

Université de Montréal

**Clonage du domaine V du perlécan et
étude de son activité biologique**

par

Andrée Labelle

Unité académique de Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade M.Sc.
en Biologie Moléculaire

Décembre 2005

© Andrée Labelle, 2005



QH

506

U54

2006

V. 034

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Clonage du domaine V du perlécan
et étude de son activité biologique

présenté par
Andrée Labelle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :
Abdellah Belmaaza, président rapporteur
Marie-Josée Hébert, directeur de recherche
Pascal Reboul, membre du jury

RÉSUMÉ

L'apoptose des cellules endothéliales (CE) est un facteur clé dans le déclenchement de plusieurs maladies vasculaires telles que l'athérosclérose et les vasculopathies de transplantation, caractérisées par la formation d'une néointima résultant de la prolifération et de la survie accrue des cellules vasculaires musculaires lisses (CML). Notre laboratoire a démontré que les CE soumises à un stress pro-apoptotique libèrent des médiateurs dans le milieu conditionné sans sérum (SSC). Ces médiateurs agissent de façon paracrine sur les CML en inhibant l'apoptose et en stimulant leur prolifération. Un des médiateurs présent dans le SSC est un fragment cryptique carboxy-terminal du domaine V du perlécan, un protéoglycane de la matrice extracellulaire (MEC). Ce fragment est constitué de deux motifs homologues à des protéines de la MEC connues : un motif globulaire de la chaîne α des laminines (motif LG3) et un motif de facteur de croissance épidermique (EGF4). Nous proposons qu'un de ces motifs ou leur combinaison puisse reproduire l'activité anti-apoptotique et pro-proliférative du SSC chez les CML de rat (CMLr). Les motifs du domaine V du perlécan EGF4-LG3 et LG3 seul, ont été clonés, exprimés dans un système cellulaire et purifiés sur une colonne d'affinité. Nous démontrons que les peptides recombinants (PepR) EGF4-LG3 et LG3 ont un effet anti-apoptotique sur les CMLr, le motif EGF4 n'étant pas indispensable à cet effet. Les PepR n'ont aucun effet sur la prolifération des CMLr. Suite à une étude plus approfondie des effets biologiques des PepR, des stratégies pourraient être envisagées pour mieux contrôler la réponse fibroproliférative et l'épaississement myointimal lors de la réparation d'une lésion vasculaire.

Mots clés : Perlécan, matrice extracellulaire, fragment cryptique, apoptose, remodelage vasculaire, néointima, motif globulaire de la chaîne α des lamines, EGF.

ABSTRACT

Apoptosis of endothelial cells (EC) is followed by neointima formation characterised by accumulation of vascular smooth muscle cells (VSMC) mediated by an increase proliferation and survival. These conditions are characteristic of atherosclerosis and allograft vasculopathy. Our laboratory showed that apoptotic EC release soluble mediators (SSC) that trigger the proliferation and survival of VSMC. A cryptic carboxy-terminal fragment of perlecan's domain V was identified in conditioned media (SSC). This cryptic fragment is putatively composed of two extracellular matrix (EM) homologous motifs : a globular motif of laminin's α chain (LG3) and an epidermal growth factor motif (EGF4). We propose that one of these motifs or their combination could reproduce the effects of SSC on VSMC. These motifs were cloned together (EGF4-LG3) or only the last motif (LG3), the recombinant proteins expressed in an eukaryote environment and purified on an affinity column. Both recombinant peptides EGF4-LG3 and LG3 had an anti-apoptotic effect on VSMC, the EGF4 motif seemed dispensable for this effect. No pro-proliferative effects were seen with both recombinants. A better understanding of biologic effects of these recombinant peptides would lead to a greater understanding of mechanism of vascular repair. Strategies could be built to control vascular fibroproliferative reaction and myointimal thickening responses and favour a normal vascular healing.

Key words : Apoptosis, vascular remodelling, neointima, perlecan, extracellular matrix, cryptic fragment, globular domain of laminin's α chain, EGF motif.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
LISTE DES FIGURES	XV
REMERCIEMENTS	XVI
1. INTRODUCTION	1
1.1 MÉCANISME DE RÉPARATION D'UNE LÉSION VASCULAIRE	3
1.1.1 Athérosclérose	4
1.1.2 Vasculopathie de transplantation	7
1.1.3 Microangiopathie thrombotique	7
1.2 MAINTIEN DE L'ÉQUILIBRE CELLULAIRE AU NIVEAU DES VAISSEaux	8
1.3 APOPTOSE	9
1.3.1 La voie intrinsèque mitochondriale	12
1.3.2 La voie extrinsèque du récepteur de mort	14
1.3.3 L'apoptose dans les maladies vasculaires	16
1.4 L'APOPTOSE ENDOTHÉLIALE ET SES CONSÉQUENCES SUR LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	17
1.4.1 L'apoptose endothéliale entraîne la protéolyse de la matrice extracellulaire	17
1.4.2 La matrice extracellulaire	18
1.4.2.1 Laminines	20
1.4.2.2 Le Pérlectan et ses domaines	21
1.4.3 Métalloprotéases	27

1.5 INDUCTION D'UNE RÉSISTANCE À L'APOPTOSE CHEZ LES CML	29
2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE	34
2.1 PRÉMISSSES	35
2.2 HYPOTHÈSE	36
2.3 OBJECTIFS	37
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
3.1 RÉACTIFS ET LEUR COMPOSITION	39
3.1.1 Réactifs	39
3.1.2 Composition de réactifs complexes	45
3.2 PROTOCOLES GÉNÉRAUX	47
3.2.1 Dosage de l'ADN	47
3.2.2 Réactions de PCR	47
3.2.3 Isolement d'ARNm, production de cDNA et amplification d'une partie carboxy-terminale du domaine V du perlécan	47
3.2.4 Migration et visualisation de l'ADN sur gel d'agarose 1%	49
3.2.5 Récupération et purification des produits de PCR	50
3.2.6 Description des plasmides utilisés	50
3.2.7 Ligation des inserts dans les plasmides appropriés	54
3.2.8 Réaction de Phosphatase Alcaline (CIP)	54
3.2.9 Transformation des produits de ligation	55
3.2.10 Microbiologie	56
3.2.11 Extraction de l'ADN plasmidique	57
3.2.12 Précipitation de l'ADN au Phénol-Chloroforme	57
3.3 PROTOCOLES DÉTAILLÉS DES CLONAGES	58
3.3.1 Motif EGF4-LG3 dans pCDNA3.1	58

