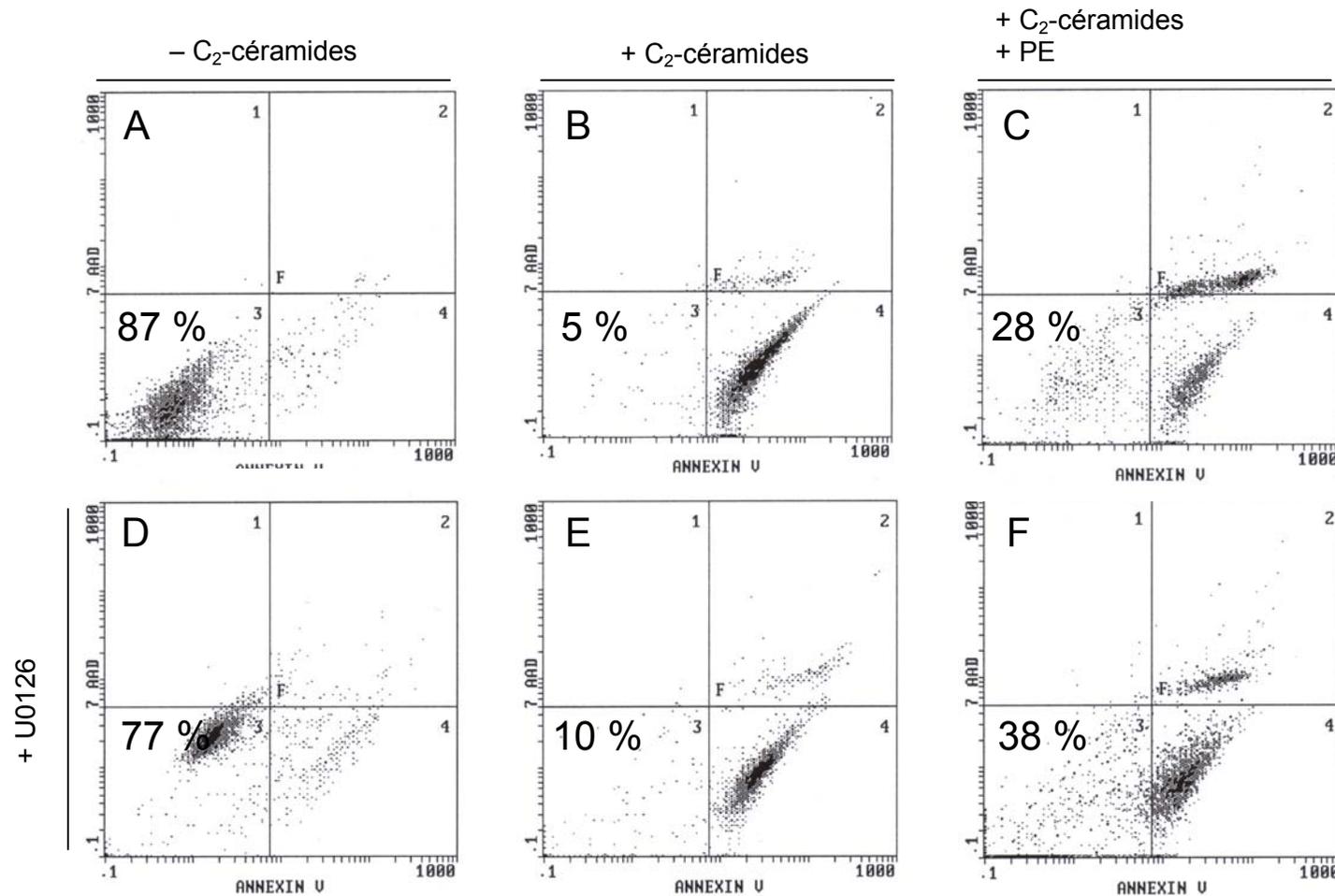


Figure 22 : Effet du U0126 sur la survie cellulaire induite par les PE mesurée par cytométrie en flux.

Les conditions testées sont : sans traitement (A), traitement aux C₂-céramides (20 μ M) pendant 20 h en absence (B) ou en présence de 50 μ g de PE /ml (C), en présence de U0126 (10 μ M) seul (D) ou avec traitement conjoint aux C₂-céramides (20 μ M) pendant 20 h, en absence (E) ou en présence de PE (50 μ g/ml) (F). Les fibroblastes sont ensuite incubés avec de l'annexine V-FITC et du 7AAD puis analysés par cytométrie en flux. La survie cellulaire est estimée en pourcentage à partir du quadrant 3. Les cellules en phases apoptotiques précoce et tardive correspondent aux quadrants 4 et 2 respectivement.

IV. Implication de la voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est une importante voie de survie. Pour vérifier si cette voie est celle utilisée par les PE pour induire la survie cellulaire, nous utiliserons un de ses inhibiteurs appelé LY294002 ou 2-(4-morpholinyl)-8-phényl-4H-1-benzopyran-4-one. Celui-ci agit en se liant de manière compétitive au site de liaison de l'ATP sur la sous-unité p110 des PI3K de classes I_A, I_B, et II (Vlahos et coll., 1994).

Après une mise au repos de 24 h, les fibroblastes sont pré-incubés 1 h avec le LY294002 à 25 µM. Ils sont ensuite stimulés pendant 20 h avec des C₂-céramides (20 µM) et des PE (50 µg/ml) dans du milieu de culture contenant l'inhibiteur (Figure 23).

Contrairement à ce qui avait pu être observé pour le U0126, nous pouvons observer une forte proportion de corps apoptotiques (Figure 23E) en présence de LY294002 et de PE. Les mêmes observations peuvent être effectuées en absence de PE (Figure 23B). Ce résultat suggère donc que l'inhibiteur de PI3K aurait le pouvoir de bloquer les effets anti-apoptotiques des peptides d'élastine. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse par cytométrie.

En absence de céramides, le LY294002 n'a pas d'effet sur la survie des cellules (Figure 24D comparée à Figure 24A). En présence de céramides, l'inhibiteur semble, par contre, avoir un léger effet sur la survie des cellules (Figure 24E comparée à Figure 24B). Enfin, l'effet protecteur des peptides d'élastine vis-à-vis de l'apoptose induite par les céramides semble réduit en présence de LY294002. Le taux de survie des cellules traitées passe de 28% en absence d'inhibiteur (Figure 24C) à 10% en sa présence (Figure 24F). Ces résultats suggèrent donc que le LY294002 bloque l'effet des PE sur la survie cellulaire. Une PI3K semble donc impliquée dans la survie cellulaire induite par les PE.

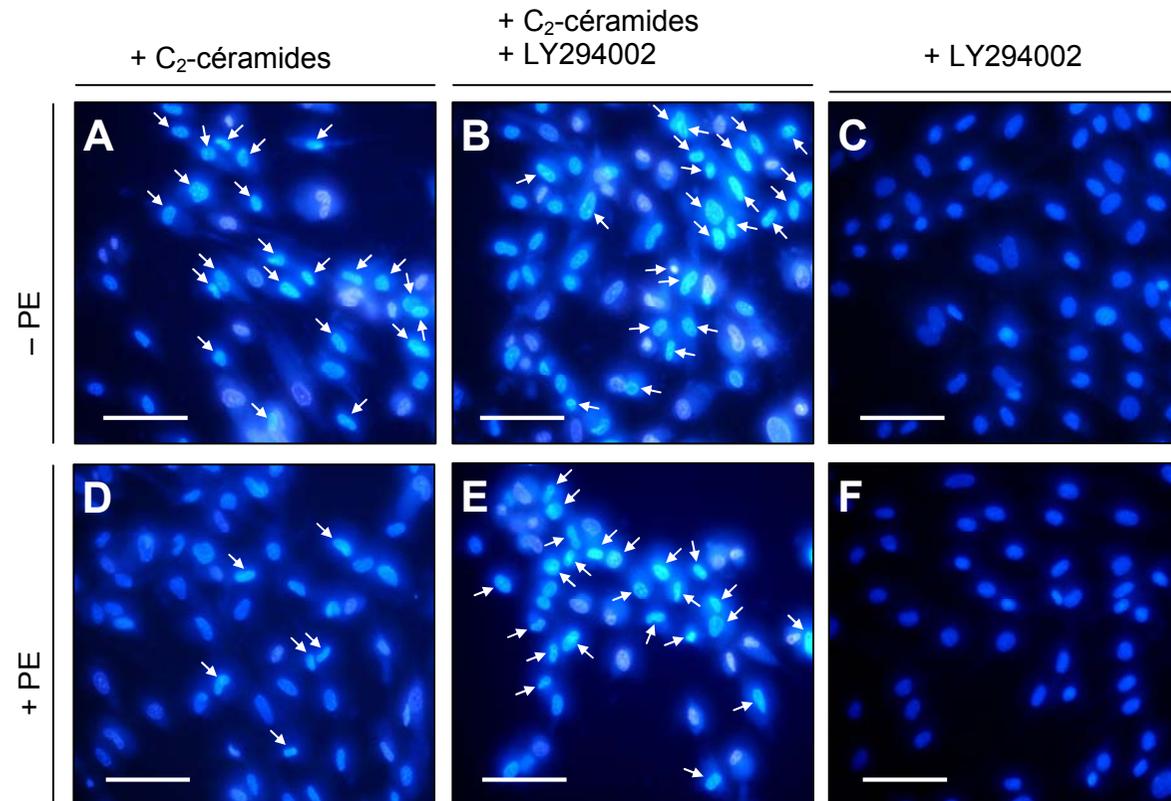


Figure 23 : Effet du LY294002 sur la survie cellulaire induite par les PE.

Les fibroblastes sont incubés pendant 20 h : en présence C_2 -céramides ($20 \mu M$) (A) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu M$) avec du LY294002 ($25 \mu M$) (B) ; en présence de lactose ($1mM$) (C) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu M$) avec des PE ($50 \mu g/ml$) (D) ; en présence de C_2 -céramides ($20 \mu M$) avec des PE ($50 \mu g/ml$) et du LY294002 ($25 \mu M$) (E) ; en présence de LY294002 ($25 \mu M$) avec des PE ($50 \mu g/ml$) (F). Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au Hoechst et à l'iodure de propidium puis observés en microscopie à fluorescence (grandissement $\times 40$). La barre blanche représente $100 \mu m$.

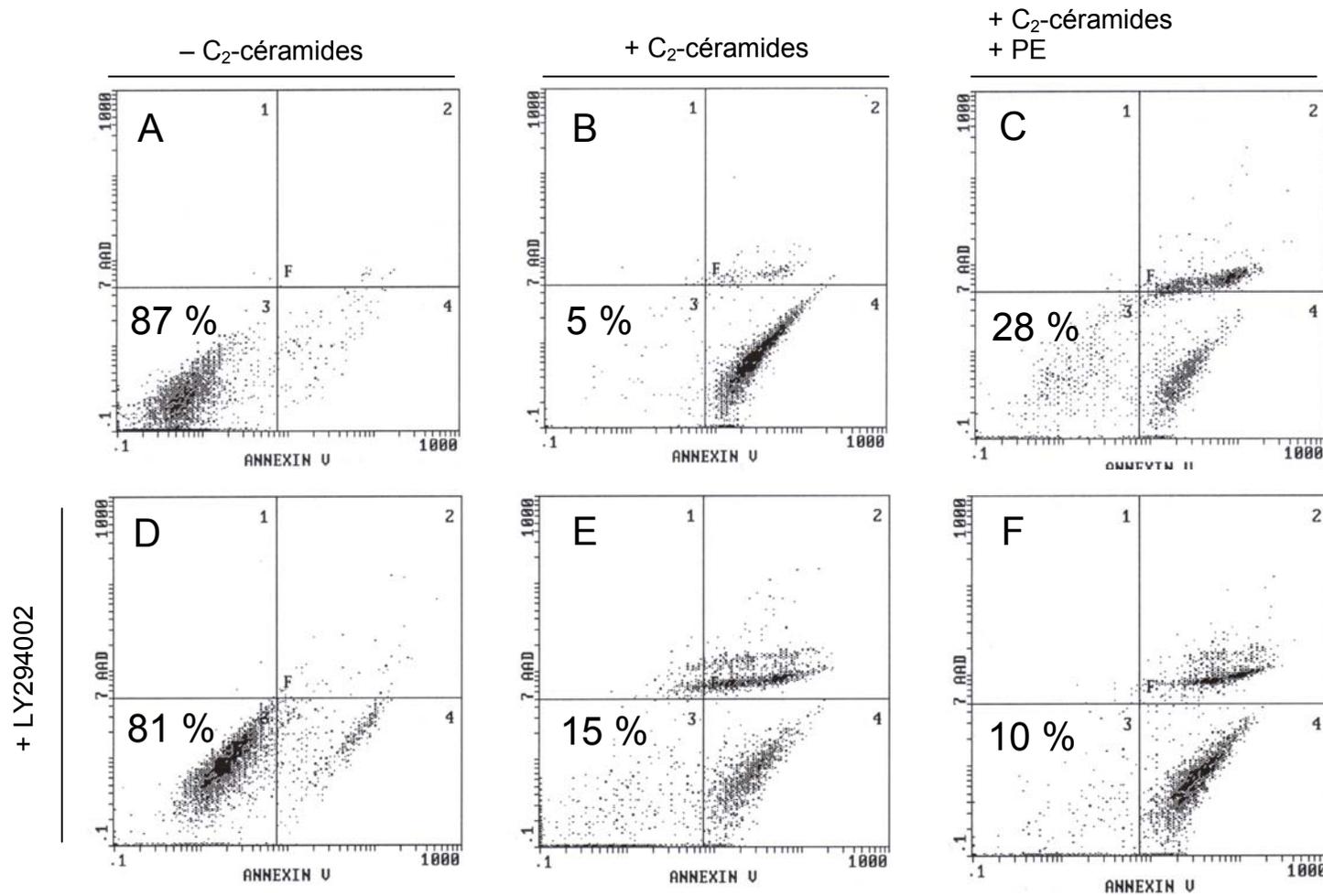


Figure 24 : Effet du LY294002 sur la survie cellulaire induite par les PE mesurée par cytométrie en flux.

Les conditions testées sont : sans traitement (A), traitement aux C₂-céramides (20 μ M) pendant 20 h en absence (B) ou en présence de 50 μ g de PE /ml (C), en présence de LY294002 (25 μ M) seul (D) ou avec traitement conjoint aux C₂-céramides (20 μ M) pendant 20 h, en absence (E) ou en présence de PE (50 μ g/ml) (F). Les fibroblastes sont ensuite incubés avec de l'annexine V-FITC et du 7AAD puis analysés par cytométrie en flux. La survie cellulaire est estimée en pourcentage à partir du quadrant 3. Les cellules en phases apoptotiques précoce et tardive correspondent aux quadrants 4 et 2 respectivement.

V. Influence des PE sur la phosphorylation d'Akt

L'activation de cette PI3K peut permettre le recrutement de la protéine Akt. La voie PI3K/Akt étant une voie majeure de survie dans de nombreux types cellulaires, nous avons alors choisi de l'étudier.

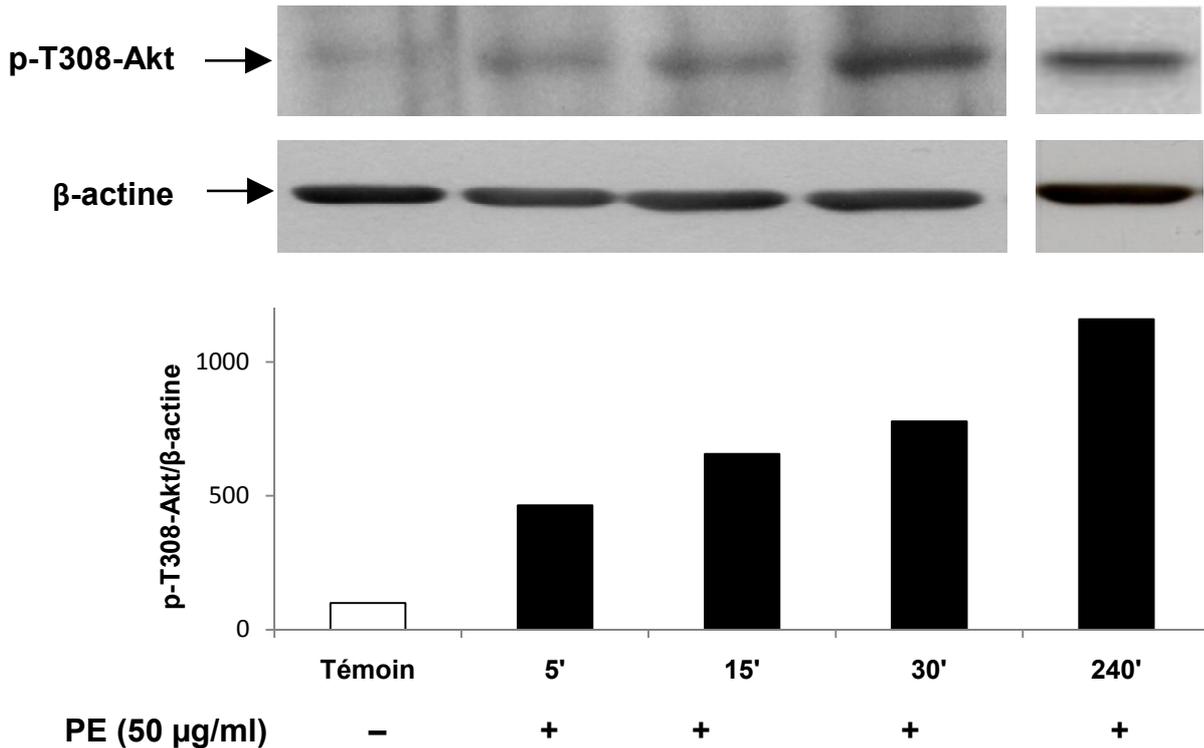


Figure 25 : Cinétique de phosphorylation d'Akt sur T308.

Les fibroblastes sont incubés avec des PE (50 µg/ml) suivant une cinétique allant de 0 à 240 min. Ensuite, les fibroblastes sont lysés et les protéines extraites. Le degré de phosphorylation d'Akt sur T308 est déterminé par Western blot. L'égalité du dépôt protéique est vérifiée par réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre une protéine constitutive, la β-actine.

La stimulation des FDH par les PE conduit à une activation par phosphorylation d'Akt sur T308 (Figure 25) ainsi que sur S473 (Figure 26). Ces résultats montrent que les PE sont capables d'induire une activation complète d'Akt, car elle conduit à la phosphorylation à la fois sur T308 et S473 au bout de 30 min. En outre, le phénomène persiste dans le temps puisqu'après 4 h, la phosphorylation est toujours apparente.