3.3.1.1 Sous clonage du clone 1-2 motif EGF4-LG3 dans le pCDNA3.1	59
3.3.2 Motif LG3	61
3.3.2.1 Sous clonage du clone 2-1S LG3 dans le pCDNA3.1	62
3.3.3 Motif EGF4-LG3 pour expression avec l'épitope HA	63
3.3.3.1 Sous clonage du clone 4-4 motif EGF4-LG3 dans pCEP4-HA	64
3.3.4 Motif LG3 pour expression avec l'épitope HA	66
3.3.4.1 Sous clonage du clone 5-B3 motif LG3 dans pCEP4-HA	67
3.3.5 Motif EGF3-EGF4-LG3 pour expression avec l'épitope HA	68
3.3.5.1 Sous clonage des clones DomV-NotI-3,4 et 5 motif EGF3-EGF4-LG3 dans pCEP4-HA	69
3.4 CULTURE CELLULAIRE	71
3.4.1 Lignées cellulaires et conditions de culture	71
3.4.2 Transfections	72
3.4.2.1 Transfection des Namalwas	73
3.5 IMMUNOBUVARDAGE POUR LES PEPTIDES RECOMBINANTS-HA	74
3.5.1 Immunobuvardage de type Western Blot	74
3.5.1.1 Ré-exposition d'une membrane à un deuxième anticorps primaire	76
3.5.2 Immunobuvardage par point	76
3.6 PURIFICATION DES PEPTIDES RECOMBINANTS SUR COLONNE D'AFFINITÉ ANTI-HA	77
3.7 ÉVALUATION DE L'APOPTOSE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	79
3.8 DÉTERMINATION DE LA PROLIFÉRATION	80
3.9 ANALYSES INFORMATIQUES	81
4. RÉSULTATS	82
4.1 TRANSFECTIONS TRANSITOIRES	83
4.2 IMMUNOBUVARDAGES	88
4.2.1 Les cellules Namalwas expriment les peptides recombinants transfectés	88
4.2.2 Les peptides recombinants exprimés sont identifiables à l'aide de plusieurs anticorps	89
4.3 EFFET ANTI-APOPTOTIQUE DES PEPTIDES RECOMBINANTS	92

4.4 ACTIVITÉ PROLIFÉRATIVE DES PEPTIDES RECOMBINANTS	94
5. DISCUSSION	98
5.1 CLONAGE	99
5.2 TRANSFECTIONS TRANSITOIRES	101
5.3 TRANSFECTIONS DANS LES NAMALWAS	103
5.4 IMMUNOBUVARDAGES	104
5.5 EFFET ANTI-APOPTOTIQUE DES PEPTIDES RECOMBINANTS	107
5.6 ACTIVITÉ PROLIFÉRATIVE DES PEPTIDES RECOMBINANTS	109
5.7 PERSPECTIVES	110
6. CONCLUSION	115
7. RÉFÉRENCES	118
8. ANNEXE	126
8.1 REPRÉSENTATION DE LA SÉQUENCE DU CLONE I-4 UTILISÉ POUR LE CLONAGE DES MOTIFS DU DOMAINE V DU PERLÉCAN	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : alanine

a.a. : acide aminé

Ac : anticorps

ADN : acide déoxyribonucléique

Amp ou amp : ampicilline

ARNm : acide ribonucléique messenger

Asn (et N dans la fig. 4B) : asparagine

ATP : adénosine triphosphate

Bad : antagoniste de Bcl-2 de mort cellulaire; Bcl-2 antagonist of cell death

Bak : antagoniste de Bcl-2/tueur; Bcl-2-antagonist/killer

Bax : protéine X associée à Bcl-2; Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bim : médiateur de mort interagissant avec Bcl-2 ; Bcl-2 interacting mediator of cell death

b-FGF : facteur basique de croissance des fibroblastes; basic fibroblast growth factor

Bid : agoniste de mort interagissant avec le domaine BH3; BH3 interacting domain death agonist

Bidt : Bid tronqué

Bim : médiateur de mort interagissant avec Bcl-2; Bcl-2 interacting mediator of cell death

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

C : cystéine

Caspase : cystéine aspartase

CE : cellule endothéliale

CML : cellule vasculaire musculaire lisse; vascular smooth muscle cell (VSM)

CMLr : cellule vasculaire musculaire lisse d'aorte thoracique de rat

CS : chondroïtine sulfate

Cyt c : Cytochrome c

D : acide aspartique

DD : domaine de mort; death domain

DED : domaine d'exécution de mort; death effector domain

DIABLO : protéine avec pI bas liant directement les IAP; direct IAP binding protein
with low pI

DISC : complexe de signalisation inducteur de mort ; death-inducing signaling
complex

DMSO : dimethylsulfoxyde

E : acide glutamique

EGF : facteur de croissance épidermique; epidermal growth factor

EGF3 et EGF4 : 3^e et 4^e motifs EGF du domaine V du perlécan

Erk 1/2 : kinase régulée par des signaux extracellulaires; extracellular signal-
regulated kinase

ExpPASy : système expert d'analyse protéique; Expert Protein Analysis System

F : phenylalanine

FADD : domaine de mort associé à Fas; Fas-associated death domain

FasL : ligand de Fas

FGF-2 : facteur de croissance des fibroblastes 2 ; fibroblast growth factor-2

FLICE : protéase homologue à FADD apparentée à ICE/CED-3; FADD-homologous
ICE/CED-3-like protease

FLIP : protéine inhibitrice de FLICE; FLICE inhibitory protein

FPLC : chromatographie liquide rapide de protéines ; fast protein liquid
chromatography

G et Gly : Glycine

GFP : protéine fluorescente verte ; green fluorescent protein

H : histidine

HA : épitope hémmaglutinine

Ho: Hoechst 33342

HS : héparane sulfate

HSPG : protéoglycanes à héparane sulfate

HSPG2 : gène du HSPG perlécan

HUVEC : cellule endothéliale veineuse ombilicale humaine; human umbilical vein
endothelial cell

IAP : protéines inhibitrices d'apoptose; inhibitor of apoptosis proteins

Ig : immunoglobuline

IgG : immunoglobuline de type G

IGF-1 ; facteur-1 de croissance apparenté à l'insuline; insulin-like growth factor-1

I et Ile : interleucine

K : lysine

kDa : kilo Dalton

L : leucine

LB : Luria Berthanie

LDL : lipoprotéine à faible densité ; low density lipoprotein

LG : domaine globulaire de la chaîne α des laminines

LG3 : 3^e motif du domaine V du perlécan homologue au domaine globulaire de la chaîne α des laminines

MB : membrane basale

MEC : matrice extracellulaire

MMP : métalloprotéase de la matrice ; matrix metalloprotease

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem ; tandem mass spectrometry

N : milieu de culture normal contenant 10% FBS

Nam : Namalwa

P : proline

pb : paire de bases d'ADN

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; platelet derived growth factor

PepR : peptide recombinant

Pi : iodure de propidium ; propidium iodide

Q : glutamine

R : arginine

RIPA : essai de radio-immunoprécipitation ; radio-immunoprecipitation assay

SDS-PAGE : électrophorèse par gel de polyacrylamide et de sodium-dodecyl-sulfate ; sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

S et ser : sérine

SIMP : protéines solubles mitochondriales intermembranaires ; soluble mitochondrial intermembrane proteins

SJS : syndrome de Schwartz-Jampel; Schwartz-Jampel syndrome

Smac : deuxième activateur de caspases dérivé de la mitochondrie ; second mitochondrial-derived activator of caspases

SPARC : protéine acide et riche en cystéine sécrétée ; secreted protein acidic and rich in cysteine

SS : milieu de culture sans sérum

SSC : milieu conditionné sans sérum par les cellules endothéliales apoptotiques

T : thréonine

TGF- β : facteur β de croissance transformant ; transforming growth factor- β

TNF- α : facteur α de nécrose tumorale ; tumor necrosis factor- α

TNFR : récepteur du facteur de nécrose tumorale ; tumoral necrosis factor receptor

Tp : mélange 50/50 de tampon d'élution et de tampon de neutralisation utilisé avec la colonne d'affinité anti-HA

U : Unité enzymatique

V : valine

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; vascular endothelial growth factor

VSMC : vascular smooth muscle cell

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Y : tyrosine

ZVAD : z-VAD-fmk benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique des sections de la paroi vasculaire	6
Figure 2. Schéma de la voie intrinsèque mitochondriale et de la voie extrinsèque de l'apoptose.	11
Figure 3. Représentation schématique du perlécan et de ses cinq domaines	23
Figure 4. Représentation du Domaine V du perlécan	24
Figure 5. Production du milieu conditionné par les CE apoptotiques (SSC)	30
Figure 6. Schéma récapitulatif des étapes de clonage	52
Figure 7. Activité anti-apoptotique des peptides recombinants sur les fibroblastes	85
Figure 8. Les cellules Namalwa expriment les peptides recombinants	89
Figure 9. Immunobuvardages permettant d'estimer la masse moléculaire des peptides recombinants	91
Figure 10. Activité anti-apoptotique des peptides recombinants sur les CMLr	94
Figure 11. Les peptides recombinants n'induisent pas la prolifération des CMLr	97
Figure 12. Séquence en acides nucléiques du clone I-4 ayant servi au clonage des différents motifs du domaine V du perlécan	127

REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier Marie-Josée Hébert de m'avoir donné la chance de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire. Ces deux dernières années passées dans ce laboratoire n'ont pas été toujours faciles et sans l'aide de toute l'équipe je n'aurais pas pu me rendre jusqu'à la fin de ce projet. Un merci tout spécial à Normand Vigneault pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions, merci de ta patience. Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe avec qui j'ai travaillé, votre aide m'a été très précieuse.

1. INTRODUCTION

Le corps humain est une machine complexe. Ses constituants de base sont les différentes cellules qui rassemblées par unités, les organes, assurent la cohérence et le bon fonctionnement de l'ensemble de cette extraordinaire machine. Pour que le tout fonctionne correctement, tous les systèmes impliqués se doivent d'être fonctionnels. L'arbre vasculaire humain est un de ces systèmes essentiels sur lequel repose l'équilibre de l'ensemble. En effet, les cellules, tissus et organes doivent être bien oxygénés et débarrassés de leurs déchets pour pouvoir accomplir leur rôle respectif et ainsi assurer la cohésion du corps entier. Le système vasculaire est formé d'une multitude de vaisseaux qui parcourent le corps dans son entier. Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches structurales soit l'adventice, la média et l'intima. L'adventice est composée de tissu conjonctif, de quelques fibroblastes et de collagène donnant une certaine flexibilité au vaisseau. La média est constituée de cellules vasculaires musculaires lisses (CML) permettant la contraction du vaisseau et est entourée de matrice extracellulaire (MEC) composée de protéines et de protéoglycanes. Finalement l'intima est une monocouche de cellules endothéliales (CE) qui reposent sur la membrane basale (MB), formant la lumière du vaisseau, directement en contact avec le sang et ses constituants (Fig. 1A). Le dérangement de l'homéostasie d'une de ces couches affecte le système dans son entier en induisant un remodelage vasculaire qui entraînera des conséquences à court et à long terme.

1.1 Mécanisme de réparation d'une lésion vasculaire

La dysfonction endothéliale qui résulte d'une lésion est connue comme étant un phénomène qui conduit au remodelage du vaisseau affecté en provoquant une réponse compensatoire qui altère ses propriétés homéostatiques. Ainsi, l'hypercholestérolémie, le tabagisme et le diabète font partie des facteurs de risque associés aux maladies vasculaires classiques telles que l'athérosclérose, les microangiopathies thrombotiques et différentes formes de vasculopathies de transplantation. Ces facteurs de risque entraînent dans chacune de ces affections une lésion endothéliale de laquelle découlera ensuite tout un processus de réparation impliquant les diverses couches du vaisseau. Les conséquences pour les CE sont entre autres une augmentation de leur propriété adhésive, une augmentation de leur perméabilité, une induction de la production de facteurs pro-coagulants (plutôt qu'anti-coagulants), de molécules vasoactives, de cytokines et de facteurs de croissance. Les CE vont tenter par ces moyens de neutraliser la cause de l'insulte, mais si elles n'y parviennent pas, la réponse de réparation peut continuer indéfiniment [1]. À moyen terme, grâce aux signaux envoyés par les CE, les CML migrent dans l'intima et commencent à proliférer et sécréter du collagène pour assurer la réparation, c'est la formation de la néo-intima [2]. Si la cause de l'insulte est de courte durée, la réparation du vaisseau initiée par les CE est efficace et la réaction intimale réversible [3]. Peu à peu la prolifération diminue et le vaisseau se trouve réparé. Les CML qui ont migré au site d'insulte entament alors une mort cellulaire programmée qui va éliminer le surplus entraîné par leur prolifération. Ceci constitue

une réponse normale de réparation d'une lésion qui se résume en un remodelage de la paroi vasculaire endommagée. Par contre, la chronicité ou l'excès de l'atteinte endothéliale résulte en une inflammation excessive et chronique de la paroi vasculaire intimale dont un des principaux éléments est la réaction proliférative fibromusculaire des CML. Il y a alors épaissement intimal ce qui entraîne un rétrécissement progressif de la lumière du vaisseau. C'est ce que nous appelons un remodelage vasculaire pathologique, qui est retrouvé dans plusieurs dysfonctions vasculaires telles que l'athérosclérose [4], la vasculopathie de transplantation [5, 6] et la microangiopathie thrombotique [7-12] que nous verrons plus en détails.

1.1.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire qui résulte d'une multitude d'insultes vasculaires. Une concentration plasmatique élevée de cholestérol de lipoprotéine de faible densité (LDL), les radicaux libres causés par la fumée de cigarette, le diabète et l'hypertension sont des facteurs pouvant entraîner l'insulte endothéliale vasculaire [1]. Une réponse inflammatoire-fibroproliférative excessive suite à ces insultes entraîne la formation d'une lésion avancée d'athérosclérose qui peut éventuellement conduire à l'occlusion du vaisseau. Mais tout d'abord la progression de la maladie commence par une dysfonction endothéliale qui cause de l'inflammation. Les CE deviennent adhésives pour les lipoprotéines circulantes et expriment des glycoprotéines à leur surface [13]. Ensuite les macrophages dérivés de monocytes et les lymphocytes T migrent au site de lésion et s'accumulent dans l'intima pour

former une plaque lipidique, première étape dans l'évolution de la maladie [1, 13]. Ces types cellulaires produisent plusieurs facteurs de croissance comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF), le facteur- α de nécrose des tumeurs (TNF- α), le facteur-1 de croissance apparenté à l'insuline (IGF-1), l'interleukine-1 et le facteur β de croissance transformant (TGF- β) [13-22]. Ces facteurs stimulent la migration et la prolifération des CML qui s'intercalent dans la région inflammée pour former une lésion intermédiaire constituée de MEC, de protéines élastiques, de collagène et de protéoglycanes sécrétés par les CML [1]. Si la réponse n'est pas stoppée, les CML vont finir par épaissir la paroi vasculaire qui elle, va compenser en se dilatant, jusqu'au point où la lumière du vaisseau n'est pas affectée, un phénomène connu sous le nom de remodelage vasculaire [1]. Mais si le signal inflammatoire est dispensé de façon continue, un nombre accru de macrophages et de lymphocytes T émigrent du sang et se multiplient dans la lésion. L'activation continue de ces cellules soutient la relâche d'enzymes hydrolytiques, de cytokines et de facteurs de croissance qui peuvent augmenter les dommages et éventuellement conduire à une mort cellulaire locale de type nécrose [1]. Donc un cycle répété d'accumulation de monocytes et lymphocytes T, de migration et prolifération de CML et la formation de tissu fibreux entraîne l'élargissement et la restructuration de la lésion qui se recouvre peu à peu d'un cap fibreux lui-même recouvert par des lipides et du tissu nécrotique, c'est ce qui caractérise une lésion avancée (Fig. 1B). À un certain point, l'artère ne peut plus compenser par dilatation, la plaque fibreuse peut alors pénétrer et obstruer la lumière et ainsi altérer le flot sanguin.