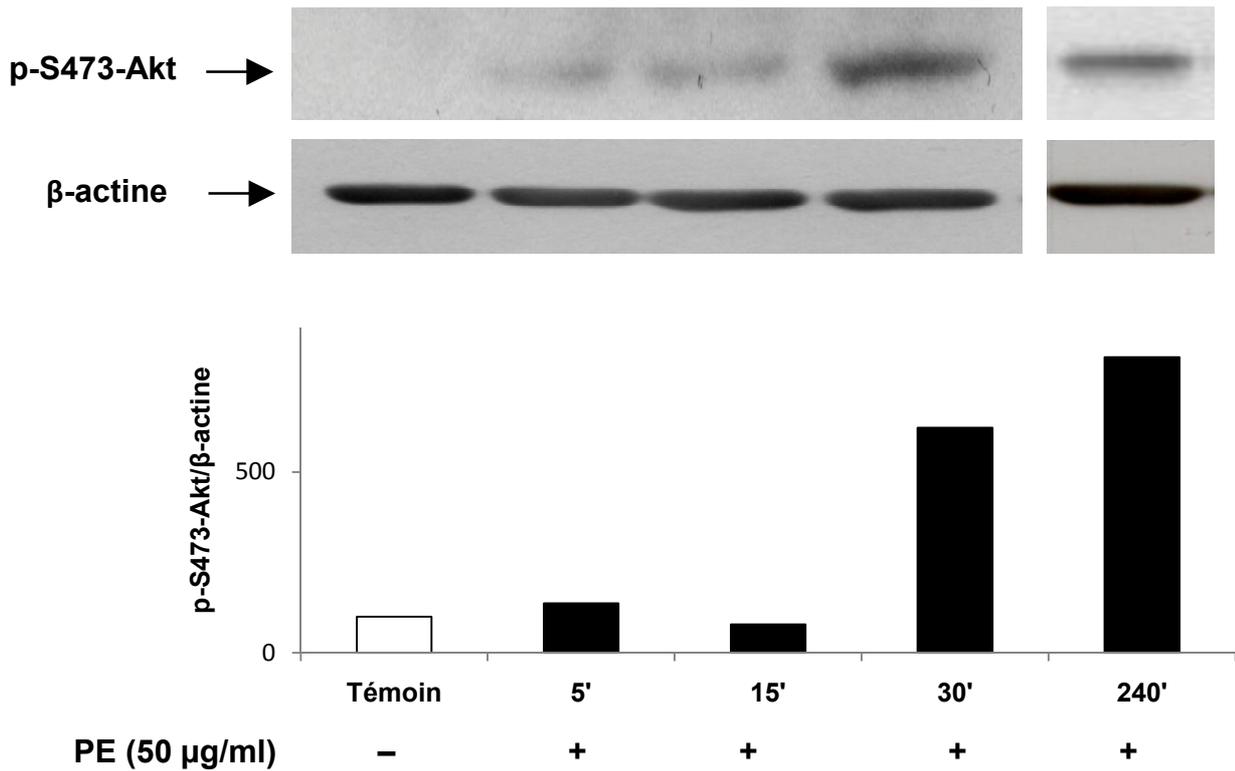


Figure 26 : Cinétique de phosphorylation d'Akt sur S473.

Les fibroblastes sont incubés avec des PE (50 μg/ml) suivant une cinétique allant de 0 à 240 min. Ensuite, les fibroblastes sont lysés et les protéines extraites. Le degré de phosphorylation d'Akt sur S473 est déterminé par Western blot. L'égalité du dépôt protéique est vérifiée par réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la β-actine.

VI. L'inhibition de la PI3K bloque l'activation d'Akt

Nous avons suggéré, par des études en cytométrie de flux, que la PI3K était impliquée dans la survie cellulaire induite par les PE. Par conséquent, nous avons voulu vérifier que la PI3K active Akt dans notre système. Nous avons donc utilisé le LY294002 pour inhiber la PI3K.

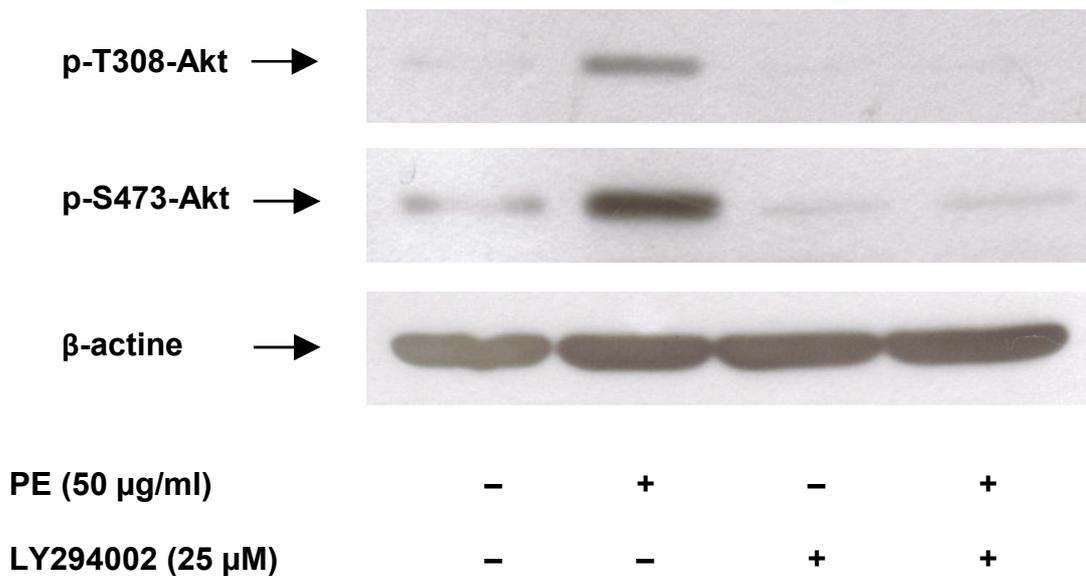


Figure 27 : Effet de l'inhibition de la PI3K sur la phosphorylation d'Akt.

Les fibroblastes sont incubés en absence ou en présence de PE (50 µg/ml) et/ou de LY294002 (25 µM) pendant 30 min. Le LY294002 est pré-incubé une heure. Ensuite, les fibroblastes sont lysés et les protéines extraites. Le degré de phosphorylation d'Akt sur T308 et S473 est déterminé par Western blot. L'égalité du dépôt protéique est vérifiée par réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la β-actine.

Les PE permettent l'activation complète d'Akt par phosphorylation sur T308 et S473 comme il a été montré précédemment. Comme le montre la Figure 27, cette phosphorylation est totalement inhibée au cours d'un traitement aux PE en présence de LY294002. La PI3K active donc Akt par phosphorylation sur T308 et S473.

VII. Influence des PE sur la phosphorylation de Bad

Nous nous sommes ensuite intéressés à un membre de la famille des protéines Bcl-2 appelé Bad. Sous sa forme déphosphorylée, Bad inactive les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 et Bcl-XL au niveau de la membrane mitochondriale. Cela déclenche le programme de mort cellulaire qui implique l'ouverture des pores de la mitochondrie, une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. Akt phosphoryle Bad sur S136, ce qui permet la fixation de Bad sur les protéines 14-3-3 ζ . Bad sera alors retenu dans le cytoplasme et perd ainsi son potentiel pro-apoptotique.

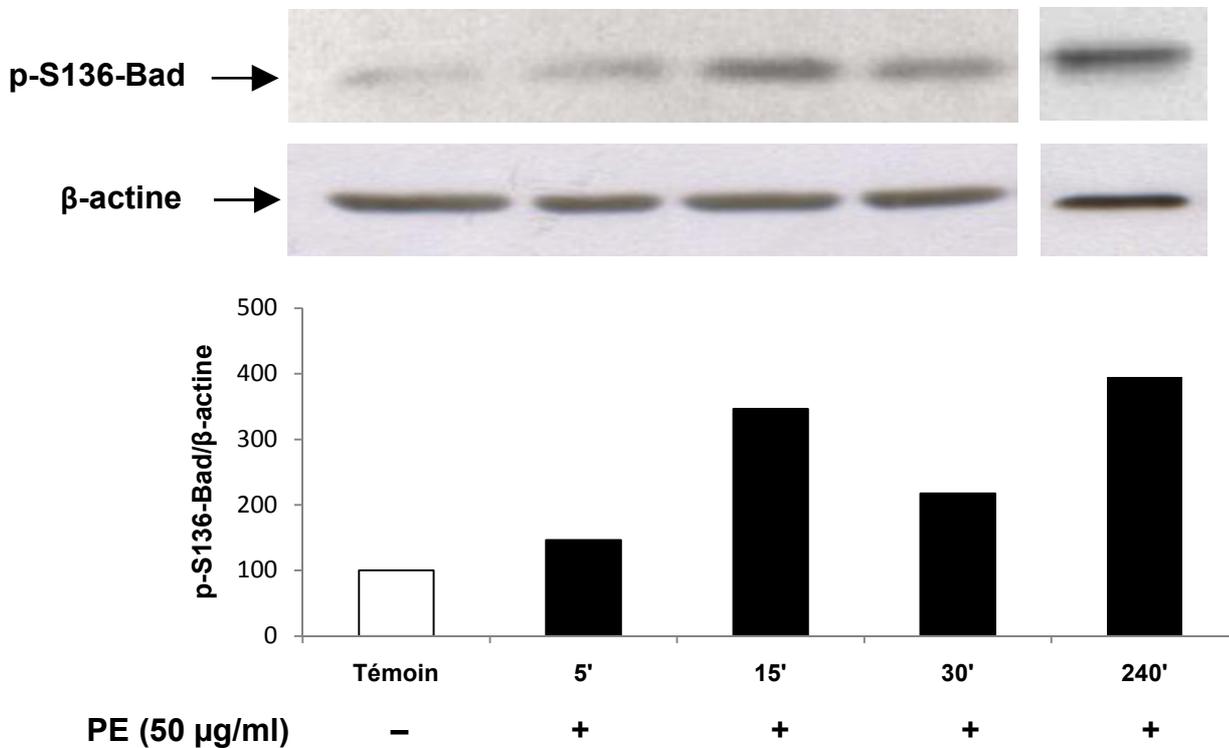


Figure 28 : Cinétique de phosphorylation de Bad sur S136.

Les fibroblastes sont incubés avec des PE (50 $\mu\text{g/ml}$) suivant une cinétique allant de 0 à 240 min. Ensuite, les fibroblastes sont lysés et les protéines extraites. Le degré de phosphorylation de Bad sur S136 est déterminé par Western blot. L'égalité du dépôt protéique est vérifiée par réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la β -actine.

La cinétique de phosphorylation de Bad suite à la stimulation par les PE (Figure 28) montre que Bad est phosphorylé dès 15 min. Cette phosphorylation est réduite à 30 min mais réapparaît à 4 h. Ceci suggère que, suite au traitement des cellules par les PE, Bad subit des

cycles de phosphorylation-déphosphorylation. Néanmoins, l'inactivation de Bad persiste dans le temps ce qui suggère un effet anti-apoptotique des PE.

VIII. Influence des PE sur la phosphorylation de la caspase-9

La caspase-9 est une caspase initiatrice. Elle possède dans son prodomaine des séquences de recrutement spécifiques de type CARD (CAspase Recruitment Domain) (Muzio et coll., 1996; Hofmann et coll., 1997). Ce domaine permet l'interaction avec des complexes multiprotéiques, le DISC (Death Inducing Signaling Complex) et l'apoptosome respectivement, résultant ainsi en l'activation de cette caspase. Une fois activée, cette caspase initiatrice va activer des caspases dites effectrices. *A contrario*, la phosphorylation de la caspase-9 sur sa sérine 196 provoque son inactivation (Cardone et coll., 1998).

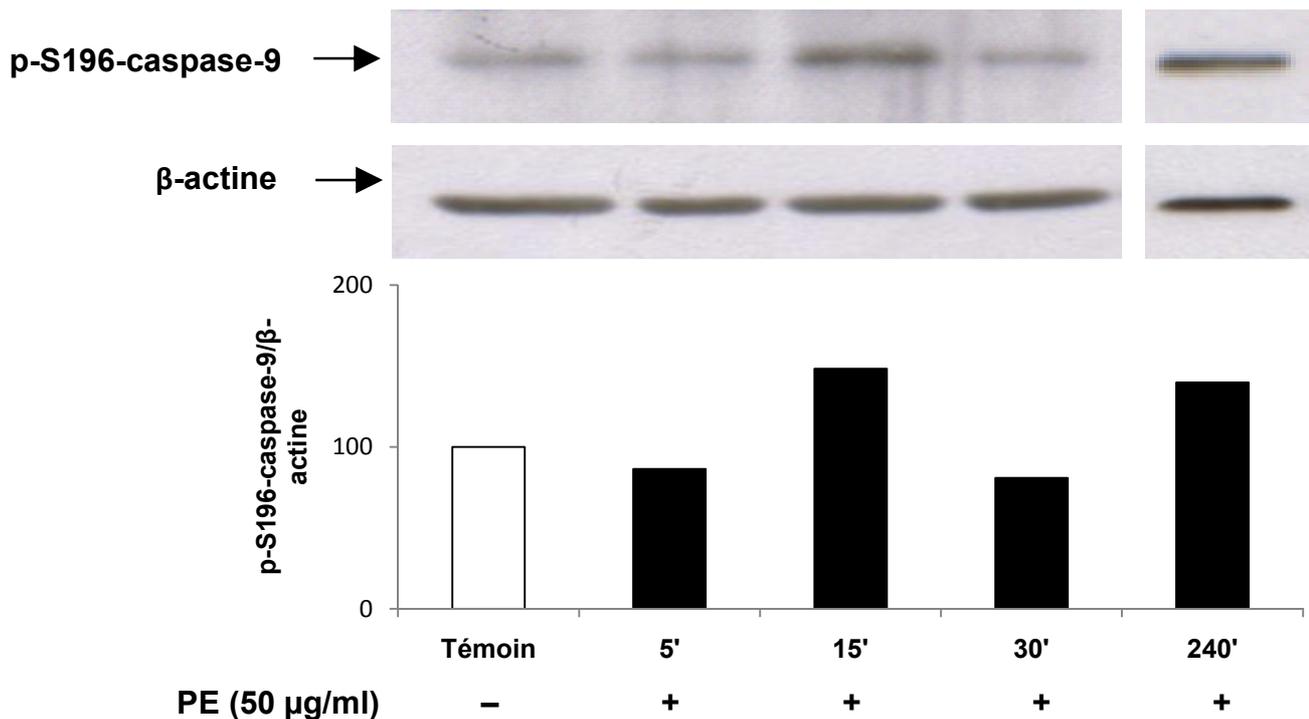


Figure 29 : Cinétique de phosphorylation de caspase-9 sur S196.

Les fibroblastes sont incubés avec des PE (50 µg/ml) suivant une cinétique allant de 0 à 240 min. Ensuite, les fibroblastes sont lysés et les protéines extraites. Le degré de phosphorylation de caspase-9 sur S196 est déterminé par Western blot. L'égalité du dépôt protéique est vérifiée par réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la β-actine.

La cinétique de phosphorylation de la caspase-9 suite à la stimulation par les PE (Figure 29) montre que la caspase-9 est phosphorylé dès 15 min. Celle-ci est réduite à 30 min mais réapparaît à 4 h. Ceci suggère que l'inactivation de la caspase-9 par Akt après un traitement par les PE persisterait jusqu'à 4h. Il est frappant de constater ici que la cinétique de phosphorylation de la caspase-9 suit celle de Bad, une autre protéine de la voie mitochondriale.

IX. Effets des PE sur l'activation de la caspase-9

Nous avons montré précédemment que la caspase-9 est inactivée par les PE. Afin de comprendre les effets des peptides d'élastine sur l'apoptose induite par les C₂-céramides, nous avons visualisé les formes actives de la caspase-9 grâce à un marquage de ces formes avec le réactif FLICA (Figure 30).

En absence de traitement, aucune fluorescence liée à la présence de caspase-9 active n'est observée (Figure 30A). Après un traitement aux C₂-céramides, un fort marquage est observé démontrant l'activation de la caspase-9 après 4 h d'incubation (Figure 30B). De façon frappante, ce marquage n'est plus présent en présence de PE (Figure 30C). Ces données montrent clairement que les PE empêchent l'activation de la caspase-9.

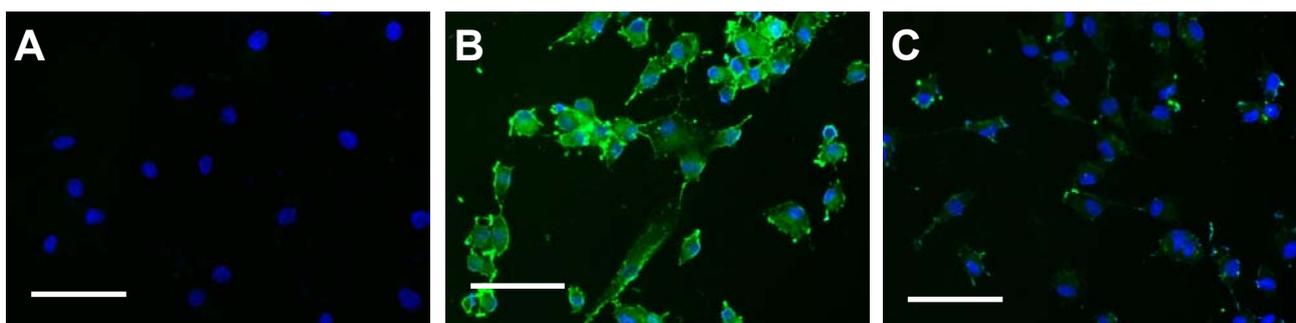


Figure 30 : Inhibition par les PE de l'activité caspase-9 induite par les C₂-céramides.

A. Cellules sans traitement. B. Les cellules sont cultivées en présence de C₂-céramides (20 µM) pendant 4 h. C. Les cellules sont cultivées en présence de PE (50 µg/ml) et de C₂-céramides (20 µM) pendant 4 h. Le FLICA est un réactif perméable à la membrane qui se lie de façon covalente à la caspase-9 active. Sa liaison induit sa fluorescence qui est excitée à 490 nm et détectée à 520 nm. Les noyaux sont visualisés par marquage au Hoechst en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 365 nm et une longueur d'onde de détection à 480 nm. La barre blanche représente 100 µm.

X. Influence des PE sur la phosphorylation de Foxo3a

La *Forkhead box O3*, également connu sous le nom de Foxo3, est une protéine qui est codée chez l'homme par le gène *Foxo3*. Ce gène appartient à la famille des facteurs de transcription de type Forkhead qui sont caractérisés par un domaine en tête de fourche (Forkhead). Ces facteurs de transcription ont la capacité d'être transportés dans le noyau (Brunet et coll., 1999). À ce titre, ce gène est susceptible de fonctionner comme un déclencheur de l'apoptose par l'expression de gènes nécessaires à la mort cellulaire, telles que Puma et Bim (You et coll., 2006; Ekoff et coll., 2007). Foxo3a va également jouer un rôle dans la régulation positive des protéines anti-apoptotiques tels que FLIP (Skurk et coll., 2004). L'effet pro-apoptotique de Foxo3a peut être neutralisé par la voie PI3K/Akt. Nous avons voulu savoir si d'autres voies de signalisation pro-apoptotiques autre que celles impliquant la caspase-9 pouvaient être inactivées par les PE.

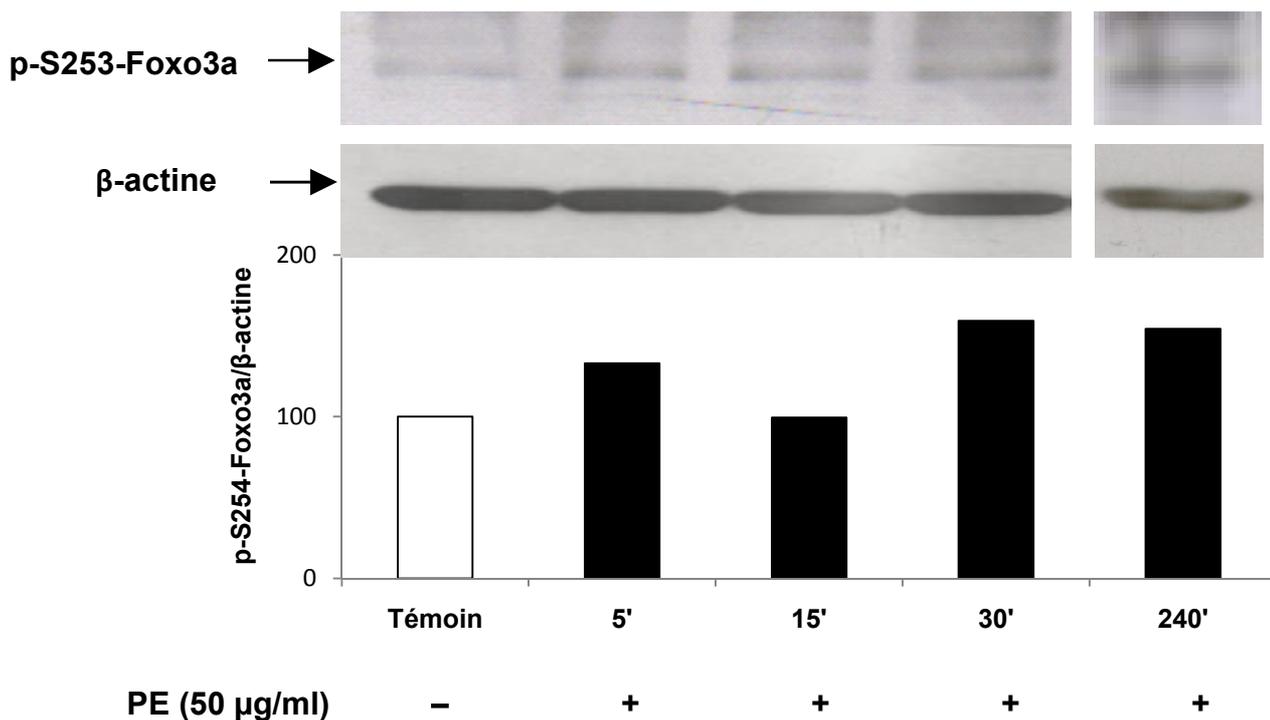


Figure 31 : Cinétique de phosphorylation de Foxo3a sur S253.

Les fibroblastes sont incubés avec des PE (50 µg/ml) suivant une cinétique allant de 0 à 240 min. Ensuite, les fibroblastes sont lysés et les protéines extraites. Le degré de phosphorylation de Foxo3a sur S253 est déterminé par Western blot. L'égalité du dépôt protéique est vérifiée par réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre une protéine constitutive, la β-actine.

La Figure 31 montre que Foxo3a est phosphorylée suite à un traitement par les PE avec un maximum apparent de phosphorylation qui est atteint au bout de 30 min. Ce phénomène est encore observable après 4 h d'incubation en présence de PE.

XI. Influence des PE sur la séquestration de Foxo3a par la protéine 14-3-3 ζ

Quand Foxo3a est phosphorylé par la cascade de signalisation impliquant Akt et la PI3K, sur S253, elle s'associe avec la protéine 14-3-3 ζ. Elle est retenue dans le cytoplasme où elle perd sa capacité à induire l'expression de gènes pro-apoptotiques (Brunet et coll., 1999).

Nous avons étudié les interactions qui peuvent se produire entre Foxo3a et la 14-3-3 ζ suite à un traitement aux PE (Figure 32).

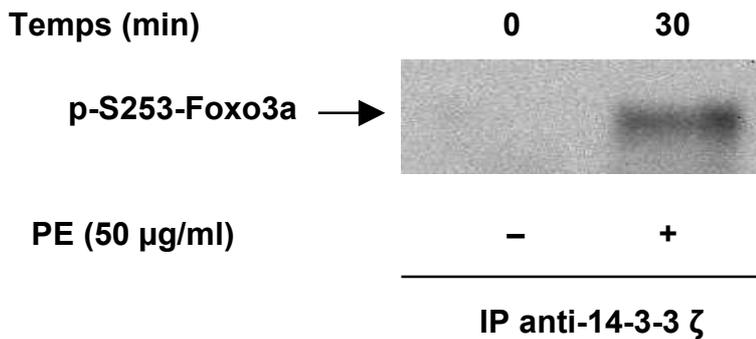


Figure 32 : Séquestration de Foxo3a par la 14-3-3 ζ suivant un traitement aux PE.

Les cellules sont traitées avec des PE (50 µg/ml) pendant 30 min et lysées. La 14-3-3 ζ est immunoprécipitée et les protéines précipitées sont sujettes à une analyse par Western blot en utilisant un anticorps anti-phospho-S253-Foxo3a.

Nous nous sommes placés au maximum de phosphorylation pour cette protéine c'est-à-dire 30 min. Suite un traitement aux PE, nous avons réalisé une immunoprécipitation avec un anticorps anti-14-3-3 ζ. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été révélées par un anticorps anti-Foxo3a phosphorylée sur S253. Nous montrons ainsi une interaction entre Foxo3a phosphorylée et la 14-3-3 ζ suite à l'action des PE. Nous en concluons donc que les PE permettent la séquestration et l'inactivation de Foxo3a par la protéine 14-3-3 ζ.

2^{ème} partie :

*Complexe récepteur
de l'élastine et vieillissement*

Complexe récepteur de l'élastine et vieillissement

Avec le vieillissement, nous assistons à la survenue d'altérations dans la structure et la fonction des tissus. Un élément essentiel de ces changements est la dégradation progressive de la composante majeure de la fibre d'élastine : l'élastine. Les peptides d'élastine (PE) dérivés de cette dégradation se retrouvent dans le sérum humain. Une étude sur 1600 individus a montré que la concentration sérique en PE circulant est de l'ordre de 10 µg/ml (Bizbiz et coll., 1997).

Comme nous l'avons vu précédemment, les PE sont capables d'induire des effets biologiques très divers en stimulant les fibroblastes dermiques humains (FDH) par l'intermédiaire du complexe récepteur de l'élastine (CRE). Cependant, un découplage progressif du CRE survient avec le vieillissement ce qui altère les voies de transduction passant par celui-ci. Ces altérations dans la transduction des signaux du CRE ont comme conséquence la modification des activités des cellules ce qui mène à un certain dysfonctionnement cellulaire. En 1997, Varga et collaborateurs ont montré que l'activation du CRE diminue le taux d'incorporation de l'acétate radiomarqué dans le cholestérol de monocytes humains. Cet effet est retrouvé chez les monocytes de sujets jeunes mais disparaît totalement chez les monocytes d'individus âgés (Varga et coll., 1997). Plus récemment, des études chez le rat ont montré que l'effet protecteur des PE sur le cœur suite à une ischémie est perdu chez des rats âgés (Robinet et coll., 2007). Le découplage du récepteur est donc un phénomène important dans la compréhension de nombreux phénomènes liés au vieillissement.

Le but de cette deuxième partie de notre étude sera en premier lieu d'analyser l'expression du CRE chez des cellules issues de patients jeunes et âgés car l'explication la plus simple du découplage du récepteur pourrait être la baisse de son expression au cours du vieillissement. Puis nous nous intéresserons à l'influence des PE sur leur propre récepteur, les PE étant retrouvés de façon croissante au cours du vieillissement.

I. Design des amorces pour la qPCR

La β -galactosidase humaine (EC 3.2.1.23) est une enzyme qui hydrolyse les résidus galactosyls terminaux liés en β , ce qui regroupe de nombreux substrats : les glycoprotéines, les glycolipides ou les GAG. La forme active de cette enzyme est une protéine de 64 kDa qui a une localisation lysosomale. Elle participe à la dégradation de molécules intracellulaires.

Il existe deux transcrits dans les fibroblastes, tous deux issus du gène *gbl1* situé au locus 3p21.23 codant la β -galactosidase (Morreau et coll., 1989). Les deux transcrits ont respectivement des tailles de 2,4 kb et de 2 kb et commencent au même ATG pour finir au même codon stop. Le plus long transcrit comprend 16 exons et semble exprimé 10 fois plus que l'autre. Il code pour la forme active de la β -galactosidase. Celle-ci est d'abord exprimée sous forme d'un précurseur de 84 kDa qui, après clivage par une cathepsine B sur son arginine en position 531, devient la forme active de la β -galactosidase de 64 kDa (Okamura-Oho et coll., 1997). Aucun autre clivage n'est subi car PPCA protège la séquence C-terminale de cette enzyme (Callahan, 1999).

Le second transcrit code, quant à lui, pour une forme enzymatiquement inactive d'environ 59 kDa. L'épissage alternatif qu'il subit consiste en deux délétions successives (Figure 7, page 32). La première concerne les exons 3, 4 et induit un décalage du cadre de lecture de l'exon 5. La seconde concerne l'exon 6 et restitue le cadre de lecture initial. Les séquences codées par les exons 1, 2 et 7 à 16 sont identiques à celles de la β -galactosidase. Cette forme inactive est appelée S-Gal pour *spliced* galactosidase. Il s'agit de l'EBP. La nouvelle séquence codée par l'exon 5 comporte 32 résidus qui lui sont propres (Figure 7). Cette forme n'est pas catalytiquement active, elle fixe les galactosides mais ne les clivent pas et a perdu son adressage lysosomal.

1. Amorces discriminant l'EBP de la β -galactosidase

L'étude de l'expression du gène codant l'EBP par PCR quantitative pose le problème de discrimination avec la β -galactosidase, dont la séquence en ARNm est proche. De ce fait, les séquences obtenues pourraient provenir d'une amplification de l'ARNm de la β -gal. Ce qui fausserait nos résultats car nous voulons observer l'expression spécifique de l'EBP.

Après avoir consulté la littérature, nous nous sommes aperçu qu'il n'existait pas à ce jour de couple d'amorces permettant de discriminer la β -gal et l'EBP. Nous avons donc initié cette étude. Pour cela, trois couples d'amorces ont été considérés (Tableau 3).

Amorces testées	Taille de la séquence
Sens : 5'-TCCAGACATTACCTGGCAGCT-3' Antisens : 5'-GGCTCACACTTCCTCTGGCT-3'	148 pb
Sens : 5'-AGGAAGCATTCACTACTCCCGTGT-3' Antisens : 5'-ACAGCTGCCAGGTAATGTCTGGAT-3'	106 pb
Sens : 5'-ACCGGCTGCTGAAGATGAAGAT-3' Antisens : 5'-ATGTTGCTGCCTGCACTGTT-3'	151 pb

Tableau 3 : Séquences des amorces EBP testées.

Une fois synthétisés, la spécificité de chaque couple d'amorces a été vérifiée expérimentalement par l'observation sur gel d'agarose des produits PCR. Malheureusement, aucune de ces amorces n'a donné de résultat satisfaisant. A chaque fois, nous n'avons pas vu de différence nette d'amplification entre l'EBP et la β -gal.

a. Test des amorces EBP et β -gal

Afin de discriminer l'EBP et la β -gal nous avons alors choisi de prendre une amorce qui s'hybride sur la séquence qui chevauche l'exon 2 et l'exon 5 de l'ARNm codant l'EBP. Ainsi qu'une amorce qui chevauche l'exon 5 et l'exon 7, les exons 3, 4 et 6 étant manquants pour l'EBP. Nous espérons que la séquence amplifiée soit spécifique de l'EBP.

Ce couple d'amorce est le suivant : Sens : 5'-TCCAGACATTACCTGGCAGCT-3'

Antisens : 5'-ATGTTGCTGCCTGCACTGTT-3'

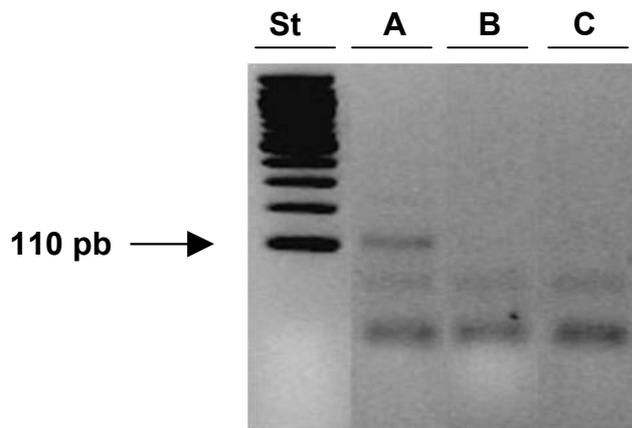


Figure 33 : Test des amorces EBP par PCR.

Pour l'amplification, les amorces EBP présentées dans le Tableau 2 ont été utilisées. St : Standard moléculaire. A : ADNc d'un échantillon. B : Témoin ARN. C : Témoin sans acides nucléiques.

La Figure 33 montre que le couple d'amorce choisi donne une bande de 110 pb correspondant à la séquence amplifiée attendue de l'EBP (Figure 33A). Cette bande n'est pas retrouvée si la PCR est réalisée sur les ARN totaux non rétro-transcrits de la cellule. Ainsi, il n'y a pas de contamination en ADN génomique de nos échantillons qui pourrait fausser nos résultats (Figure 33B). Nous n'observons pas non plus de bande en absence d'acides nucléiques (Figure 33C). Cela prouve qu'il y a bien une amplification de l'ADNc par les amorces EBP.

Nous observons par contre deux bandes de faibles tailles dans chacune des pistes. La bande intermédiaire correspond à la mise en évidence de dimères d'amorce par le BET. De même la bande inférieure correspond à la révélation des dNTP par le BET.

Les amorces β -gal ont été pour leur part choisies de façon à ce se trouver sur l'exon 4, celui-ci étant absent sur l'ARNm de l'EBP.

Ces amorces sont les suivantes : Sens : 5'-GCTGGTTATCCTGAGGCC-3'

Antisens : 5'-CGGAGGAGCGGAGAAGAATA-3'

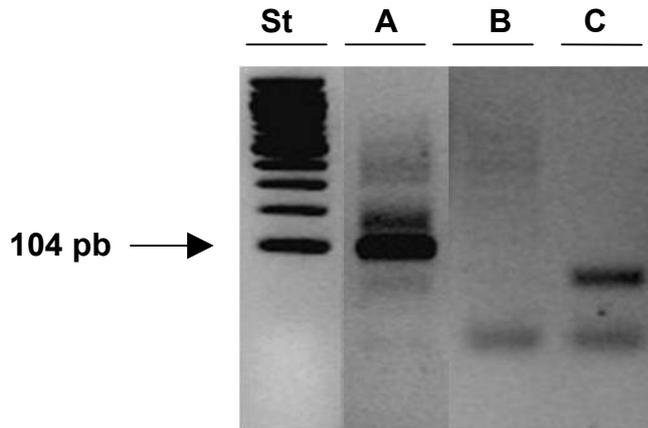


Figure 34 : Test des amorces β -gal par PCR.

Pour l'amplification, les amorces β -gal présentées dans le Tableau 2 ont été utilisées. St : Standard moléculaire. A : ADNc d'un échantillon. B : Témoin ARN. C : Témoin sans acides nucléiques.

Nous mettons en évidence une bande à 104 pb correspondant à la taille attendue de l'amplification de la séquence de la β -gal (Figure 34A). Cette bande n'est pas retrouvée si les ARN totaux sont utilisés (Figure 34B) et en absence d'acide nucléiques (Figure 34C).

b. Discrimination entre l'EBP et la β -gal

Nous avons cloné les fragments PCR obtenu auparavant puis nous avons testé les clones en faisant une PCR avec les amorces EBP (Figure 35) et avec les amorces β -gal (Figure 36).

A l'issue de la PCR avec les amorces EBP, nous observons que le fragment EBP est amplifié dans les clones EBP (Figure 35B et C) et pas dans les clones β -gal (Figure 35D et E).

A l'inverse, une PCR avec les amorces β -gal ne donne rien sur des clones EBP (Figure 36B et C) et donne un fragment β -gal à la taille attendue sur les clones β -gal (Figure 36E et F). La PCR sur plasmide EBP sert de témoin positif (Figure 35A).

Ces résultats montrent que nous avons réussi à obtenir des amorces permettant de discriminer l'EBP et la β -gal.

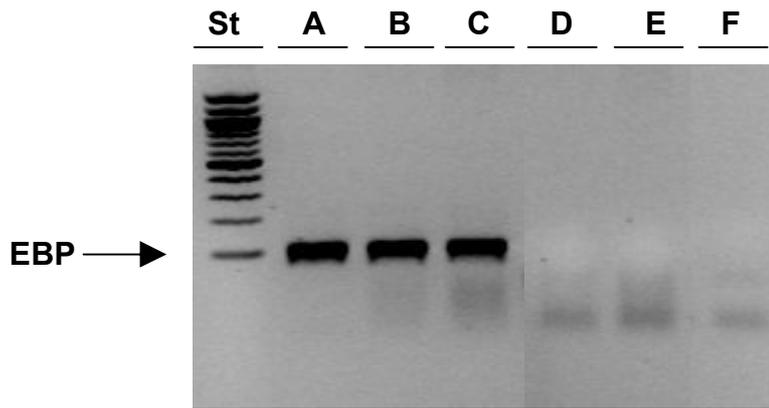


Figure 35 : PCR par les amorces EBP.

Pour l'amplification les amorces EBP présentées dans le Tableau 2 ont été utilisées. St : Standard moléculaire. A : Plasmide EBP. B : Clone EBP 1. C : Clone EBP 2. D : Clone β -gal 1. E : Clone β -gal 2. F : Témoin sans acides nucléiques.

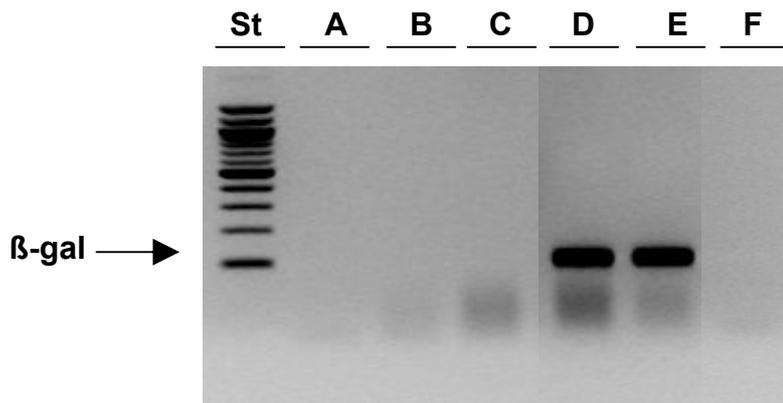


Figure 36 : PCR par les amorces β -gal.