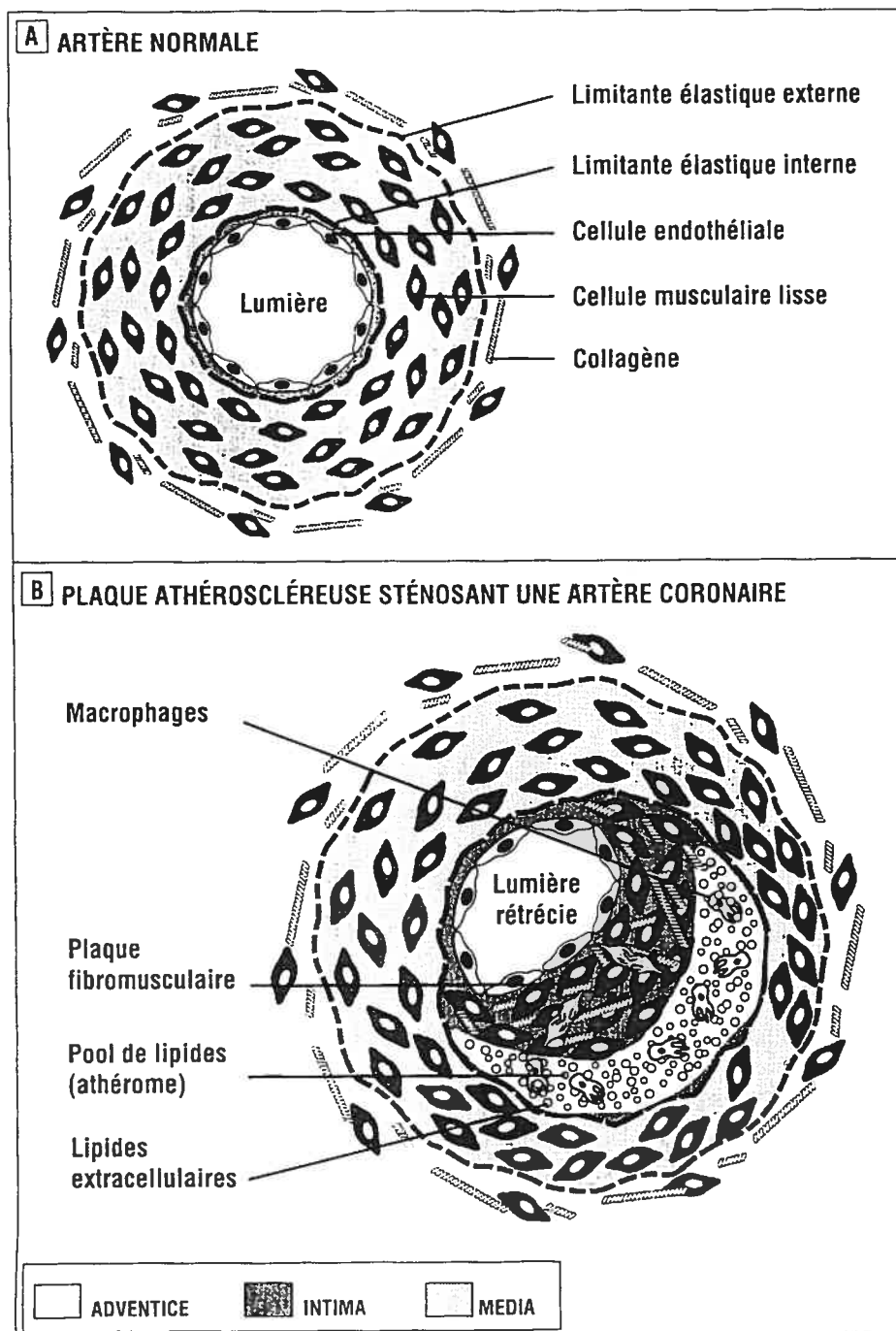


Figure 1. Représentation schématique des sections de la paroi vasculaire

A) Paroi vasculaire artérielle normale. L'adventice est la couche la plus externe du vaisseau, on y retrouve quelques fibroblastes (non-représentés) et des cellules vasculaires musculaires lisses (CML), ainsi que du collagène. La limitante élastique externe sépare l'adventice de la média, composée de

CML. La limitante élastique interne sépare la média de l'intima. L'intima est la partie du vaisseau la plus interne et est composée de cellules endothéliales (CE) reposant sur la membrane basale (MB). B) Plaque athéroscléreuse sténosant une artère coronaire. L'intima est épaissie de façon localisée. Cette néo-intima est riche en macrophages, en (CML), en substance conjonctive extracellulaire et en lipides. Les CML qui occupent la néo-intima ont proliféré et migré de la média.

1.1.2 Vasculopathie de transplantation

La vasculopathie de transplantation apparaît dans les cas de greffe d'organe solide et l'incidence d'une dysfonction chronique est d'environ trois ans après la transplantation et varie de 4 à 50% [23-25]. Indépendamment de l'organe greffé, les vaisseaux du greffon développent éventuellement l'athérosclérose de transplantation, plus fréquemment retrouvée dans les greffes de cœur et de reins [26, 27]. Le phénomène est très semblable à celui décrit pour l'athérosclérose. Des facteurs immunologiques ou métaboliques retrouvés au site de transplantation endommagent les CE des vaisseaux. L'endothélium endommagé est ici encore une fois responsable de l'initiation du remodelage pathologique. Ce processus de remodelage vasculaire consiste en un épaississement progressif concentrique de l'intima avec une inflammation péri-vasculaire.

1.1.3 Microangiopathie thrombotique

La microangiopathie thrombotique est un syndrome caractérisé par l'agrégation de plaquettes sanguines dans la microcirculation rénale et a été reliée à l'insulte des CE

de la paroi vasculaire rénale [28-36]. La présence de l'épaississement intimal artériel dans les biopsies rénales de patients atteints de microangiopathie thrombotique est un indice important du développement de dysfonction rénale progressive [32, 37-39]. Ces changements intimaux seraient causés par une lésion endothéliale suivie de la migration et de la prolifération des CML dans l'intima [32, 37-39].

1.2 Maintien de l'équilibre cellulaire au niveau des vaisseaux

Comme nous venons de le voir, une insulte au niveau de l'endothélium entraîne le remodelage vasculaire, la formation de la néo-intima, impliquant plusieurs types cellulaires et facteurs de croissance et vient briser l'équilibre qui régnait dans ce système. L'apoptose endothéliale est reconnue comme étant un composant important du phénomène de la réponse à l'insulte vasculaire. L'apoptose endothéliale est augmentée aux sites d'insulte vasculaire dans des modèles animaux de microangiopathie thrombotique [34], d'athérosclérose [4] et de vasculopathie de transplantation [5, 6]. Une dérégulation au niveau de l'apoptose et de la prolifération des constituants cellulaires au site d'insulte engendre des conséquences non négligeables au vaisseau affecté. En effet, les CE apoptotiques envoient des signaux, en réponse à l'insulte, qui déclenchent le remodelage vasculaire et l'épaississement intimal. La formation de la néo-intima est en partie causée par une dérégulation de l'apoptose et une augmentation de la prolifération des CML telles que rencontrées dans plusieurs modèles de maladies vasculaires fibroprolifératives [40-44].