Pour l'amplification, les amorces β -gal présentées dans le Tableau 2 ont été utilisées. St : Standard moléculaire. A : Plasmide EBP. B : Clone β -gal 1. C : Clone β -gal 2. D : Clone EBP 1. E : Clone EBP 2. F : Témoin sans acides nucléiques.

2. Amorces Neu-1 et PPCA

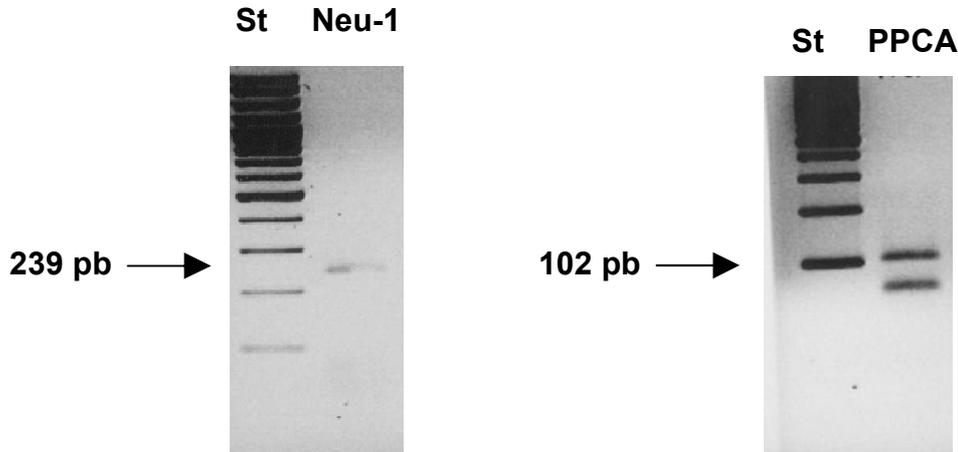


Figure 37 : Vérification de la qualité des amorces Neu-1 et PPCA par PCR.

Pour l'amplification les amorces Neu-1 et PPCA présentées dans le Tableau 2 ont été utilisées. St : Standard moléculaire.

Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 2 (page 68). Avant de faire la qPCR, la validité de ces amorces et leur capacité à amplifier spécifiquement les gènes d'intérêt ont été évalués par PCR (Figure 37).

Les résultats étant satisfaisants pour Neu-1 et PPCA, nous avons ensuite utilisé ces amorces pour la qPCR. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 2 (page 68).

II. Expression basale du récepteur en fonction de l'âge

Des études ont montrées que les PE sont moins efficaces quand les cellules sont âgées. Ce phénomène inexplicable est appelé le "découplage du récepteur" parce qu'il semble que le récepteur soit littéralement déconnecté de ses voies de signalisation, l'explication la plus simple étant que le récepteur est moins exprimé avec l'âge. Nous avons analysé son expression par PCR quantitative dans 4 lignées de FDH provenant de patients d'âge inférieur à 25 ans et dans 4 lignées de FDH provenant de patients d'âge supérieur à 60 ans (Figure 38).

Nous observons tout d'abord que l'EBP et la β -gal sont différemment exprimées. L'enzyme lysosomale est en effet plus exprimée que son variant d'épissage. Ceci est vrai à la fois pour les cellules jeunes et âgées. Cependant, il n'y a pas de différence d'expression entre

ces deux protéines chez les FDH jeunes et âgés. Leurs valeurs mesurées par qPCR étant pratiquement identiques. De même nous n'observons pas de variation dans l'expression des autres sous-unités du récepteur de l'élastine (Neu-1 et PPCA) au cours du vieillissement.

Ces résultats montrent que les différentes sous unités du complexe récepteur de l'élastine sont exprimées de façon homogène entre les cellules âgées et jeunes. Le découplage du récepteur au cours du vieillissement ne peut donc pas être attribué à une expression différentielle de celui-ci. Le défaut observé provient donc soit d'un défaut lié soit à la traduction et/ou à la maturation des protéines soit à un défaut d'activité biologique.

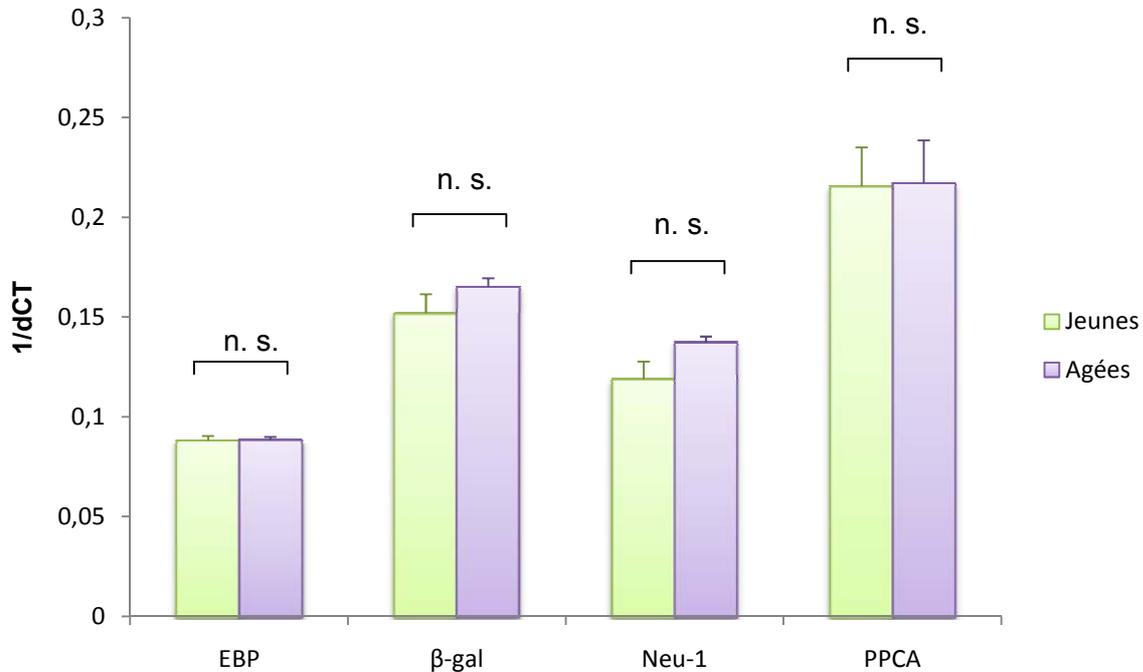


Figure 38 : L'expression basale des trois sous-unités du complexe récepteur de l'élastine et de la β -gal au cours de l'âge par PCR quantitative.

Une PCR quantitative est effectuée sur 4 lignées de FDH provenant de patients d'âge inférieur à 25 ans (jeunes) et 4 lignées de FDH provenant de patients d'âge supérieur à 60 ans (âgées). Le standard interne utilisé est la β -actine. Les valeurs de 1/dCT sont calculées et les valeurs moyennes ont été calculées avec leur valeur de déviation standard à la moyenne. n. s. : non significatif.

III. Influence des PE sur l'expression du récepteur

Nous avons montré précédemment que l'expression du récepteur ne variait pas au cours du vieillissement intrinsèque en conditions basales. Nous savons par contre que les PE s'accumulent avec l'âge. Nous nous sommes donc demandé s'ils ne pourraient pas avoir un quelconque effet sur l'expression de leur propre récepteur.

Pour cela, nous avons utilisé des FDH provenant d'un patient âgé de 30 ans. Cet âge a été choisi afin d'obtenir des conditions dans lesquelles, physiologiquement, la dégradation des fibres élastiques est minimale. Nous avons ensuite procédé à une stimulation par les PE à un temps long afin d'étudier l'expression du CRE dans ces conditions (Figure 39). Nous avons choisi une stimulation de 24 h sans SVF qui correspond à la durée maximale de stimulation avant que les cellules ne subissent les effets délétères de la déprivation en sérum.

Le taux de β -gal est comme précédemment toujours supérieur à celui de l'EBP. Malgré tout, nous pouvons observer que les PE font diminuer l'expression des différents messagers du CRE à différents niveaux. L'EBP voit son expression baisser de 40%, la Neu-1 de 30% et la PPCA de 20%.

Ce résultat nous montre que les PE vont donc agir sur leur propre récepteur pour faire baisser son expression.

Cette baisse d'expression se traduit non seulement par une baisse de l'expression de l'EBP, mais aussi par une modification importante du rapport de la quantité d'ARNm de la β -gal par rapport à ceux de l'EBP. En d'autres termes, ces résultats suggèrent que les PE pourraient influencer les profils d'épissage des cellules.

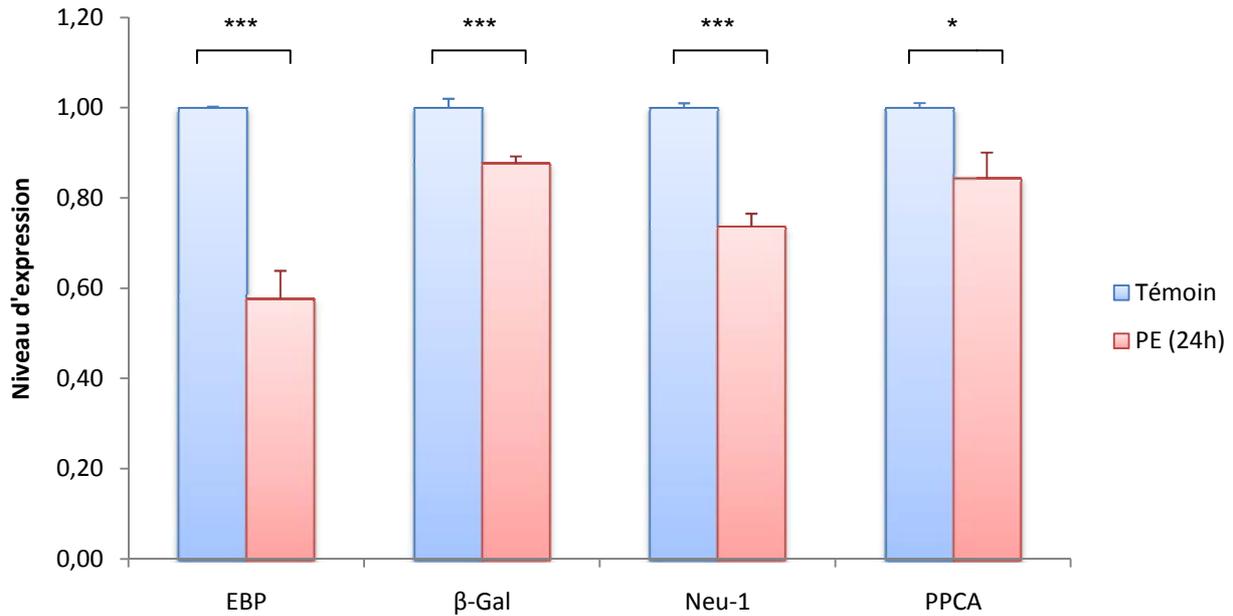


Figure 39 : Influence des PE sur l'expression du récepteur.

L'histogramme en bleu représente les FDH non stimulées et l'histogramme en rouge représente les FDH stimulés par les PE pendant 24 h. Les valeurs des témoins ont été normalisées à 1 pour faciliter la comparaison. La significativité a été évaluée par le test de Student. ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$

IV. Influence des PE sur l'expression du récepteur en fonction de l'âge

Au cours de nos expériences, nous avons montré que les PE peuvent diminuer l'expression des différentes sous-unités du complexe récepteur de l'élastine chez les FDH matures. Nous nous sommes donc tout naturellement posé la question des effets des PE chez des FDH jeunes et âgés.

Pour cela, nous avons utilisé 4 lignées de FDH provenant de patients d'âge inférieur à 25 ans et 4 lignées de FDH provenant de patients d'âge supérieur à 60 ans. Les cellules sont stimulées par les PE pendant 24 heures sans SVF puis analysés par PCR quantitative (Figure 40).

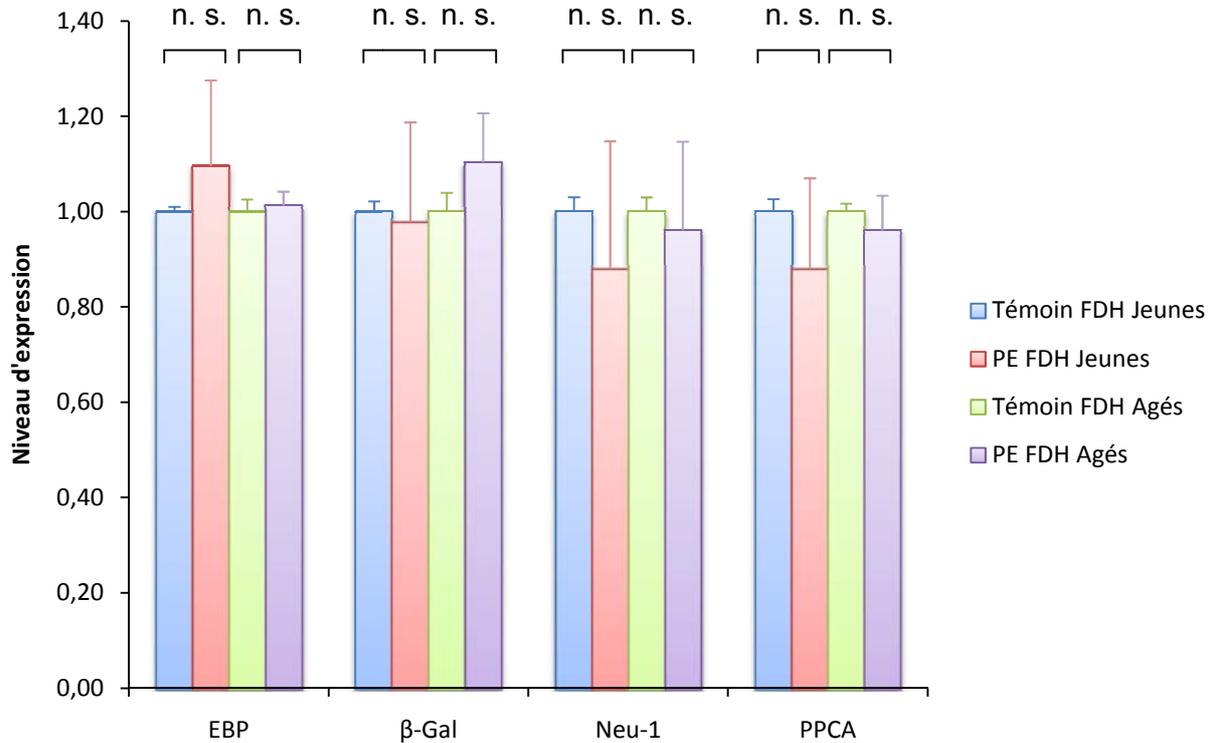


Figure 40 : Influence des PE sur l'expression du récepteur en fonction de l'âge.

L'histogramme en bleu représente les FDH jeunes non stimulés. L'histogramme en rouge représente les FDH jeunes stimulés par les PE pendant 24 h. L'histogramme en vert représente les FDH âgés non stimulés. L'histogramme en violet représente les FDH âgés stimulés par les PE pendant 24 h. Les valeurs des témoins ont été normalisées à 1 pour faciliter la comparaison. n. s. : non significatif.

Dans ces conditions expérimentales, nous ne notons pas de différence d'expression pour les différentes sous-unités du complexe récepteur de l'élastine. Que ce soit chez les FDH jeunes ou âgés, aucune différence d'expression ne peut être mise en évidence. Ces résultats contredisent en partie les données obtenues précédemment pour les FDH de sujet âgé de 30 ans.

Discussion

Discussion

Le vieillissement est un phénomène caractérisé par la diminution de la capacité d'un système pour répondre aux stress exogènes et endogènes provenant d'agents physiques, chimiques ou biologiques. Le vieillissement cutané se fait par 2 processus biologiques distincts : un intrinsèque et un extrinsèque. Le premier est un processus naturel qui résulte de la lente dégénérescence des tissus. Dans le derme humain, le vieillissement intrinsèque se caractérise par 3 éléments : l'atrophie du derme en raison de la perte de collagène, la dégénérescence du réseau de fibres élastiques et la perte d'hydratation. Contrairement au vieillissement intrinsèque, le vieillissement extrinsèque est dû à des facteurs environnementaux. La principale cause étant l'exposition aux rayons ultraviolets (UV). Il est souvent appelé le photovieillissement.

Le tissu conjonctif de la peau est principalement composé de collagène et d'élastine. Le collagène représente 70-80% du poids sec de la peau et du derme, qui lui confère son intégrité structurelle. L'élastine est une composante secondaire du derme, mais elle a une fonction importante dans l'élasticité. Au cours du vieillissement, la synthèse de collagène diminue progressivement, et la peau devient plus mince en particulier après 70 ans. Plusieurs facteurs contribuent au vieillissement cutané. Dans plusieurs maladies héréditaires, le collagène ou l'élastine sont déficients, conduisant à l'accélération du vieillissement. Pour le *cutis laxa*, par exemple, les fibres d'élastine sont insuffisantes ou manquent complètement, ce qui conduit à l'affaissement de la peau. L'irradiation solaire vieillit prématurément la peau. En particulier, le rayonnement ultraviolet entraîne une accumulation anormale de matériel élastolytique. Ces changements sont habituellement observés après l'âge de 60 ans, mais l'exposition excessive au soleil peut causer un photovieillissement dès l'âge de 20 ans.

Chez l'adulte, le renouvellement des macromolécules de la matrice extracellulaire est lent. Deux mécanismes interviennent dans le vieillissement des macromolécules de la matrice extracellulaire : l'interaction avec les facteurs environnementaux (glucose, lipides, calcium...) et l'altération des processus de synthèse et dégradation, les facteurs environnementaux pouvant eux-mêmes modifier les processus de synthèse et de dégradation.

Au cours de leur synthèse, pendant le développement et la croissance, les molécules de collagènes d'une part et les molécules d'élastine d'autre part sont liées entre elles par la formation des acides aminés de pontage. C'est lors de la formation de ces acides aminés de pontage que les molécules acquièrent leurs fonctions de résistance à l'étirement pour les collagènes et d'élasticité pour l'élastine. Elles acquièrent simultanément leurs propriétés de résistance à la protéolyse.

Au cours du vieillissement, d'autres liaisons intermoléculaires sont formées par réaction d'un ose avec les fonctions aminées libres. Toutes les protéines de l'organisme peuvent être oxydées et glyquées mais les conséquences de ces altérations sont plus néfastes sur les protéines de la MEC en raison de leur longue durée de vie dans l'organisme. La glycation non enzymatique, par la liaison de sucres réducteurs comme le glucose aux résidus lysine et arginine à l'extérieur des cellules, va former des produits dits d'Amadori (Bailey, 2001). Si des oxydations ultérieures ont lieu, il y a formation d'AGE (*advanced-glycosylation end products*) dont les archétypes sont la n-carboxyméthyl-lysine et la pentosidine qui s'accumulent avec le vieillissement et, de façon plus précoce, dans des pathologies comme le diabète. Ces AGE sont des liaisons intermoléculaires supplémentaires qui induisent une augmentation de la résistance à l'étirement pour les collagènes et une diminution de l'élasticité pour l'élastine. Leur formation modifie les chaînes latérales des acides aminés dans les protéines. Ces modifications peuvent également résulter de désamidation, isomérisation, racémisation, oxydation... (Cloos et Christgau, 2002). De telles altérations des acides aminés perturbent les interactions entre macromolécules de la MEC et les cellules.

Dans les différents tissus, les collagènes et les fibres élastiques sont synthétisés dans la période périnatale et dans l'enfance. Au-delà de la phase de croissance, leurs synthèses sont très faibles et leurs vitesses de renouvellement très lentes. La synthèse de ces macromolécules peut-être réactivée au niveau des sites de cicatrisation à la suite d'une blessure mécanique ou d'une agression protéolytique. La synthèse des différentes protéines constitutives des fibres élastiques, parfaitement coordonnée dans le temps et dans l'espace lors du développement, est cependant moins efficace lors de ces étapes de réparation tissulaire. La proportion des différents types de collagènes synthétisés peut également être modifiée.

Le catabolisme des macromolécules de la MEC fait intervenir diverses protéases. Certaines (la métalloprotéinase matricielle MMP-2 des cellules musculaires lisses, par exemple) sont synthétisées et sécrétées par les cellules mésenchymateuses et les cellules

épithéliales (Jacob, 2003). Mais, de par le contrôle de l'étape d'activation du zymogène et l'inhibition de son activité par les inhibiteurs synthétisés par les mêmes cellules, l'activité de la MMP-2 est très faible et le catabolisme de la MEC est lent.

Au cours du développement de diverses pathologies liées au vieillissement, d'autres enzymes (élastinolytiques, collagénolytiques...) sont détectables dans les tissus lors des phases inflammatoires aiguës ou chroniques. Celles-ci sont synthétisées et sécrétées par les cellules inflammatoires (polymorphonucléaires neutrophiles, macrophages) ou néosynthétisées par les cellules musculaires lisses stimulées par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α ...) (Galis et Khatri, 2002). Les activateurs du plasminogène tPA ou uPA peuvent participer à la dégradation de la MEC si la concentration tissulaire de plasminogène est augmentée. La plasmine formée dégrade directement (les glycoprotéines de structure, par exemple) ou indirectement (en activant les métalloprotéinases matricielles) divers composants de la MEC. La protéolyse péricellulaire des glycoprotéines d'adhésion induit l'anoïkis des cellules, c'est-à-dire l'apoptose consécutive à la rupture des communications entre les cellules et leur environnement. Ce processus est en partie responsable de la disparition des cellules musculaires lisses de la paroi anévrismale (Michel, 2003). La dégradation des macromolécules de la MEC génère la formation de peptides dont les matrikines qui ont des propriétés biologiques propres et modulent la prolifération et la migration cellulaire, la production des protéases et l'apoptose des cellules (Maquart et coll., 2005).

Le rôle de ces matrikines est toujours un sujet de discussion. Les PE présentent ainsi un large éventail d'activités biologiques. Dans certains cas, leur action semble être préjudiciable pour l'organisme, par exemple, ils favorisent la progression de l'anévrisme (Hance et coll., 2002), mais, dans d'autres cas, ils montrent de puissants effets bénéfiques tels que la récupération d'une ischémie (Robinet et coll., 2007). Amis ou ennemis? Le débat est encore ouvert et la réponse se trouve certainement entre ces deux extrémités en fonction du contexte considéré.

Nous avons montré précédemment que les PE pourraient fortement influencer le comportement des fibroblastes dermiques humains et que leurs effets impliquent à la fois la PI3K / p110 γ et la voie MEK / ERK (Duca et coll., 2005). Suivant la littérature, ces deux kinases interviennent dans la survie cellulaire, nous avons alors émis l'hypothèse que les PE pourraient contribuer à la survie cellulaire.

Dans ce travail, nous avons utilisé des cultures primaires de fibroblastes dermiques humains. Ce système a été largement étudié et nous avons déjà montré au laboratoire que l'effet des PE est médié principalement par le complexe récepteur de l'élastine. En effet, le blocage de Neu-1, qui est nécessaire pour une bonne signalisation du CRE, par la sur-expression d'une forme inactive de Neu-1 ou à l'aide d'un siRNA Neu-1, bloque les effets des PE (Duca et coll., 2007).

Nos résultats montrent que les PE sont de puissants facteurs de survie cellulaire car ils sont capables de réduire l'apoptose induite par les céramides (Figure 17 et Figure 18). Le fait que le lactose puisse bloquer l'effet laisse fortement à penser qu'il est transduit suite à une interaction des PE avec l'EBP, une sous-unité du CRE (Figure 19 et Figure 20). Surtout, nous montrons ici que les effets déclenchés par les PE sont dépendants de l'activité d'une PI3K (Figure 21 et Figure 22) mais pas de l'activation de ERK (Figure 23 et Figure 24). Ce point suggère que les signaux relayés par le CRE suite à un traitement aux PE impliquent la p110 γ . Cette PI3K est un acteur majeur du chimiotactisme cellulaire (Smith et coll., 2007), un phénomène qui peut être favorisé par les PE. En outre, elle est impliquée dans l'angiogenèse (Fahem et coll., 2008), l'ischémie-reperfusion (Robinet et coll., 2007) et la production de protéases induite par les PE (Duca et coll., 2005). Nos résultats renforcent l'idée que cette kinase pourrait jouer d'un rôle central dans la biologie des PE.

La kinase Akt est la principale cible anti-apoptotique en aval de la PI3K. Nos données indiquent que le traitement aux PE favorise l'activation d'Akt (Figure 25 et Figure 26). Fait intéressant, l'activation Akt par le traitement aux PE est persistante dans le temps et a pu être observée après 4 h. Démontrant encore une fois que les PE sont de puissantes molécules anti-apoptotiques. La confirmation que cette protéine est impliquée dans la survie cellulaire a été apportée. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PI3K, le LY294002, empêche la phosphorylation d'Akt suite à une stimulation par les PE (Figure 27).

Nous avons observé par ailleurs que les PE ont également induit la phosphorylation de Bad, Foxo3a et la caspase-9, trois cibles pro-apoptotiques d'Akt, neutralisant leurs effets pro-apoptotiques (Figure 28 ; Figure 29 ; Figure 31). En outre, nous avons montré que le traitement aux PE a augmenté la séquestration de Foxo3a dans le cytoplasme comme l'a révélé l'immunoprécipitation par la 14-3-3 ζ (Figure 32).

Au total, nos données suggèrent fortement que les PE promeuvent la survie cellulaire par la voie p110 γ /Akt et le blocage des voies apoptotiques intrinsèque (Bad, la caspase-9) et extrinsèque (Foxo3a). Fait intéressant, l'effet sur les cibles de la voie intrinsèque est rapide (maximum de phosphorylation à 15 min), mais diminue puis ré-augmente à 4 h. Cette constatation suggère que l'effet anti-apoptotique des PE pourrait être persistant dans le temps. En conséquence, nous avons analysé l'activité caspase-9, après 4 h de traitement (Figure 30). Nos résultats démontrent clairement que les effets des PE sont toujours présents et puissants après une longue période d'exposition aux PE.

Afin de poursuivre l'étude de la voie de survie induite par les PE, nous avons envisagé l'étude de la caspase-3 effectrice afin de montrer si elle est inactivée à son tour par les peptides d'élastine. Le précurseur inactif de cette enzyme subit une modification protéolytique à l'issue de laquelle la caspase-3 est activée. C'est sous cette forme active qu'elle déclenche l'apoptose en catalysant le clivage spécifique de certaines protéines intracellulaires. Des études par Western-Blot n'ont pas permis de détecter la bande correspondant à la caspase-3 sous sa forme active. Une étude de cette caspase-3 par dosage de son activité grâce à un kit Caspase Glo 3/7 commercialisé par la société Promega a été tenté. Mais nos résultats se sont trouvés aberrants et inexploitable. Ces techniques étant les plus utilisées pour étudier la caspase-3, il nous faudra trouver d'autres moyens de prouver son implication dans la survie cellulaire induite par les PE. La solution pourra venir de l'étude du clivage d'un substrat de la caspase-3 tel que PARP ou poly(ADP-ribose) polymérase. Une étude par Western-blot pourra être envisagée, le fragment de clivage étant de taille suffisante pour une bonne détection. Nous pourrions aussi utiliser un kit FLICA caspase-3 car celui-ci est désormais disponible.

Dans des circonstances normales, les cellules qui ont accumulées des structures endommagées sont éliminées par apoptose (Maiuri et coll., 2007). Les cellules âgées sont également connues pour accumuler des lipides, notamment les céramides qui peuvent mener à l'apoptose (Bree et coll., 2002). Comme nos données le montrent, les PE peuvent réduire les signaux apoptotiques des céramides. Par conséquent, leur présence dans l'environnement des cellules âgées pourrait contribuer à leur défaut d'apoptose. Cela permettrait alors de faciliter l'entrée de ces cellules endommagées dans un état de sénescence. Ainsi, en favorisant l'accumulation de la sénescence des cellules dans les tissus, les PE pourraient contribuer à leur perte de fonction.

Outre cet effet négatif, le fait que les PE puissent promouvoir la survie cellulaire pourrait être très important dans la cicatrisation des blessures car les peptides produits localement pourraient permettre de maintenir durablement la survie des cellules locales au site de la lésion. Cela pourrait être l'explication de ce qui est observé au cours de l'ischémie-reperfusion (Robinet et coll., 2007). L'hypothèse que les PE pourraient contribuer à la cicatrisation de la plaie doit être approfondie.

À notre connaissance, l'effet des PE sur la survie cellulaire n'a jamais été envisagé. Notre travail montre clairement que ces matrikines sont de puissants facteurs de survie de fibroblastes de peau humaine et que leurs effets sont puissants et persistant dans le temps. En conséquence, leur présence croissante au sein des tissus avec l'âge pourrait profondément modifier l'homéostasie tissulaire et contribuer au vieillissement global des tissus.

En outre, notre travail a consisté à étudier l'expression du complexe récepteur de l'élastine. Comme nous le savons, le récepteur subit un découplage au cours du vieillissement qui le rend moins efficace. Ce découplage est très marqué dans les travaux présentés par Robinet et collaborateurs (Robinet et coll., 2007) dans lesquels des rats âgés de 3 mois réagissent très favorablement à la présence de PE en réparant le tissu cardiaque alors que, dans les mêmes conditions expérimentales, des rats âgés de 24 mois semblent incapables de faire de même en présence des PE.

Notre première hypothèse sur la perte de la signalisation associée au récepteur chez les cellules âgées est que le récepteur serait moins exprimé chez ces dernières. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression basale des différentes sous-unités du récepteur par qPCR chez les FDH provenant de patients jeunes et âgés (Figure 38). Les résultats montrent que chez ces 2 types d'individus l'expression des sous-unités du CRE ne varie pas. Le problème posé reste donc entier puisque l'idée d'une diminution de l'expression du CRE par les cellules au cours du vieillissement n'est pas vérifiée.

Nous nous sommes alors penchés sur le rôle que pourraient avoir les PE sur ce phénomène. Ceux-ci sont connus pour être générés au cours du vieillissement et se retrouvent dans la circulation sanguine en quantité importante chez des sujets âgés. Partant de ce constat, nous avons évalué les effets des PE sur l'expression du récepteur chez les FDH. Nous avons étudié en premier lieu les effets chez des FDH de sujets d'âge moyen (30 ans) afin d'évaluer le phénomène chez des cellules en contact avec une quantité peu importante de PE en

conditions physiologiques. La mesure de l'expression du récepteur a de nouveau nécessité une quantification des messagers par qPCR. (Figure 39). Chez ces FDH de patients adultes nous avons montré que le récepteur voyait son expression diminuer en présence de PE.

Une baisse d'expression du récepteur pouvant être apparemment causée par les PE, nous avons alors étudié leurs effets sur l'expression de l'EBP par des FDH de sujets jeunes et âgés. A notre grande surprise, dans ces deux cas, la stimulation par les PE ne permit pas de retrouver les résultats trouvés avec les FDH de sujets adultes. L'expression des différentes sous-unités du CRE ne variait pas. Ces résultats pourraient s'expliquer par une fonction distincte du CRE en fonction de l'âge. Chez les sujets jeunes, les cellules expriment obligatoirement l'EBP car ces cellules sont alors programmées pour construire les fibres élastiques. La présence de PE n'a donc pas ou peu d'effet sur le niveau d'expression du récepteur. Chez les sujets matures, un effet est observé. Dans ce type de cellules, le CRE n'est plus utilisé pour construire les fibres. Il peut donc être régulé par les PE. Chez les sujets âgés, le CRE est découplé et, dans ce cas, les PE n'ont plus ou trop peu d'effets sur les cellules.

Une autre explication possible au découplage du récepteur observé au cours du vieillissement pourrait être une modification structurale de l'EBP. Celle-ci pourrait être due à une modification post-traductionnelle liée à l'âge et conduirait alors à une protéine dysfonctionnelle qui perdrait alors sa capacité de fixation aux PE ou son affinité pour le reste du complexe. Le CRE n'étant plus parfaitement fonctionnel, il perdrait son efficacité. Les autres sous-unités du récepteur pourraient être, elles aussi, la cause du découplage. La PPCA et la Neu-1 sont deux acteurs indispensables dans la fonctionnalité du récepteur de l'élastine. Là aussi, un changement dans la structure de ces protéines pourrait contribuer à leur dysfonctionnement.

Des études récentes au laboratoire ont montrés que le CRE transduit le signal grâce à l'activité catalytique de la Neu-1 (Duca et coll., 2007). Cette signalisation passe par des molécules amphiphiles appelées gangliosides comprenant une ancre lipidique de type céramide liée à une chaîne oligosaccharidique de longueur et de complexité variables. Ces lipides sont concentrés dans des microdomaines de la membrane plasmique spécialisés dans la signalisation cellulaire nommés radeaux lipidiques qui sont des structures très riches en glycosphingolipides et en cholestérol. Parmi les gangliosides, le GM3 ou acide N-acétylneuraminique- α (2-3)-galactosyl- β (1-4)-glucosyl- β (1-1')-céramide s'avère être le plus simple et est le substrat préférentiel de Neu-1 (Seyrantepe et coll., 2003). A ce jour,

aucune étude n'a déterminé les concentrations réelles en gangliosides au cours du vieillissement. Il serait possible d'imaginer qu'une diminution de ceux-ci au sein des membranes des cellules âgées pourrait contribuer au découplage du récepteur de ses voies de signalisation.

De plus, les radeaux lipidiques sont riches en cholestérol qui est nécessaire au maintien de leur structure et à leur fonctionnement en termes de plateforme de signalisation. Mais au cours du vieillissement, il y a une augmentation en cholestérol membranaire qui rigidifie la membrane. La fluidité de la membrane influençant la fonctionnalité des protéines intramembranaires. Des travaux chez les rats âgés ont montré l'impact de la diminution de fluidité membranaire au cours du vieillissement sur la fonctionnalité des protéines membranaires (Scheuer et coll., 1995). Il se pourrait que le CRE ne puisse plus fonctionner convenablement dans un tel environnement. De même, des changements membranaires pourraient délocaliser le CRE des radeaux lipidiques où se trouvent ses substrats.

Parmi les possibilités d'explication du découplage du CRE décrites ci-dessus, la perte de la capacité du récepteur à trouver et/ou cliver ses substrats nous semble être la plus plausible compte tenu des données actuelles de la littérature.

Conclusions
et
perspectives

Conclusions et perspectives

La première partie de notre travail identifie le mécanisme par lequel les peptides d'élastine induisent l'activation de la survie cellulaire. Quand les fibroblastes dermiques humains sont stimulés avec des PE, nous observons une diminution de l'apoptose induite par les céramides. Les céramides provoquent l'apoptose par libération dans le cytoplasme du cytochrome C permettant d'activer la caspase-9 initiateur. Dans notre système, nous avons montré que la voie PI3K/Akt était la voie principalement utilisée par les cellules. En effet, la stimulation par les PE provoque l'activation complète de la kinase anti-apoptotique Akt en passant par la PI3K/p110 γ (Figure 41). Akt va alors pouvoir phosphoryler les protéines pro-apoptotiques pour les inactiver. Soit de façon directe dans le cas de la caspase-9. Soit de façon indirecte dans le cas du facteur de transcription Foxo3a et Bad qui sont séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 ζ qui permet d'inhiber leur effets pro-apoptotiques. Dans la balance survie/apoptose, ce mécanisme favorise la survie cellulaire.

Dans notre étude, nous avons montré que la protéine 14-3-3 ζ va effectivement séquestrer Foxo3a. Suivant la littérature, il a été montré que Bad était lui aussi séquestré par la 14-3-3 ζ (Zha et coll., 1996). Les études par Western-blot effectuées au cours de ma thèse ont permis de montrer que Bad était phosphorylé donc potentiellement séquestré dans le cytoplasme par la 14-3-3 ζ . Cependant, elles ne m'ont pas encore permis de vérifier ce phénomène dans notre système. Il serait utile de vérifier ce point.

Les expériences ayant permis d'étudier la voie de signalisation impliquée dans la survie cellulaire induite par les PE ont été initiées chez des FDH de sujets mature (30 ans). L'étape suivante sera d'étudier cette voie de signalisation (et d'autres) pour des cellules provenant de patients âgés (>60 ans) de façon à comprendre les raisons du découplage du récepteur.

Le projet comporte néanmoins quelques difficultés majeures rencontrées aussi dans cette étude. Les cellules âgées sont difficiles à cultiver *in vitro*. Leur capacité de division par rapport à des cellules provenant de sujets jeunes ou matures est en effet beaucoup plus faible. Il pourrait être intéressant de mener des études sur des cellules sénescents. Ce sont des cellules qui sont entrées en stade quiescent ou de non division. Le fibroblaste cultivé *in vitro* ne peut se diviser qu'un nombre limité de fois. Au delà, les cellules subissent une "crise" qui

les empêche d'entrer dans le cycle mitotique : c'est la limite de Hayflick. Là aussi, nous sommes confrontés au même problème de culture cellulaire, car il faut obtenir des cellules sénescents en grande quantité en travaillant par passages successifs. Il faut en général plus de 20 passages avant qu'une cellule devienne sénescents. Le temps de division d'un fibroblaste étant long (48 h), il faut de nombreuses semaines avant d'obtenir la quantité optimale de fibroblastes sachant qu'après être passé en sénescence, ils ne se diviseront plus. L'autre difficulté est de mener la culture cellulaire à son terme car, la plupart du temps, les cellules meurent naturellement quand le nombre de passages devient trop élevé et n'atteignent donc pas le stade sénescents.