L'homéostasie vasculaire est finement régulée par l'apparition et la disparition des cellules de la paroi vasculaire. Les cellules endommagées ou trop vieilles et ayant des fonctions défectueuses sont éliminées via la mort cellulaire programmée, pour être remplacées par de nouvelles cellules fonctionnelles [45]. L'apoptose des cellules vasculaires (CE, CML) ferait partie d'une réponse d'adaptation qui permet de réduire le vaisseau pour répondre à la diminution du flux sanguin. Plusieurs études démontrent qu'un endommagement d'un vaisseau par ballon entraîne deux vagues d'apoptose chez les CML et les CE. Une diminution de la cellularité de la média résulte d'une réponse apoptotique précoce qui atteint son maximum à 1 h post-insulte [46]. Ensuite, une phase de résistance à l'apoptose et une augmentation de la prolifération des CML est observée [47]. Une deuxième vague d'apoptose apparaît beaucoup plus tard, soit des jours ou des semaines après l'insulte et sa fréquence est plus petite [48]. Cette deuxième vague d'apoptose permet l'élimination des CML en excès et termine la réparation du vaisseau une fois que l'endothélium est réparé. Plusieurs évidences démontrent que le développement d'une résistance à l'apoptose et la prolifération des CML sont nécessaires à la formation de la néo-intima et au remodelage vasculaire. La mort cellulaire programmée est un processus régulé génétiquement dont la forme la plus connue est l'apoptose.

1.3 Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée, contrôlée par une famille de gènes produisant des molécules pro- et anti-apoptotiques. La survie cellulaire est donc étroitement reliée à l'équilibre qui règne entre ces molécules. Le terme apoptose a été introduit en 1972 par J.F. Kerr et A.H. Wyllie et désigne une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire [49]. Éventuellement, la cellule apoptotique se condense et se brise en petits fragments appelés corps apoptotiques qui seront phagocytés sans induire de réaction inflammatoire. La phagocytose se fait par les cellules environnantes, majoritairement des monocytes/macrophages [50]. C'est l'activation de protéases spécifiques nommées caspases qui est à l'origine de ce phénomène que l'on appelle apoptose. Les caspases sont une famille de protéases à cystéines intracellulaires qui clivent leurs substrats au niveau d'un résidu d'acide aspartique et sont présentes sous forme de zymogènes inactifs dans toutes les cellules de l'organisme [51]. Elles peuvent être classées en deux groupes, soit les caspases initiatrices et les caspases effectrices. L'activation des caspases effectrices peut être initiée par deux voies d'activations majeures : la voie intrinsèque mitochondriale et la voie extrinsèque activée par des récepteurs membranaires (Figure 2) [49].

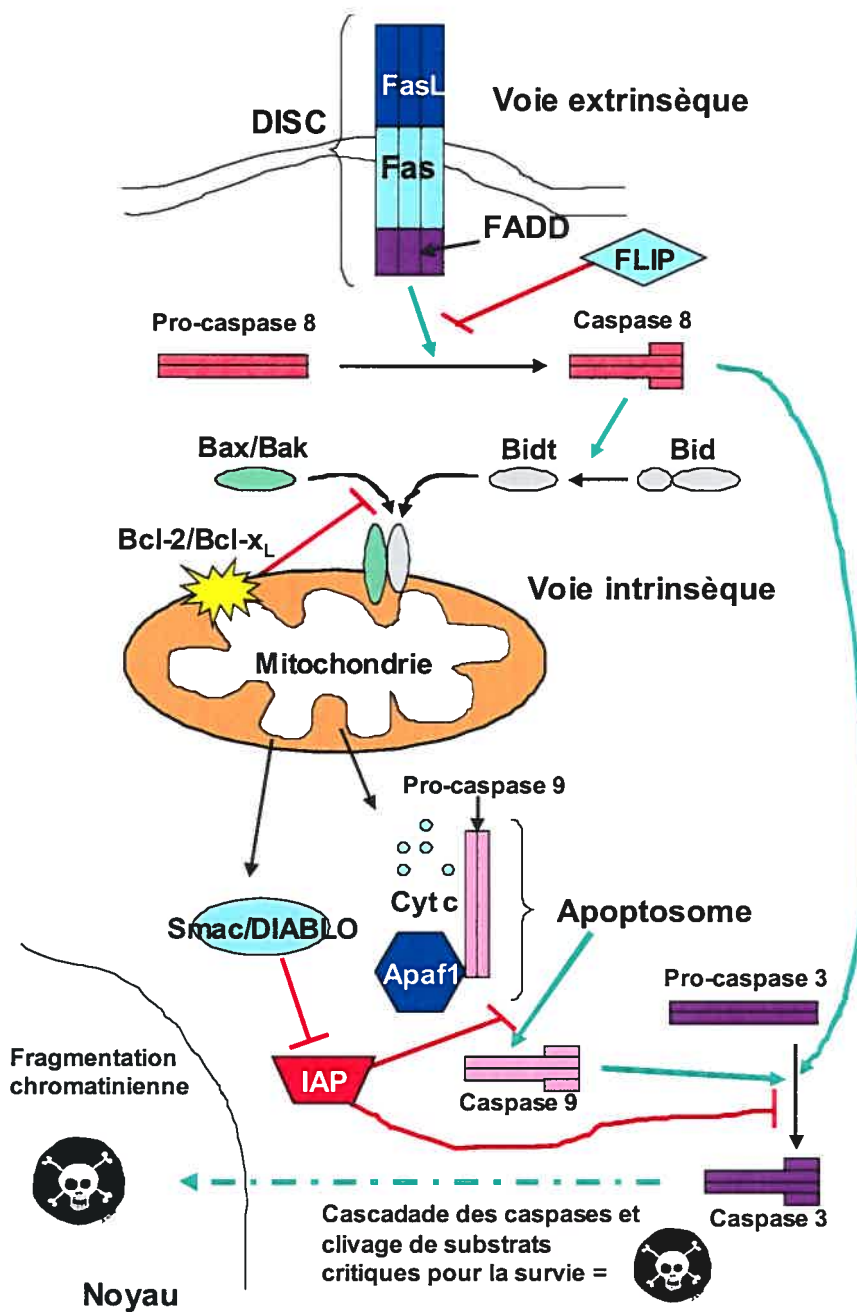


Figure 2. Schéma de la voie intrinsèque mitochondriale et de la voie extrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque : la liaison de Fas-L avec son récepteur Fas permet le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8 à la membrane plasmique. Le complexe multiprotéique ainsi formé est appelé le DISC. Le rapprochement des pro-caspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la

libération dans le cytosol de la caspase 8 active qui peut à son tour cliver d'autres substrats comme la pro-caspase 3 et Bid, ces deux dernières molécules font le lien avec la voie intrinsèque. La voie intrinsèque mitochondriale : suite à un stimulus d'apoptose, les protéines pro-apoptotiques Bax/Bak vont s'insérer dans la membrane mitochondriale et provoquer la libération de facteurs pro-apoptotiques tel que le Cytochrome c (Cyt c) et Smac/DIABLO. Le Cyt c interagit avec la protéine Apaf-1 permettant le recrutement de la pro-caspase 9, formant un complexe multiprotéique appelé apoptosome. L'apoptosome est à l'origine de l'activation de la caspase 9, qui activera à son tour la caspase 3. La cascade d'activation des caspases est ainsi activée et le clivage des substrats indispensables pour la survie est entamé. La protéine Smac/DIABLO se lie aux IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose) et les inactive. FLIP est un autre inhibiteur qui empêche le recrutement de la pro-caspase 8 au récepteur et inhibe son activation.

1.3.1 La voie intrinsèque mitochondriale

Les stress génotoxiques, les radicaux libres oxygénés, la carence de facteurs de croissance, les bris du double brin de l'ADN, et l'hypoxie sont des activateurs classiques de la voie intrinsèque. La mitochondrie depuis longtemps identifiée comme l'organelle indispensable à la production d'ATP, a été également impliquée dans la régulation des mécanismes de mort cellulaire. En effet, chez une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire, on observe une perméabilisation des membranes mitochondriales, à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol, accompagné dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial [49]. Une famille de protéines, les Bcl-2, est directement impliquée dans la modulation de la perméabilité

membranaire de la mitochondrie. Cette famille contient deux catégories de protéines : les pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) et les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L) [51]. Beaucoup des membres de cette famille peuvent interagir ensemble et former des homo- ou hétérodimères [51]. Le ratio de molécules pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dicte la sensibilité ou la résistance ultime des cellules aux divers stimuli apoptotiques [51]. Plusieurs membres de la famille Bcl-2 sont constitutivement localisés à la membrane mitochondriale, tandis que d'autres y sont dirigés par induction en réponse à un stimulus spécifique. Par exemple, Bcl-2 et Bcl-x_L possèdent un domaine transmembranaire hydrophobique permettant leur ancrage dans la membrane externe de la mitochondrie [51]. Au contraire, les protéines pro-apoptotiques Bid, Bim et Bak n'ont pas ce domaine transmembranaire et sont normalement retrouvées dans le cytoplasme, mais peuvent être envoyées à la mitochondrie suite à un signal. La protéine Bax possède un domaine d'ancrage, mais n'est pas toujours en association avec la membrane mitochondriale, elle ferait plutôt la navette entre celle-ci et le cytosol. Suite à divers stimuli, Bax change de conformation, est déplacé à la mitochondrie et s'insère dans les membranes mitochondriales, provoquant l'ouverture d'un pore transmembranaire permettant la libération de protéines mitochondriales intermembranaires solubles (SIMP) qui possèdent toutes une activité pro-apoptotique [49, 51, 52]. Une première classe des SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue des pro-caspases (pro-caspase-2, 3, et 9), le Cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO. Une fois libéré dans le cytosol, le Cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 et la forme zymogène de la caspase

9, formant ainsi en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome [52]. Cet apoptosome est à l'origine du clivage, donc de l'activation de la pro-caspase 9 [49]. Une fois active, la caspase 9 activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7, c'est ce qu'on appelle la cascade d'activation des caspases. Cette cascade est un moyen d'amplification et d'intégration efficace du signal apoptotique [52]. Une fois la caspase 3 active, celle-ci clive les pro-caspases 6 et 7 [49]. Ces dernières sont des caspases effectrices qui possèdent plusieurs substrats qui mènent à l'aboutissement de l'apoptose. La protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et les inactive [49]. Les IAP préviennent l'activation des caspases donc inhibent l'activité des caspases matures [53]. Les IAP ont la capacité de se diriger vers le protéasome pour dégradation en entraînant les protéines qui lui sont complexées. Smac/DIABLO contribue à l'activation des caspases en séquestrant les IAP et en neutralisant leur activité anti-apoptotique [51, 54, 55]. Donc si une cellule est dédiée à mourir par apoptose et qu'elle relâche son contenu mitochondrial, alors Smac/DIABLO va séquestrer les IAP et ainsi assurer que la voie de mort programmée ne revienne pas en arrière. Par analogie, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent être considérées comme des tampons qui minimiseraient une relâche accidentelle du contenu mitochondrial [52].

1.3.2 La voie extrinsèque du récepteur de mort

La voie extrinsèque implique des membres de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR), connus sous le nom des récepteurs de mort. Ils

ont la particularité de posséder dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée le domaine de mort (DD), nécessaire à la transmission du signal. Comme membres de cette famille, on retrouve entre autre Fas (CD95-APO-1) et TNFR1 [49, 52]. La voie du récepteur Fas ayant été la première décrite, celle-ci sera détaillée pour illustrer l'ensemble des voies de ces récepteurs de mort [56]. Le ligand de Fas, Fas-L interagit avec son récepteur et ensuite l'oligomérisation de celui-ci permet le recrutement à la membrane de FADD grâce à une interaction homotypique entre les domaines de mort. En effet, FADD est une protéine cytoplasmique ubiquitaire, qui contient dans sa partie carboxy-terminale, un domaine de mort et dans sa partie amino-terminale, un domaine effecteur de mort (DED), grâce auquel FADD attire à son tour la pro-caspase 8 [57]. Le complexe multiprotéique formé par Fas, FADD et la pro-caspase 8 est appelé le complexe de signalisation d'induction de la mort (DISC) [49]. Le rapprochement des pro-caspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque par auto protéolyse et la libération des formes actives dans le cytosol qui vont à leur tour cliver un certain nombre de caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7 [49]. L'apoptose médiée par Fas peut être bloquée par des protéines inhibitrices apparentées à Flice (FLIP) qui possèdent deux domaines DED et qui entrent en compétition avec les pro-caspases 8 pour leur recrutement au DISC [58-62]. La voie extrinsèque peut aussi activer la voie mitochondriale via une molécule pro-apoptotique de la famille Bcl-2 : Bid. En effet, la caspase 8 peut couper Bid pour donner la protéine Bid tronquée (Bidt) qui se déplace à la membrane mitochondriale et induit la relâche de son contenu intermembranaire [63, 64].

1.3.3 L'apoptose dans les maladies vasculaires

Des études ont démontré l'implication de certaines molécules clés de l'apoptose dans les désordres vasculaires. Une augmentation de l'expression génique de Bcl-x_L a été documentée spécifiquement dans les CML de la néo-intima, comparativement aux CML de la média, de plusieurs modèles animaux de formation de néo-intima [40, 65, 66]. Bcl-x_L, une protéine anti-apoptotique, étant présente dans les CML, ceci leur permet de développer une résistance à l'apoptose [6, 40]. Il a aussi été démontré que l'apoptose des CML de la néo-intima peut être induite par l'ablation de Bcl-x_L en utilisant un oligonucléotide antisens et que les CML de la média soumises au même traitement ne montrent pas une induction d'apoptose [6, 40]. De plus, la spécificité de l'ablation de Bcl-x_L chez les CML de la néo-intima permet la régression de la lésion athéromateuse sans affecter les cellules de la média [40]. Bcl-x_L est donc un des joueurs important dans la formation de la néo-intima et de l'épaississement myointimal, en contrôlant spécifiquement la sensibilité à l'apoptose des CML de la néo-intima. La formation de néo-intima peut aussi être favorisée par l'activation de la voie de signalisation de la kinase régulée par un signal extracellulaire (Erk 1/2) et une diminution du produit du gène anti-apoptotique p53 dans les CML [67, 68], suggérant ainsi que l'accumulation de cellules dans la néo-intima est une conséquence de l'état anti-apoptotique. Une fois activée par phosphorylation, p53 inhibe l'expression de Bcl-2 (anti-apoptotique) et induit l'expression de Bax (pro-apoptotique). On a découvert que la protéine p53 activée est impliquée dans l'activation directe de Bax, provoquant la perméabilisation de la membrane mitochondriale [69]. La voie extrinsèque est aussi impliquée dans certains désordres