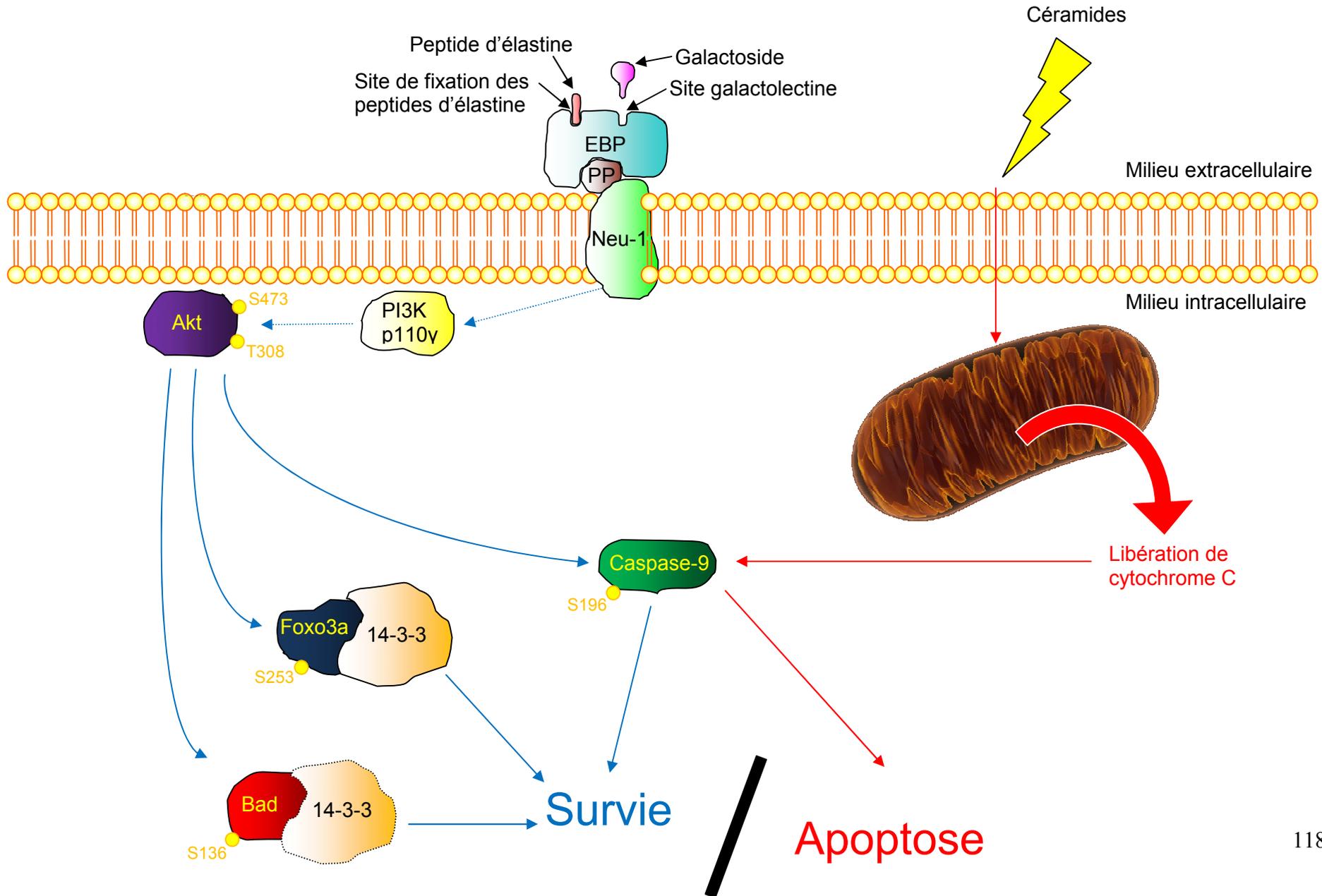
La solution pourrait être l'utilisation de puces à cellules transfectées. Dans cette méthodologie à haut débit, des cellules (comme des fibroblastes) sont transfectées par des siRNA et placées sur une puce où l'impact de l'extinction transitoire du gène ciblé est évalué. Cette méthode est très sensible et présente l'avantage de ne pas nécessiter beaucoup de matériel biologique. Dans le cas qui nous intéresse, les cellules pourraient être des fibroblastes âgés et les siRNA ceux du kinome des cellules humaines (plus de 800 kinases et protéines associées). Cette méthodologie présente malheureusement le défaut d'être très coûteuse.

Notre travail n'a pas pu mettre en évidence la raison du découplage du récepteur puisque nous avons montré que l'expression du récepteur n'est pas diminuée au cours du vieillissement. Cependant, cette étude ne s'est intéressée qu'à l'expression des différentes sous-unités du récepteur. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'adressage du CRE et sa localisation au sein des membranes en fonction de l'âge, notamment par rapport à des plateformes de signalisation appelées radeaux lipidiques. En effet, certains des lipides qui les composent sont des substrats de Neu-1. De plus, on ne peut pas écarter la possibilité que des modifications post-traductionnelles survenant au cours du vieillissement puissent modifier l'adressage du CRE et/ou sa fonctionnalité. Ces travaux pourraient être réalisés par des méthodes d'immunodétection associées à une analyse protéomique des protéines membranaires.

Notre étude s'étant focalisée sur des cellules normales du tissu conjonctif. Dans le futur, il pourrait être intéressant d'étudier également l'effet des peptides d'élastine sur la survie et le comportement des cellules tumorales. En effet, de telles cellules ayant colonisé des organes riches en élastine pourraient, grâce aux peptides d'élastine libérés localement, trouver des facteurs de survie qui pourraient favoriser leur maintien sur le site et, au-delà, la progression

de la tumeur. De nombreux médicaments anticancéreux sont de puissants inducteurs de l'apoptose en ciblant la voie mitochondriale. Les tumeurs implantées dans des tissus riches en élastine, comme par exemple le poumon, pourraient donc être alors plus difficiles à traiter par chimiothérapie.

Figure 41 : Schéma général de la signalisation induite par des peptides d'élastine ayant trait à la survie cellulaire.



Références

Références

Acharya U., Patel S., Koundakjian E., Nagashima K., Han X. et Acharya J.K. (2003) Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration. *Science* **299**(5613):1740-1743.

Achyuthan K.E. et Achyuthan A.M. (2001) Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**(1):29-64.

Adolphe M. et Barlovatz-Meimon G. (1988) Culture de fibroblastes. *Culture de cellules animales, Méthodologie et applications (éds INSERM)*:pp 141-142.

Anderson C.N. et Tolkovsky A.M. (1999) A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside. *J Neurosci* **19**(2):664-673.

Anderson K.E. et Jackson S.P. (2003) Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **35**(7):1028-1033.

Andjelkovic M., Alessi D.R., Meier R., Fernandez A., Lamb N.J., Frech M., Cron P., Cohen P., Lucocq J.M. et Hemmings B.A. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* **272**(50):31515-31524.

Ashkenazi A. et Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**(5381):1305-1308.

Ashworth J.L., Kelly V., Wilson R., Shuttleworth C.A. et Kielty C.M. (1999) Fibrillin assembly: dimer formation mediated by amino-terminal sequences. *J Cell Sci* **112** (Pt **20**):3549-3558.

Ashworth J.L., Kielty C.M. et McLeod D. (2000) Fibrillin and the eye. *Br J Ophthalmol* **84**(11):1312-1317.

Bailey A.J. (2001) Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* **122**(7):735-755.

Barondes S.H., Cooper D.N., Gitt M.A. et Leffler H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* **269**(33):20807-20810.

Bashir M.M., Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Rosenbloom J.C., Abrams W., Fazio M., Uitto J. et Rosenbloom J. (1989) Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* **264**(15):8887-8891.

Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. et Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4):1620-1624.

- Berneburg M., Plettenberg H. et Krutmann J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **16**(6):239-244.
- Bernert J.T., Jr. et Ullman M.D. (1981) Biosynthesis of sphingomyelin from erythroceramides and phosphatidylcholine by a microsomal cholinephosphotransferase. *Biochim Biophys Acta* **666**(1):99-109.
- Birbes H., El Bawab S., Hannun Y.A. et Obeid L.M. (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J* **15**(14):2669-2679.
- Bisaccia F., Morelli M.A., De Biasi M., Traniello S., Spisani S. et Tamburro A.M. (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**(4):332-341.
- Bizbiz L., Alperovitch A. et Robert L. (1997) Aging of the vascular wall: serum concentration of elastin peptides and elastase inhibitors in relation to cardiovascular risk factors. The EVA study. *Atherosclerosis* **131**(1):73-78.
- Blackburn E.H., Greider C.W., Henderson E., Lee M.S., Shampay J. et Shippen-Lentz D. (1989) Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome* **31**(2):553-560.
- Blood C.H., Sasse J., Brodt P. et Zetter B.R. (1988) Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol* **107**(5):1987-1993.
- Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V. et Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**(6):803-815.
- Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A. et Greenberg M.E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**(5443):1358-1362.
- Bonten E.J., Galjart N.J., Willemsen R., Usmany M., Vlak J.M. et d'Azzo A. (1995) Lysosomal protective protein/cathepsin A. Role of the "linker" domain in catalytic activation. *J Biol Chem* **270**(44):26441-26445.
- Booms P., Tiecke F., Rosenberg T., Hagemeyer C. et Robinson P.N. (2000) Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments. *Hum Genet* **107**(3):216-224.
- Borasio G.D., John J., Wittinghofer A., Barde Y.A., Sendtner M. et Heumann R. (1989) ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron* **2**(1):1087-1096.
- Borasio G.D., Markus A., Wittinghofer A., Barde Y.A. et Heumann R. (1993) Involvement of ras p21 in neurotrophin-induced response of sensory, but not sympathetic neurons. *J Cell Biol* **121**(3):665-672.
- Bose R., Verheij M., Haimovitz-Friedman A., Scotto K., Fuks Z. et Kolesnick R. (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82**(3):405-414.

- Boyd A.S., Stasko T., King L.E., Jr., Cameron G.S., Pearse A.D. et Gaskell S.A. (1999) Cigarette smoking-associated elastotic changes in the skin. *J Am Acad Dermatol* **41**(1):23-26.
- Brassart B., Fuchs P., Huet E., Alix A.J., Wallach J., Tamburro A.M., Delacoux F., Haye B., Emonard H., Hornebeck W. et Debelle L. (2001) Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* **276**(7):5222-5227.
- Brazil D.P., Park J. et Hemmings B.A. (2002) PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* **111**(3):293-303.
- Bree R.T., Stenson-Cox C., Grealy M., Byrnes L., Gorman A.M. et Samali A. (2002) Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology* **3**(4):195-206.
- Bressan G.M., Daga-Gordini D., Colombatti A., Castellani I., Marigo V. et Volpin D. (1993) Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J Cell Biol* **121**(1):201-212.
- Brown-Augsburger P., Broekelmann T., Rosenbloom J. et Mecham R.P. (1996) Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. *Biochem J* **318** (Pt 1):149-155.
- Brown-Augsburger P., Tisdale C., Broekelmann T., Sloan C. et Mecham R.P. (1995) Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. *J Biol Chem* **270**(30):17778-17783.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J. et Greenberg M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**(6):857-868.
- Callahan J.W. (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**(2-3):85-103.
- Canman C.E. et Kastan M.B. (1995) Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes. *Semin Cancer Biol* **6**(1):17-25.
- Cantley L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**(5573):1655-1657.
- Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. et Reed J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**(5392):1318-1321.
- Carreras I., Rich C.B., Panchenko M.P. et Foster J.A. (2002) Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* **85**(3):592-600.
- Castiglione Morelli M.A., Bisaccia F., Spisani S., De Biasi M., Traniello S. et Tamburro A.M. (1997) Structure-activity relationships for some elastin-derived peptide chemoattractants. *J Pept Res* **49**(6):492-499.

- Catalan R.E., Aragonés M.D., Martínez A.M. et Fernández I. (1996) Involvement of sphingolipids in the endothelin-1 signal transduction mechanism in rat brain. *Neurosci Lett* **220**(2):121-124.
- Chalfant C.E., Kishikawa K., Mumby M.C., Kamibayashi C., Bielawska A. et Hannun Y.A. (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**(29):20313-20317.
- Chang H.Y., Chi J.T., Dudoit S., Bondre C., van de Rijn M., Botstein D. et Brown P.O. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20):12877-12882.
- Chang Y., Abe A. et Shayman J.A. (1995) Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of alpha B-crystallin transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26):12275-12279.
- Chmura S.J., Nodzenski E., Crane M.A., Virudachalam S., Hallahan D.E., Weichselbaum R.R. et Quintans J. (1996) Cross-talk between ceramide and PKC activity in the control of apoptosis in WEHI-231. *Adv Exp Med Biol* **406**:39-55.
- Chong H., Vikis H.G. et Guan K.L. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* **15**(5):463-469.
- Ciacchi-Zanella J.R., Merrill A.H., Jr., Wang E. et Jones C. (1998) Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. *Food Chem Toxicol* **36**(9-10):791-804.
- Cifone M.G., De Maria R., Roncaioli P., Rippo M.R., Azuma M., Lanier L.L., Santoni A. et Testi R. (1994) Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* **180**(4):1547-1552.
- Cleary E.G. et Gibson M.A. (1996) Elastic Tissue, Elastin and Elastin Associated Microfibrils. *Extracellular Matrix (Molecular Components and Interactions)* **2**:95-141.
- Cloos P.A. et Christgau S. (2002) Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biol* **21**(1):39-52.
- Cohen G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** (Pt 1):1-16.
- Cowley S., Paterson H., Kemp P. et Marshall C.J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**(6):841-852.
- Cutler R.G. et Mattson M.P. (2001) Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. *Mech Ageing Dev* **122**(9):895-908.
- Cutler R.G., Pedersen W.A., Camandola S., Rothstein J.D. et Mattson M.P. (2002) Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **52**(4):448-457.
- Daniell H.W. (1971) Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet". *Ann Intern Med* **75**(6):873-880.

- Davis E.C. (1994) Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci* **107** (Pt 3):727-736.
- Dbaibo G.S., Pushkareva M.Y., Rachid R.A., Alter N., Smyth M.J., Obeid L.M. et Hannun Y.A. (1998) p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J Clin Invest* **102**(2):329-339.
- Debelle L., Alix A.J., Wei S.M., Jacob M.P., Huvenne J.P., Berjot M. et Legrand P. (1998) The secondary structure and architecture of human elastin. *Eur J Biochem* **258**(2):533-539.
- Debelle L. et Tamburro A.M. (1999) Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(2):261-272.
- Dhillon A.S. et Kolch W. (2002) Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* **404**(1):3-9.
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20):9363-9367.
- Dobrowsky R.T. et Hannun Y.A. (1992) Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* **267**(8):5048-5051.
- Doliana R., Mongiat M., Bucciotti F., Giacomello E., Deutzmann R., Volpin D., Bressan G.M. et Colombatti A. (1999) EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. *J Biol Chem* **274**(24):16773-16781.
- Downing A.K., Knott V., Werner J.M., Cardy C.M., Campbell I.D. et Handford P.A. (1996) Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell* **85**(4):597-605.
- Duca L., Blanchevoye C., Cantarelli B., Ghoneim C., Dedieu S., Delacoux F., Hornebeck W., Hinek A., Martiny L. et Debelle L. (2007) The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *J Biol Chem* **282**(17):12484-12491.
- Duca L., Debelle L., Debret R., Antonicelli F., Hornebeck W. et Haye B. (2002) The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett* **524**(1-3):193-198.
- Duca L., Lambert E., Debret R., Rothhut B., Blanchevoye C., Delacoux F., Hornebeck W., Martiny L. et Debelle L. (2005) Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol Pharmacol* **67**(4):1315-1324.
- Ekoff M., Kaufmann T., Engstrom M., Motoyama N., Villunger A., Jonsson J.I., Strasser A. et Nilsson G. (2007) The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells. *Blood* **110**(9):3209-3217.
- El Bawab S., Roddy P., Qian T., Bielawska A., Lemasters J.J. et Hannun Y.A. (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* **275**(28):21508-21513.

- Ernster V.L., Grady D., Miike R., Black D., Selby J. et Kerlikowske K. (1995) Facial wrinkling in men and women, by smoking status. *Am J Public Health* **85**(1):78-82.
- Fahem A., Robinet A., Cauchard J.H., Duca L., Soula-Rothhut M., Rothhut B., Soria C., Guenounou M., Hornebeck W. et Bellon G. (2008) Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**(8):1581-1596.
- Fantuzzi G. et Dinarello C.A. (1999) Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* **19**(1):1-11.
- Faury G., Garnier S., Weiss A.S., Wallach J., Fulop T., Jr., Jacob M.P., Mecham R.P., Robert L. et Verdetti 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**(3):328-336.
- Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A. et Trzaskos J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**(29):18623-18632.
- Fazio M.J., Mattei M.G., Passage E., Chu M.L., Black D., Solomon E., Davidson J.M. et Uitto J. (1991) Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* **48**(4):696-703.
- Frances C. (1998) Smoker's wrinkles: epidemiological and pathogenic considerations. *Clin Dermatol* **16**(5):565-570.
- Frech M., Andjelkovic M., Ingley E., Reddy K.K., Falck J.R. et Hemmings B.A. (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* **272**(13):8474-8481.
- Fuchs P., Debelle L. et Alix A.J.P. (2001) Structural study of some specific elastin hexapeptides activating MMP-1. *J Mol Struct* **565-566**:335-339.
- Fulop T., Jr., Jacob M.P., Varga Z., Foris G., Leovey A. et Robert L. (1986) Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca²⁺ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **141**(1):92-98.
- Galis Z.S. et Khatri J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* **90**(3):251-262.
- Galjart N.J., Gillemans N., Meijer D. et d'Azzo A. (1990) Mouse "protective protein". cDNA cloning, sequence comparison, and expression. *J Biol Chem* **265**(8):4678-4684.
- Garcia-Ruiz C., Colell A., Mari M., Morales A. et Fernandez-Checa J.C. (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* **272**(17):11369-11377.
- Garcia-Ruiz C., Colell A., Paris R. et Fernandez-Checa J.C. (2000) Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial

- permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J* **14**(7):847-858.
- Gatt S. (1966) Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem* **241**(16):3724-3730.
- Ghuysen-Itard A.F., Robert L. et Jacob M.P. (1992) [Effect of elastin peptides on cell proliferation]. *C R Acad Sci III* **315**(12):473-478.
- Gibson M.A., Kumaratilake J.S. et Cleary E.G. (1989) The protein components of the 12-nanometer microfibrils of elastic and nonelastic tissues. *J Biol Chem* **264**(8):4590-4598.
- Gibson M.A., Leavesley D.I. et Ashman L.K. (1999) Microfibril-associated glycoprotein-2 specifically interacts with a range of bovine and human cell types via alphaVbeta3 integrin. *J Biol Chem* **274**(19):13060-13065.
- Gomez-Munoz A. (1998) Modulation of cell signalling by ceramides. *Biochim Biophys Acta* **1391**(1):92-109.
- Gong H.C., Honjo Y., Nangia-Makker P., Hogan V., Mazurak N., Bresalier R.S. et Raz A. (1999) The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res* **59**(24):6239-6245.
- Goni F.M. et Alonso A. (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog Lipid Res* **38**(1):1-48.
- Grady D. et Ernster V. (1992) Does cigarette smoking make you ugly and old? *Am J Epidemiol* **135**(8):839-842.
- Greider C.W. (1990) Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* **12**(8):363-369.
- Greider C.W. et Blackburn E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1):405-413.
- Grosso L.E. et 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**(2):401-404.
- Grosso L.E. et Scott M. (1993b) PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine tropoelastin, is a ligand for the 67-kDa bovine elastin receptor. *Matrix* **13**(2):157-164.
- Hance K.A., Tataria M., Ziporin S.J., Lee J.K. et Thompson R.W. (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**(2):254-261.
- Hannun Y.A. (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* **269**(5):3125-3128.
- Hannun Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**(5294):1855-1859.

- Hannun Y.A. et Luberto C. (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* **10**(2):73-80.
- Hanssen E., Hew F.H., Moore E. et Gibson M.A. (2004) MAGP-2 has multiple binding regions on fibrillins and has covalent periodic association with fibrillin-containing microfibrils. *J Biol Chem* **279**(28):29185-29194.
- Harley C.B., Futcher A.B. et Greider C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274):458-460.
- Hauck M., Seres I., Kiss I., Saulnier J., Mohacsi A., Wallach J. et Fulop T., Jr. (1995) Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes. *Biochem Mol Biol Int* **37**(1):45-55.
- Hayflick L. et Moorhead P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**:585-621.
- Heinrich M., Wickel M., Schneider-Brachert W., Sandberg C., Gahr J., Schwandner R., Weber T., Saftig P., Peters C., Brunner J., Kronke M. et Schutze S. (1999) Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J* **18**(19):5252-5263.
- Heller R.A. et Kronke M. (1994) Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* **126**(1):5-9.
- Henderson M., Polewski R., Fanning J.C. et Gibson M.A. (1996) Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique. *J Histochem Cytochem* **44**(12):1389-1397.
- Hew Y., Grzelczak Z., Lau C. et Keeley F.W. (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**(20):14415-14421.
- Hinek A., Pshezhetsky A.V., von Itzstein M. et Starcher B. (2006) Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly. *J Biol Chem* **281**(6):3698-3710.
- Hinek A. et Rabinovitch M. (1994) 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol* **126**(2):563-574.
- Hinek A., Wrenn D.S., Mecham R.P. et Barondes S.H. (1988) The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science* **239**(4847):1539-1541.
- Hirabayashi J., Hashidate T., Arata Y., Nishi N., Nakamura T., Hirashima M., Urashima T., Oka T., Futai M., Muller W.E., Yagi F. et Kasai K. (2002) Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* **1572**(2-3):232-254.
- Hirano E., Fujimoto N., Tajima S., Akiyama M., Ishibashi A., Kobayashi R. et Okamoto K. (2002) Expression of 36-kDa microfibril-associated glycoprotein (MAGP-36) in human keratinocytes and its localization in skin. *J Dermatol Sci* **28**(1):60-67.

- Hocking A.M., Shinomura T. et McQuillan D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* **17**(1):1-19.
- Hofmann K., Bucher P. et Tschopp J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**(5):155-156.
- Hornebeck W., Emonard H., Monboisse J.C. et Bellon G. (2002) Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* **12**(3):231-241.
- Horrigan S.K., Rich C.B., Streeten B.W., Li Z.Y. et Foster J.A. (1992) Characterization of an associated microfibril protein through recombinant DNA techniques. *J Biol Chem* **267**(14):10087-10095.
- Houslay M.D. et Kolch W. (2000) Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* **58**(4):659-668.
- Huet E., Brassart B., Cauchard J.H., Debelle L., Birembaut P., Wallach J., Emonard H., Polette M. et Hornebeck W. (2002) Cumulative influence of elastin peptides and plasminogen on matrix metalloproteinase activation and type I collagen invasion by HT-1080 fibrosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* **19**(2):107-117.
- Hughes R.C. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1473**(1):172-185.
- Hunninghake G.W., Davidson J.M., Rennard S., Szapiel S., Gadek J.E. et Crystal R.G. (1981) Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science* **212**(4497):925-927.
- Igarashi J., Thatté H.S., Prabhakar P., Golan D.E. et Michel T. (1999) Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22):12583-12588.
- Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Sheppard P., Anderson N., Rosenbloom J.C., Peltonen L. et Rosenbloom J. (1987) Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(16):5680-5684.
- Iozzo R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**:609-652.
- Jacob M.P. (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* **57**(5-6):195-202.
- Jacob M.P., Fulop T., Jr., Foris G. et 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**(4):995-999.
- Jacob M.P. et Hornebeck W. (1985) Isolation and characterization of insoluble and kappa-elastins. *Front Matrix Biol* **10**:92-129.

- Jaffrezou J.P., Chen G., Duran G.E., Muller C., Bordier C., Laurent G., Sikic B.I. et Levade T. (1995) Inhibition of lysosomal acid sphingomyelinase by agents which reverse multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1266**(1):1-8.
- Jayadev S., Linardic C.M. et Hannun Y.A. (1994) Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* **269**(8):5757-5763.
- Jayadev S., Liu B., Bielawska A.E., Lee J.Y., Nazaire F., Pushkareva M., Obeid L.M. et Hannun Y.A. (1995) Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* **270**(5):2047-2052.
- Jensen S.A., Reinhardt D.P., Gibson M.A. et Weiss A.S. (2001) Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem* **276**(43):39661-39666.
- Kadunce D.P., Burr R., Gress R., Kanner R., Lyon J.L. et Zone J.J. (1991) Cigarette smoking: risk factor for premature facial wrinkling. *Ann Intern Med* **114**(10):840-844.
- Kagan H.M. et Sullivan K.A. (1982) Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. *Methods Enzymol* **82 Pt A**:637-650.
- Kahari V.M., Chen Y.Q., Bashir M.M., Rosenbloom J. et Uitto J. (1992) 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**(36):26134-26141.
- Kamisato S., Uemura Y., Takami N. et Okamoto K. (1997) Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis. *J Biochem* **121**(5):862-867.
- Kamoun A., Landeau J.M., Godeau G., Wallach J., Duchesnay A., Pellat B. et Hornebeck W. (1995) Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun* **3**(4):273-281.
- Karasawa K., Qiu X. et Lee T. (1999) Purification and characterization from rat kidney membranes of a novel platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase that catalyzes the hydrolysis of PAF, formation of PAF analogs, and C2-ceramide. *J Biol Chem* **274**(13):8655-8661.
- Kielty C.M., Sherratt M.J. et Shuttleworth C.A. (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* **115**(Pt 14):2817-2828.
- Kielty C.M. et Shuttleworth C.A. (1993) Synthesis and assembly of fibrillin by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**:167-173.
- Kielty C.M. et Shuttleworth C.A. (1997) Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech* **38**(4):413-427.
- Kielty C.M., Whittaker S.P. et Shuttleworth C.A. (1996) Fibrillin: evidence that chondroitin sulphate proteoglycans are components of microfibrils and associate with newly synthesised monomers. *FEBS Lett* **386**(2-3):169-173.
- Kiess W. et Gallaher B. (1998) Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* **138**(5):482-491.

- Kim M.Y., Linardic C., Obeid L. et Hannun Y. (1991) Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* **266**(1):484-489.
- King W.G., Mattaliano M.D., Chan T.O., Tschlis P.N. et Brugge J.S. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* **17**(8):4406-4418.
- Kolesnick R.N., Goni F.M. et Alonso A. (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* **184**(3):285-300.
- Kostka G., Giltay R., Bloch W., Addicks K., Timpl R., Fassler R. et Chu M.L. (2001) Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Mol Cell Biol* **21**(20):7025-7034.
- Kronke M. (1999) Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes. *Chem Phys Lipids* **101**(1):109-121.
- Kuby J. (1997) *Immunology* 3rd Edition. W.H. Freeman and company, New York.
- Kucich U., Rosenbloom J.C., Abrams W.R. et 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**(2):183-188.
- Kundra V., Escobedo J.A., Kazlauskas A., Kim H.K., Rhee S.G., Williams L.T. et Zetter B.R. (1994) Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature* **367**(6462):474-476.
- Lahmann C., Bergemann J., Harrison G. et Young A.R. (2001) Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* **357**(9260):935-936.
- Lakhani S.A., Masud A., Kuida K., Porter G.A., Jr., Booth C.J., Mehal W.Z., Inayat I. et Flavell R.A. (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* **311**(5762):847-851.
- Lee J.Y., Bielawska A.E. et Obeid L.M. (2000) Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp Cell Res* **261**(2):303-311.
- Lee T. (1996) Acetylation of sphingosine by PAF-dependent transacetylase. *Adv Exp Med Biol* **416**:113-119.
- Lee T.C., Ou M.C., Shinozaki K., Malone B. et Snyder F. (1996) Biosynthesis of N-acetylsphingosine by platelet-activating factor: sphingosine CoA-independent transacetylase in HL-60 cells. *J Biol Chem* **271**(1):209-217.
- Letai A. (2006) Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Mol Cell* **21**(6):728-730.
- Liebler D.C., Kling D.S. et Reed D.J. (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem* **261**(26):12114-12119.

- Lightle S.A., Oakley J.I. et Nikolova-Karakashian M.N. (2000) Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. *Mech Ageing Dev* **120**(1-3):111-125.
- Liu B. et Hannun Y.A. (1997) Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* **272**(26):16281-16287.
- Liu F.T., Patterson R.J. et Wang J.L. (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* **1572**(2-3):263-273.
- Long M.M., King V.J., Prasad K.U., Freeman B.A. et Urry D.W. (1989) Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* **140**(3):512-518.
- Long M.M., King V.J., Prasad K.U. et Urry D.W. (1988) Chemotaxis of fibroblasts toward nonapeptide of elastin. *Biochim Biophys Acta* **968**(3):300-311.
- Lotan R., Ito H., Yasui W., Yokozaki H., Lotan D. et Tahara E. (1994) Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. *Int J Cancer* **56**(4):474-480.
- Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A. et Kroemer G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9):741-752.
- Mandon E.C., Ehses I., Rother J., van Echten G. et Sandhoff K. (1992) Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* **267**(16):11144-11148.
- Maquart F.X., Bellon G., Pasco S. et Monboisse J.C. (2005) Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* **87**(3-4):353-360.
- Mas V.M., Hernandez H., Plo I., Bezombes C., Maestre N., Quillet-Mary A., Filomenko R., Demur C., Jaffrezou J.P. et Laurent G. (2003) Protein kinase Czeta mediated Raf-1/extracellular-regulated kinase activation by daunorubicin. *Blood* **101**(4):1543-1550.
- Mason C.S., Springer C.J., Cooper R.G., Superti-Furga G., Marshall C.J. et Marais R. (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* **18**(8):2137-2148.
- Mathias S., Pena L.A. et Kolesnick R.N. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* **335** (Pt 3):465-480.
- Mathias S., Younes A., Kan C.C., Orlow I., Joseph C. et Kolesnick R.N. (1993) Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science* **259**(5094):519-522.
- Mauviel A., Chen Y.Q., Kahari V.M., Ledo I., Wu M., Rudnicka L. et 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**(9):6520-6524.

- Mecham R.P., Hinek A., Griffin G.L., Senior R.M. et Liotta L.A. (1989) The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem* **264**(28):16652-16657.
- Mercer K.E. et Pritchard C.A. (2003) Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* **1653**(1):25-40.
- Michel J.B. (2003) Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(12):2146-2154.
- Mithieux S.M. et Weiss A.S. (2005) Elastin. *Adv Protein Chem* **70**:437-461.
- Mochizuki S., Brassart B. et Hinek A. (2002) Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**(47):44854-44863.
- Morreau H., Galjart N.J., Gillemans N., Willemsen R., van der Horst G.T. et 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**(34):20655-20663.
- Mouton R.E. et Venable M.E. (2000) Ceramide induces expression of the senescence histochemical marker, beta-galactosidase, in human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* **113**(3):169-181.
- Moutsatsos I.K., Wade M., Schindler M. et Wang J.L. (1987) Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(18):6452-6456.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. et Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:263-273.
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E. et Dixit V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**(6):817-827.
- Nagase T., Nakayama M., Nakajima D., Kikuno R. et Ohara O. (2001) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* **8**(2):85-95.
- Nakamura T., Lozano P.R., Ikeda Y., Iwanaga Y., Hinek A., Minamisawa S., Cheng C.F., Kobuke K., Dalton N., Takada Y., Tashiro K., Ross Jr J., Honjo T. et Chien K.R. (2002) Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* **415**(6868):171-175.
- Narimatsu S., Soeda S., Tanaka T. et Kishimoto Y. (1986) Solubilization and partial characterization of fatty acyl-CoA: sphingosine acyltransferase (ceramide synthetase) from rat liver and brain. *Biochim Biophys Acta* **877**(3):334-341.
- Nickels J.T. et Broach J.R. (1996) A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**(4):382-394.

- Ning Y., Xu J.F., Li Y., Chavez L., Riethman H.C., Lansdorp P.M. et Weng N.P. (2003) Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts. *Hum Mol Genet* **12**(11):1329-1336.
- Nobes C.D. et Tolkovsky A.M. (1995) Neutralizing anti-p21ras Fabs suppress rat sympathetic neuron survival induced by NGF, LIF, CNTF and cAMP. *Eur J Neurosci* **7**(2):344-350.
- Ntayi C., Labrousse A.L., Debret R., Birembaut P., Bellon G., Antonicelli F., Hornebeck W. et Bernard P. (2004) Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* **122**(2):256-265.
- Ochieng J., Warfield P., Green-Jarvis B. et Fentie I. (1999) Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem* **75**(3):505-514.
- Ogretmen B., Kravaka J.M., Schady D., Usta J., Hannun Y.A. et Obeid L.M. (2001a) Molecular mechanisms of ceramide-mediated telomerase inhibition in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J Biol Chem* **276**(35):32506-32514.
- Ogretmen B., Schady D., Usta J., Wood R., Kravaka J.M., Luberto C., Birbes H., Hannun Y.A. et Obeid L.M. (2001b) Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* **276**(27):24901-24910.
- Okamura-Oho Y., Zhang S., Callahan J.W., Murata M., Oshima A. et Suzuki Y. (1997) Maturation and degradation of beta-galactosidase in the post-Golgi compartment are regulated by cathepsin B and a non-cysteine protease. *FEBS Lett* **419**(2-3):231-234.
- Omerovic J., Laude A.J. et Prior I.A. (2007) Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* **64**(19-20):2575-2589.
- Omerovic J. et Prior I.A. (2009) Compartmentalized signalling: Ras proteins and signalling nanoclusters. *FEBS J* **276**(7):1817-1825.
- Ooyama T., Fukuda K., Oda H., Nakamura H. et Hikita Y. (1987) Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. *Arteriosclerosis* **7**(6):593-598.
- Overbeck A.F., Brtva T.R., Cox A.D., Graham S.M., Huff S.Y., Khosravi-Far R., Quilliam L.A., Soltski P.A. et Der C.J. (1995) Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev* **42**(4):468-476.
- Pages G., Lenormand P., L'Allemain G., Chambard J.C., Meloche S. et Pouyssegur J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18):8319-8323.
- Pardo A. et Selman M. (1999) Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: the role of metalloproteinases in lung damage. *Histol Histopathol* **14**(1):227-233.
- Parks W.C. et Deak S.B. (1990) Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**(5):399-406.
- Parrizas M., Saltiel A.R. et LeRoith D. (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* **272**(1):154-161.

- Partridge S.M., Davis H.F. et Adair G.S. (1955) The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J* **61**(1):11-21.
- Partridge S.M., Elsdon D.F., Thomas J., Dorfman A., Telser A. et Ho P.L. (1964) Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem J* **93**(3):30C-33C.
- Pasquali-Ronchetti I. et Baccarani-Contri M. (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* **38**(4):428-435.
- Pereira L., Andrikopoulos K., Tian J., Lee S.Y., Keene D.R., Ono R., Reinhardt D.P., Sakai L.Y., Biery N.J., Bunton T., Dietz H.C. et Ramirez F. (1997) Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet* **17**(2):218-222.
- Perry D.K. et Hannun Y.A. (1998) The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta* **1436**(1-2):233-243.
- Petersen E., Wagberg F. et Angquist K.A. (2002) Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **24**(5):440-444.
- Pewzner-Jung Y., Ben-Dor S. et Futerman A.H. (2006) When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* **281**(35):25001-25005.
- Pierce R.A., Mariencheck W.I., Sandefur S., Crouch E.C. et Parks W.C. (1995) Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am J Physiol* **268**(3 Pt 1):L491-500.
- Piontkivska H., Zhang Y., Green E.D. et Elnitski L. (2004) Multi-species sequence comparison reveals dynamic evolution of the elastin gene that has involved purifying selection and lineage-specific insertions/deletions. *BMC Genomics* **5**(1):31.
- Pocza P., Suli-Vargha H., Darvas Z. et Falus A. (2008) Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer* **122**(9):1972-1980.
- Popa I. et Portoukalian J. (2003) [Relationship between lipids and cutaneous immunity: example of the gangliosides]. *Pathol Biol (Paris)* **51**(5):253-255.
- Privitera S., Prody C.A., Callahan J.W. et 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**(11):6319-6326.
- Quintans J., Kilkus J., McShan C.L., Gottschalk A.R. et Dawson G. (1994) Ceramide mediates the apoptotic response of WEHI 231 cells to anti-immunoglobulin, corticosteroids and irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* **202**(2):710-714.
- Rabinovich G.A., Baum L.G., Tinari N., Paganelli R., Natoli C., Liu F.T. et Iacobelli S. (2002) Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* **23**(6):313-320.

- Raghunath M., Putnam E.A., Ritty T., Hamstra D., Park E.S., Tschodrich-Rotter M., Peters R., Rehemtulla A. et Milewicz D.M. (1999) Carboxy-terminal conversion of profibrillin to fibrillin at a basic site by PACE/furin-like activity required for incorporation in the matrix. *J Cell Sci* **112** (Pt 7):1093-1100.
- Ramos J.W. (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12):2707-2719.
- Reinhardt D.P., Ono R.N., Notbohm H., Muller P.K., Bachinger H.P. et Sakai L.Y. (2000) Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome. *J Biol Chem* **275**(16):12339-12345.
- Reitamo S., Remitz A., Tamai K., Ledo I. et Uitto J. (1994) Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *Biochem J* **302** (Pt 2):331-333.
- Reyes J.G., Robayna I.G., Delgado P.S., Gonzalez I.H., Aguiar J.Q., Rosas F.E., Fanjul L.F. et Galarreta C.M. (1996) c-Jun is a downstream target for ceramide-activated protein phosphatase in A431 cells. *J Biol Chem* **271**(35):21375-21380.
- Rich C.B., Fontanilla M.R., Nugent M. et Foster J.A. (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**(47):33433-33439.
- Ritty T.M., Broekelmann T., Tisdale C., Milewicz D.M. et Mecham R.P. (1999) Processing of the fibrillin-1 carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* **274**(13):8933-8940.
- Robinet A., Millart H., Oszust F., Hornebeck W. et Bellon G. (2007) Binding of elastin peptides to S-Gal protects the heart against ischemia/reperfusion injury by triggering the RISK pathway. *FASEB J* **21**(9):1968-1978.
- Rodgers U.R. et Weiss A.S. (2004) Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie* **86**(3):173-178.
- Rosario R., Mark G.J., Parrish J.A. et Mihm M.C., Jr. (1979) Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UV-A, UV-B, UV-C and UV-A with psoralens. *Br J Dermatol* **101**(3):299-308.
- Rother J., van Echten G., Schwarzmann G. et Sandhoff K. (1992) Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* **189**(1):14-20.
- Rotonda J., Nicholson D.W., Fazil K.M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., Peterson E.P., Rasper D.M., Ruel R., Vaillancourt J.P., Thornberry N.A. et Becker J.W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* **3**(7):619-625.
- Rucker R.B. et Tinker D. (1977) Structure and metabolism of arterial elastin. *Int Rev Exp Pathol* **17**:1-47.