vasculaires. L'apoptose médiée par Fas joue un rôle dans une variété de désordres vasculaires incluant l'athérogénèse [4, 70-73], la vasculopathie de transplantation [74] et l'inflammation. Des souris déficientes pour les gènes de Fas et/ou Fas-L souffrent de maladies rhumatismales caractérisées par de l'inflammation aberrante [75, 76]. L'augmentation de l'expression de Fas-L dans les CE et les CML augmente l'apoptose des cellules cytotoxiques T et des macrophages, augmente la survie des cellules vasculaires et résulte en une accumulation intimale des CML [73]. FLIP, abondant dans les CE, a pour fonction d'inhiber la mort induite par Fas [77]. FLIP est inhibé dans les CML à proximité d'une insulte endothéliale induite par ballon et dans les plaques athérosclérotiques humaines et aurait un rôle dans la régulation du remodelage vasculaire [77].

1.4 L'apoptose endothéliale et ses conséquences sur la matrice extracellulaire

1.4.1 L'apoptose endothéliale entraîne la protéolyse de la matrice extracellulaire

Les CE du système vasculaire sont entourées par la MEC et sont en étroite communication à tout moment avec celle-ci. Suite à une insulte vasculaire, l'équilibre des constituants est grandement affecté et certaines CE vont commettre le suicide via l'apoptose. Comme nous venons de le voir, ce processus est hautement régulé au niveau moléculaire et il implique l'activation et la protéolyse de plusieurs

molécules cytoplasmiques. Donc au cours de ce processus, les CE apoptotiques peuvent relâcher des médiateurs pour envoyer des signaux de survie et préparer à la réparation de la lésion [78, 79]. Des résultats de notre laboratoire ont aussi démontré que la relâche de ces médiateurs par les CE apoptotiques contribue à une protéolyse de la MEC localement. Cette protéolyse est à l'origine de l'apparition de fragments de protéines de la MEC ayant des propriétés différentes de la protéine mère et sera discutée plus en détails. Nos résultats démontrent aussi que la relâche de certains médiateurs actifs ne se fait que si la cascade des caspases est activée dans les CE apoptotiques [80].

1.4.2 La matrice extracellulaire

La MEC est constituée de deux domaines : la MB et la matrice interstitielle. La principale caractéristique que ces deux domaines ont en commun est leur structure de base définie par un enchevêtrement de molécules de collagène, bien que celui-ci soit très différent entre les deux domaines, surtout au niveau de sa structure tridimensionnelle [81]. Des protéines adhésives, incluant les laminines, la tenascine et des protéoglycanes adhèrent à l'enchevêtrement de collagène pour interagir avec les cellules dans ou adjacentes à la matrice. Les interactions cellulaires sont médiées par des récepteurs de la matrice, les intégrines, constituant la classe la plus importante de ces récepteurs [81]. La MEC n'est pas statique, elle est constamment remodelée, ce qui implique une protéolyse constante par des protéases, notamment de la famille des métalloprotéases de la matrice (MMP) [81]. La MB est une structure amorphe,

dense, assemblée sous forme de feuillets et est une forme [81] de MEC spécialisée située sous les CE [82]. La MB est toujours en contact avec les cellules et ses fonctions sont d'apporter un support structurel, de diviser les tissus en compartiments et aussi de réguler le comportement cellulaire [82]. En général, toutes les cellules sont en mesure de produire les constituants de la MB. Quelques uns des ses composants majeurs incluent le collagène de type IV, les laminines, les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) et le nidogène/entactine. Comme composants mineurs, on retrouve l'agrine, SPARC/BM-40/ostéoponine, la fibuline et le collagène de type XV et XVIII [82]. Lorsque les constituants de la MB sont assemblés ou désassemblés, les CE interagissent avec différents domaines de ces molécules. Ceci est un concept important puisqu'il signifie que le même ensemble de protéines, dans différentes configurations, peut avoir une influence fonctionnelle distincte sur les CE aux différents stages du remodelage vasculaire ou de l'angiogénèse [82]. L'angiogénèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux ou capillaires se forment à partir des vaisseaux existants, lors du développement ou de la réparation. Dans les dernières années, plusieurs autres membres de la MB ont été identifiés comme ayant des propriétés anti- ou pro-angiogéniques aussi bien dans leur totalité que comme fragment. Ces membres incluent le perlécan, les laminines, SPARC/BM-40/ostéoponine, le collagène de type XV et de type XVIII [82]. La protéolyse de la matrice libère des fragments cryptiques de collagène et d'autres molécules de la MB qui ont été reconnus pour avoir de nouvelles propriétés anti-angiogéniques [82]. L'endostatine est un fragment carboxy-terminal d'une chaîne $\alpha 1$ du collagène de type XVIII qui est un inhibiteur spécifique de la prolifération et de la

migration des CE, tout comme elle peut induire l'apoptose des CE en prolifération [82]. D'autres molécules de la MEC, comme la fibronectine et les laminines, peuvent avoir de profonds effets sur le phénotype des CML et leur capacité de réponse aux chemokines et agents mitogènes, et plus important sur leur capacité d'adhésion à la MEC ainsi qu'aux autres cellules [13]. Des observations ont permis de découvrir que les laminines pouvaient lier l'endostatine et ainsi réguler les propriétés anti-angiogéniques de cette dernière [82].

1.4.2.1 Laminines

Tel que mentionné, les laminines sont un des constituants majeurs de la MB. La laminine 1 est une molécule de 200 à 400 kDa, composée de trois chaînes reliées par des ponts disulfure et a une forme de croix. Les chaînes sont de trois types et possèdent plusieurs homologues, on retrouve 5 chaînes α , 3 chaînes β et 3 chaînes γ [81]. Ce ne sont pas toutes les combinaisons de chaînes qui sont observables. Jusqu'à ce jour, 12 isoformes distinctes ont été isolées. Toutes les chaînes de laminine ont certaines structures en commun. Elles partagent des petits domaines globulaires, dont un est impliqué dans la polymérisation de la chaîne. Elles partagent aussi des répétitions de motifs homologues au facteur de croissance épidermique (EGF) qui médient la liaison au nidogène. Le nidogène lie les laminines au collagène de type IV. La chaîne α possède un large domaine carboxy-terminal globulaire (LG), qui contient la majeure partie des sites de liaisons aux intégrines [81]. Les laminines peuvent être synthétisées par les CE et les CML et sont surtout déposées, mais pas exclusivement, dans la MB. Les laminines présentent une variété d'effets biologiques

sur les cellules environnantes, tels que l'adhésion cellulaire, la migration et la différenciation [81]. Elles exercent leurs effets majoritairement par le biais des intégrines. La laminine 1 induit la différenciation des cellules épithéliales. La laminine 5 semble impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire et ces effets sont dépendant de la protéolyse de la laminine par des MMP (MMP-2 et MMP transmembranaire-1). Les laminines 5 et 10 sont prédominantes dans la MB vasculaire et médient l'adhésion des plaquettes, leucocytes et CE [81]. Étant donné les rôles variés des laminines dans la structure des tissus et la fonction des cellules, il n'est pas surprenant qu'elles soient impliquées dans une variété de processus reliés à des maladies. Le rôle des laminines a été intensivement étudié dans l'invasion et les métastases tumorales et l'angiogénèse. Ces études ont démontré que la dérégulation des interactions entre les cellules cancéreuses et la MEC est accompagnée par une synthèse aberrante, une composition des chaînes et des modifications protéolytiques des laminines [81, 83].