- Ruvolo P.P., Deng X., Carr B.K. et May W.S. (1998) A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **273**(39):25436-25442.
- Ruvolo P.P., Deng X., Ito T., Carr B.K. et May W.S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* **274**(29):20296-20300.
- Saarialho-Kere U., Kerkela E., Jeskanen L., Hasan T., Pierce R., Starcher B., Raudasoja R., Ranki A., Oikarinen A. et Vaalamo M. (1999) Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage. *J Invest Dermatol* **113**(4):664-672.
- Salinas M., Lopez-Valdaliso R., Martin D., Alvarez A. et Cuadrado A. (2000) Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci* **15**(2):156-169.
- Sawai H., Okazaki T., Takeda Y., Tashima M., Sawada H., Okuma M., Kishi S., Umehara H. et Domae N. (1997) Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *J Biol Chem* **272**(4):2452-2458.
- Scheuer K., Stoll S., Paschke U., Weigel R. et Muller W.E. (1995) N-methyl-D-aspartate receptor density and membrane fluidity as possible determinants of the decline of passive avoidance performance in aging. *Pharmacol Biochem Behav* **50**(1):65-70.
- Segade F., Broekelmann T.J., Pierce R.A. et Mecham R.P. (2000) Revised genomic structure of the human MAGP1 gene and identification of alternate transcripts in human and mouse tissues. *Matrix Biol* **19**(7):671-682.
- Segade F., Trask B.C., Broekelmann T.J., Pierce R.A. et Mecham R.P. (2002) Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms. *J Biol Chem* **277**(13):11050-11057.
- Senior R.M., Griffin G.L. et Mecham R.P. (1980) Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* **66**(4):859-862.
- Senior R.M., Griffin G.L., Mecham R.P., Wrenn D.S., Prasad K.U. et Urry D.W. (1984) Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol* **99**(3):870-874.
- Senior R.M., Hinek A., Griffin G.L., Pipoly D.J., Crouch E.C. et Mecham R.P. (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**(6):479-487.
- Seyrantepe V., Poupetova H., Froissart R., Zobot M.T., Maire I. et Pshezhetsky A.V. (2003) Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis. *Hum Mutat* **22**(5):343-352.
- Sharpless N.E. et DePinho R.A. (2002) p53: good cop/bad cop. *Cell* **110**(1):9-12.
- Simian M., Hirai Y., Navre M., Werb Z., Lochter A. et Bissell M.J. (2001) The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* **128**(16):3117-3131.

- Simon C.G., Jr. et Gear A.R. (1998) Membrane-destabilizing properties of C2-ceramide may be responsible for its ability to inhibit platelet aggregation. *Biochemistry* **37**(7):2059-2069.
- Simon C.G., Jr., Holloway P.W. et Gear A.R. (1999) Exchange of C(16)-ceramide between phospholipid vesicles. *Biochemistry* **38**(44):14676-14682.
- Sinha S., Nevett C., Shuttleworth C.A. et Kielty C.M. (1998) Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix Biol* **17**(8-9):529-545.
- Skurk C., Maatz H., Kim H.S., Yang J., Abid M.R., Aird W.C. et Walsh K. (2004) The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem* **279**(2):1513-1525.
- Smith J.B. et Fenske N.A. (1996) Cutaneous manifestations and consequences of smoking. *J Am Acad Dermatol* **34**(5 Pt 1):717-732; quiz 733-714.
- Smith L.D., Hickman E.S., Parry R.V., Westwick J. et Ward S.G. (2007) PI3Kgamma is the dominant isoform involved in migratory responses of human T lymphocytes: effects of ex vivo maintenance and limitations of non-viral delivery of siRNA. *Cell Signal* **19**(12):2528-2539.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. et Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**(1):76-85.
- Sohal R.S. et Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**(5271):59-63.
- Stoffel W. et Henning R. (1968) Studies on the metabolism of (1-3H)erythro-DL-sphingosine (1-3H)4t-sphingenine) during the myelination period of the rat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **349**(10):1400-1404.
- Strum J.C., Swenson K.I., Turner J.E. et Bell R.M. (1995) Ceramide triggers meiotic cell cycle progression in *Xenopus* oocytes. A potential mediator of progesterone-induced maturation. *J Biol Chem* **270**(22):13541-13547.
- Swee M.H., Parks W.C. et Pierce R.A. (1995) Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *J Biol Chem* **270**(25):14899-14906.
- Szabo Z., Levi-Minzi S.A., Christiano A.M., Struminger C., Stoneking M., Batzer M.A. et Boyd C.D. (1999) Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution. *J Mol Evol* **49**(5):664-671.
- Tajima S., Wachi H., Uemura Y. et Okamoto K. (1997) Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **289**(8):489-492.
- Takeda H., Matozaki T., Takada T., Noguchi T., Yamao T., Tsuda M., Ochi F., Fukunaga K., Inagaki K. et 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**(2):386-395.
- Takenaka Y., Fukumori T. et Raz A. (2004) Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* **19**(7-9):543-549.
- Tamburro A.M., Guantieri V., Daga-Gordini D. et Abatangelo G. (1977) Conformational transitions of alpha-elastin. *Biochim Biophys Acta* **492**(2):370-376.
- Tang D., Wu D., Hirao A., Lahti J.M., Liu L., Mazza B., Kidd V.J., Mak T.W. et Ingram A.J. (2002) ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* **277**(15):12710-12717.
- Tarin D. et Croft C.B. (1969) Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *J Anat* **105**(Pt 1):189-190.
- Terman A., Gustafsson B. et Brunk U.T. (2007) Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* **211**(2):134-143.
- Tettamanti G., Prinetti A., Bassi R., Viani P., Giussani P. et Riboni L. (1996) Sphingoid bioregulators in the differentiation of cells of neural origin. *J Lipid Mediat Cell Signal* **14**(1-3):263-275.
- Tiedemann K., Batge B., Muller P.K. et Reinhardt D.P. (2001) Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J Biol Chem* **276**(38):36035-36042.
- Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C. et Brown R.A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5):349-363.
- Trask B.C., Trask T.M., Broekelmann T. et Mecham R.P. (2000a) The microfibrillar proteins MAGP-1 and fibrillin-1 form a ternary complex with the chondroitin sulfate proteoglycan decorin. *Mol Biol Cell* **11**(5):1499-1507.
- Trask T.M., Ritty T.M., Broekelmann T., Tisdale C. et Mecham R.P. (1999) N-terminal domains of fibrillin 1 and fibrillin 2 direct the formation of homodimers: a possible first step in microfibril assembly. *Biochem J* **340** (Pt 3):693-701.
- Trask T.M., Trask B.C., Ritty T.M., Abrams W.R., Rosenbloom J. et Mecham R.P. (2000b) Interaction of tropoelastin with the amino-terminal domains of fibrillin-1 and fibrillin-2 suggests a role for the fibrillins in elastic fiber assembly. *J Biol Chem* **275**(32):24400-24406.
- Tresini M., Lorenzini A., Torres C. et Cristofalo V.J. (2007) Modulation of replicative senescence of diploid human cells by nuclear ERK signaling. *J Biol Chem* **282**(6):4136-4151.
- Tsugane K., Tamiya-Koizumi K., Nagino M., Nimura Y. et Yoshida S. (1999) A possible role of nuclear ceramide and sphingosine in hepatocyte apoptosis in rat liver. *J Hepatol* **31**(1):8-17.
- Turinsky J., Bayly B.P. et O'Sullivan D.M. (1991) 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in rat liver and skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* **261**(5 Pt 1):E620-627.

- Uemura Y. et 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**(6):1085-1092.
- Uitto J., Christiano A.M., Kahari V.M., Bashir M.M. et Rosenbloom J. (1991) Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochem Soc Trans* **19**(4):824-829.
- Uitto J., Fazio M.J. et Olsen D.R. (1989) Molecular mechanisms of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis. *J Am Acad Dermatol* **21**(3 Pt 2):614-622.
- van Blitterswijk W.J. (1998) Hypothesis: ceramide conditionally activates atypical protein kinases C, Raf-1 and KSR through binding to their cysteine-rich domains. *Biochem J* **331** (Pt 2):679-680.
- Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J. et Waterfield M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**:535-602.
- Varga Z., Jacob M.P., Robert L., Csongor J. et Fulop T., Jr. (1997) Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis. *Exp Gerontol* **32**(6):653-662.
- Venable M.E., Lee J.Y., Smyth M.J., Bielawska A. et Obeid L.M. (1995) Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* **270**(51):30701-30708.
- Vicente-Manzanares M., Choi C.K. et Horwitz A.R. (2009) Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* **122**(Pt 2):199-206.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y. et Brown R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**(7):5241-5248.
- Vrhovski B. et Weiss A.S. (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**(1):1-18.
- Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferez C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D. et et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**(2):343-352.
- Wallis D.D., Putnam E.A., Cretoiu J.S., Carmical S.G., Cao S.N., Thomas G. et Milewicz D.M. (2003) Profibrillin-1 maturation by human dermal fibroblasts: proteolytic processing and molecular chaperones. *J Cell Biochem* **90**(3):641-652.
- Watts A. (1993) Protein-Lipid Interactions. *New York: Elsevier Science*.
- Weinmann M., Jendrossek V., Handrick R., Guner D., Goecke B. et Belka C. (2004) Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner. *Oncogene* **23**(21):3757-3769.
- Wertz P.W. et Downing D.T. (1983) Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* **24**(6):759-765.

- Whiteman P. et Handford P.A. (2003) Defective secretion of recombinant fragments of fibrillin-1: implications of protein misfolding for the pathogenesis of Marfan syndrome and related disorders. *Hum Mol Genet* **12**(7):727-737.
- Williams R.D., Wang E. et Merrill A.H., Jr. (1984) Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **228**(1):282-291.
- Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A. et al. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**(6487):270-275.
- Wolff R.A., Dobrowsky R.T., Bielawska A., Obeid L.M. et Hannun Y.A. (1994) Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **269**(30):19605-19609.
- Wolfman A. (2001) Ras isoform-specific signaling: location, location, location. *Sci STKE* **2001**(96):PE2.
- Wright S.C., Zheng H. et Zhong J. (1996) Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). *FASEB J* **10**(2):325-332.
- Wymann M.P. et Pirola L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* **1436**(1-2):127-150.
- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J. et Greenberg M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**(5240):1326-1331.
- Xu X.C., el-Naggar A.K. et Lotan R. (1995) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* **147**(3):815-822.
- Yin L., Morita A. et Tsuji T. (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch Dermatol Res* **292**(4):188-194.
- You H., Pellegrini M., Tsuchihara K., Yamamoto K., Hacker G., Erlacher M., Villunger A. et Mak T.W. (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* **203**(7):1657-1663.
- Young A.R., Potten C.S., Nikaido O., Parsons P.G., Boenders J., Ramsden J.M. et Chadwick C.A. (1998) Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers. *J Invest Dermatol* **111**(6):936-940.
- Zeisberg M., Strutz F. et Muller G.A. (2000) Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* **13 Suppl 3**:S111-120.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. et Korsmeyer S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**(4):619-628.
- Zhang J.H. et Xu M. (2000) DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* **10**(3):205-211.

Zhang M., Pierce R.A., Wachi H., Mecham R.P. et Parks W.C. (1999) An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* **19**(11):7314-7326.

Zimmermann D.R., Dours-Zimmermann M.T., Schubert M. et Bruckner-Tuderman L. (1994) Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* **124**(5):817-825.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. et Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**(3):405-413.

*Publications et
Communications*

Publications et communications

Publications internationales dans des revues à comité de lecture

“Elastin peptides antagonize ceramide-induced apoptosis”

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, S. Poitevin, L. Martiny et L. Debelle.

FEBS Lett., 2009. *Sous presse.*

“The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 sub-unit”

L. Duca, C. Blanchevoye, **B. Cantarelli**, C. Ghoneim, S. Dedieu, F. Delacoux, W. Hornebeck, A. Hinek, L. Martiny et L. Debelle

The Journal of Biological Chemistry Vol.282, n°17, pp. 12484-12491 April 27, 2007

“Elastin-derived peptides enhance melanoma progression in vivo by upregulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase”

J. Devy, L. Duca, **B. Cantarelli**, L. Parent, J. Thevenard, L. Ramont, S. Pasco Brassart, J.-C. Monboisse, M. Tarpin, L. Martiny et L. Debelle

Article soumis à *the British Journal of Cancer*

Communications orales à des congrès internationaux

L'intervenant ayant présenté la communication est souligné.

“Elastin peptides promote cell survival by counterbalancing ceramide-induced apoptosis.”

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny, L. Debelle

IVth European Meeting on Elastin ELASTIN 2006, Lyon, France, 9-12 juillet 2006.

“The Elastin Receptor Complex: Friend or Foe?”

L. Duca, A. Rusciani, C. Blanchevoye, N. Floquet, F. Delacoux, A. Chatron-Colliet, **B. Cantarelli**, H. Sartelet, R. Le Naour, H. Bobichon, D. Ploton, M. Dauchez, L. Martiny et L. Debelle

XXIVème Latinorum Investigorum de Arteriis Colloquium. Reims, France, 8-11 octobre 2008.

"Les peptides dérivés de la dégradation de l'élastine induisent le développement des mélanomes B16F1 in vivo au travers de la production de la collagénase Mcol-A"

L. Duca, **B. Cantarelli**, C. Blanchevoye, J. Devy, F. Delacoux, W. Hornebeck, L. Martiny et L. Debelle.

Eurocancer 2007, Paris, France, 26-28 Juin 2007

Communications orales à des congrès nationaux

L'intervenant ayant présenté la communication est souligné.

"Site de fixation de l'EBP : études structurales et biochimique"

C. Blanchevoye, **B. Cantarelli**, L. Duca, P. Sommer, A. Hinek, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

Journée des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims (SBR), Reims, France, 24 octobre 2007

"Les peptides dérivés de la dégradation de l'élastine induisent le développement des mélanomes B16F1 in vivo au travers de la production de la collagénase Mcol-A."

L. Duca, **B. Cantarelli**, C. Blanchevoye, J. Devy, F. Delacoux, W. Hornebeck, L. Martiny, L. Debelle

XXVIIème Forum de Cancérologie, Paris, France, 26-28 juin 2007.

"Les peptides d'élastine favorisent la survie cellulaire en s'opposant à l'apoptose induite par les C2-céramides"

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

Forum des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, France, 14 juin 2007

"Elastin peptides promote cell survival by counterbalancing ceramide-induced apoptosis"

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

XVIème congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, Caen, France, 21-24 mars 2007.

"Etude préliminaire du mécanisme de fonctionnement du complexe récepteur de l'élastine: Rôles de la neuraminidase du récepteur et des rafts"

L. Duca, **B. Cantarelli**, C. Blanchevoye, F. Delacoux, E. Elias, M.F. O'Donohue, D. Ploton, W. Hornebeck, L. Martiny et L. Debelle.

Journée des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims (SBR), Reims, France, 27 octobre 2004. (1^{er} prix de la SBR)

Communications par voie d'affiche à des congrès internationaux

L'intervenant ayant présenté la communication est souligné.

Effects of elastin peptides on ceramide-induced apoptosis.

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle.

XIXth IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Paris, France, 5-9 juillet 2009.

"Elastin complex receptor: the elastin binding site"

C. Blanchevoye, **B. Cantarelli**, L. Duca, P. Sommer, A. Hinek, F. Delacoux, L. Martiny et L.

Debelle

4th European Meeting on Elastin, Elastin 2006, Lyon, France, 9-12 juillet 2006

"Elastin peptides promote cell survival by counterbalancing ceramide-induced apoptosis"

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

IVth European Meeting on Elastin ELASTIN 2006, Lyon, France, 9-12 juillet 2006.

"Elastin receptor complex: structure binding relationship"

C. Blanchevoye, L. Duca, **B. Cantarelli**, P. Sommer, A. Hinek, F. Delacoux, L. Martiny et L.

Debelle

1st Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Cologne, Allemagne, 10-12 mars 2005

Communications par voie d'affiche à des congrès nationaux

L'intervenant ayant présenté la communication est souligné.

"Le complexe récepteur de l'élastine : mécanisme de transduction d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle"

A. Rusciani, L. Duca, A. Chatron-Colliet, **B. Cantarelli**, H. Sartelet, R. Le Naour, H.

Bobichon, D. Ploton, L. Martiny et L. Debelle

Paul Basset Memorial Meeting Early Tumor Invasion, IGBMC, Illkirch, France, 30 janvier 2009

Le complexe récepteur de l'élastine : mécanisme de transduction d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

A. Rusciani, L. Duca, A. Chatron-Colliet, **B. Cantarelli**, H. Sartelet, R. Le Naour, H.

Bobichon, D. Ploton, L. Martiny et L. Debelle

Second symposium du Cancéropôle Grand Est, Vittel, France, 17 octobre 2008

“Les peptides dérivés de la dégradation de l'élastine induisent le développement des mélanomes B16F1 in vivo au travers de la production de la collagénase Mcol-A.”

L. Duca, **B. Cantarelli**, C. Blanchevoye, J. Devy, F. Delacoux, W. Hornebeck, L. Martiny, L. Debelle

XXVIIème Forum de Cancérologie, Paris, France, 26-28 juin 2007.

"Elastin peptides promote cell survival by counterbalancing ceramide-induced apoptosis"

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

Forum des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, 14 juin 2007

"Elastin complex receptor: the elastin binding site"

C. Blanchevoye, **B. Cantarelli**, L. Duca, P. Sommer, A. Hinek, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

Forum des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, 14 juin 2007

"Elastin peptides promote cell survival by counterbalancing ceramide-induced apoptosis"

B. Cantarelli, L. Duca, C. Blanchevoye, F. Delacoux, L. Martiny et L. Debelle

XVI congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, Caen, 21-24 mars 2007.

Acte de congrès

“Effects of elastin peptides on ceramide-induced apoptosis”

B. Cantarelli, L. Duca , C. Blanchevoye , F. Delacoux, L. Martiny , L. Debelle .

XIXth IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Paris, France, 5-9 juillet 2009
(page S380).