1.4.2.2 Le Perlécan et ses domaines

Le nom perlécan provient de sa similarité à un collier de perle en microscopie électronique. Le perlécan (HSPG2) est un HSPG modulaire qui est présent dans la MB et est un des plus gros polypeptide à simple chaîne retrouvé chez les vertébrés et les invertébrés [84]. Le perlécan est constitué de cinq domaines, formés d'unités protéiques qui sont homologues à des molécules impliquées dans le métabolisme des nutriments, la mitogénèse et l'adhésion cellulaire, telles que les immunoglobulines (Ig), les laminines, l'EGF et les récepteurs de LDL. La molécule de perlécan a une

masse d'environ 467 kDa et avec les nombreux oligosaccharides ainsi qu'au moins 4 chaînes d'héparane sulfate (HS) (3 dans le domaine I et potentiellement une dans le domaine V), elle peut atteindre une masse de 800 kDa. Les domaines du perlécan et ses chaînes HS peuvent prendre part à un large éventail d'interactions moléculaires. Les partenaires de liaison incluent plusieurs facteurs de croissance liant l'héparine tels que le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2), le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et le PDGF, ainsi que d'autres protéines de la MB ou de la surface cellulaire [84]. Des résultats démontrent que le perlécan possède des sites spécifiques sensibles à quelques protéases telles que la plasmine, la collagénase de rat (MMP 13) et la stromélysine (MMP3). Ces enzymes permettent une fragmentation en plusieurs endroits de la molécule de perlécan, libérant surtout le domaine I, bien que le domaine V semble aussi très sensible [85].

Les cinq domaines du perlécan :

La figure 3 représente schématiquement la composition du Perlécan. Le domaine I du perlécan est un domaine globulaire contenant 3 chaînes HS attachées à des sites Ser-Gly-Asp. Le domaine II lui, est constitué de 4 copies de répétitions internes similaires au domaine de liaison du ligand du récepteur aux LDL. Le domaine III ressemble au bras court des chaînes de laminine. Il contient 4 sous-domaines consistants en des répétitions riches en cystéine similaires à celles typiquement retrouvées dans les domaines III et V des bras courts des chaînes de laminine α et β . Ces sous-domaines sont séparés par des domaines globulaires homologues au domaine IV du bras court des laminines. Le domaine IV du perlécan quant à lui

contient 21 copies consécutives de répétitions homologues qui sont similaires aux répétitions internes des Ig. Enfin, le domaine V est semblable à l'énorme domaine globulaire carboxy-terminal de la chaîne α des laminines.

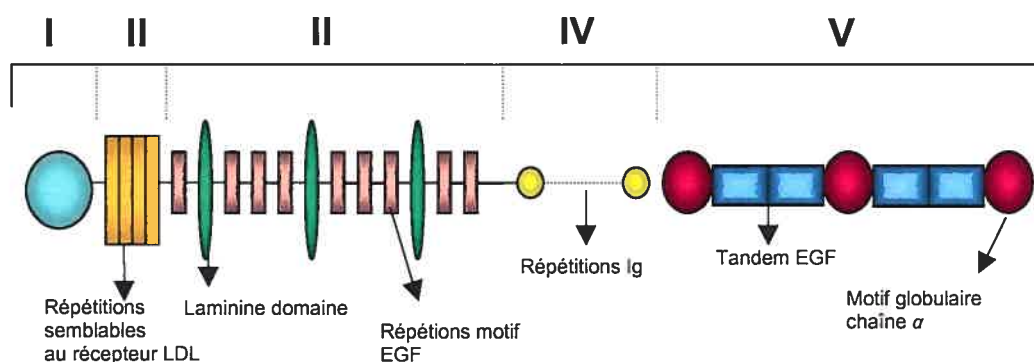


Figure 3. Représentation schématique du perlécan et de ses cinq domaines (I à V)

Le domaine I est un domaine globulaire. Le domaine II est composé de quatre répétitions homologues au domaine interne de liaison du ligand du récepteur aux LDL. Le domaine III est constitué de répétitions EGF typiquement retrouvées dans les domaines III et V des bras courts des laminines, séparés par 3 domaines globulaires des bras courts des laminines. Le domaine IV contient 21 répétitions similaires aux répétitions internes des Ig. Le domaine V est composé de quatre motifs EGF en tandem séparés par des domaines globulaires homologues à la chaîne α des laminines.

Le Domaine V du perlécan (Fig. 4A) est formé de trois domaines globulaires homologues au domaine globulaire carboxy-terminal de la chaîne α des laminines, nommés LG. Ces trois modules LG (LG1, LG2, LG3) sont séparés par des motifs en tandems de séquences similaires aux répétitions internes de l'EGF. Ces structures EGF (EGF 1 à 4) d'environ 40 a.a. possèdent 6 cystéines conservées qui forment des ponts disulfures. Les régions EGF se replient en trois boucles rigides typiques qui

assurent l'exposition des résidus biologiquement actifs comme dans l'EGF où de courts segments ont démontré plusieurs effets prolifératifs et développementaux [86].

A) Domaine V du perlécan



B) Séquence du domaine V du perlécan

Tandem EGF

```

3661 RVVPYFTQTPYSFLPLPTIKDAYRKFEIKITFRPDSADGMLLYNGQKRVPGSPTNLANRQ
3721 PDFISFGLVGGRRPEFRFDAGSGMATIRHPTPLALGHFHTVTLRSLTQGSLVGDLAPVN
3781 GTSQKFKQGLDLNEEL YLGGYPDYGAIPKAGLSSGFIGVRELRIQGEEMVFDLNLTAH
3841 GISHCPTCRDRPCQNGGQCHDSESSSYVCVCPAGFTGSRCEHSQALHCHPEACGPDATCV
3901 NRPDGRGYTCRCHLGRSGLRCEEGVTVTIPSLSGAGSYLALPALTNTHHELRLDVEFKPL
3961 APDGVLLFSGGKSGPVEDFVSLAMVGGHLEFRYELGSGLAVLRSAPLALGRWHRVSAER
4021 LNKDGLSRVNGGRPVLRSPPGKSQGLNLHTLLYLGGVEPSVPLSPATNMSAIFRGCVGEV
4081 SVNGKRLDLTYSFLGSQIGQCYSSPCER QPCQHGATCM PAGEYEFQCLCRDGFKGDLC
4141 EHEENPCQLREPC LHGGTCQ GTRCLCLPGFSGPRCQQSGHGIAESDWHLEGGN DAPG
4201 QYGAYFHDDGFLAFPGHVFSRSLPEVPETIELEVRTSTASGLLLWQGVVEGAGQGKDFI
4261 SLGLQDGHVFRYQLGSGEARLVSEDPINDGEWHRVTALREGRRGSIQVDGEELVSGRSP
4321 GPNVAVNAKGSVYGGAPDVATLTGGRFSSGITGCVKNLVLHSARPGAPPQPLDLQHRA
4381 QAGANTRPCPS

```

C) Schéma des motifs du domaine V du perlécan clonés

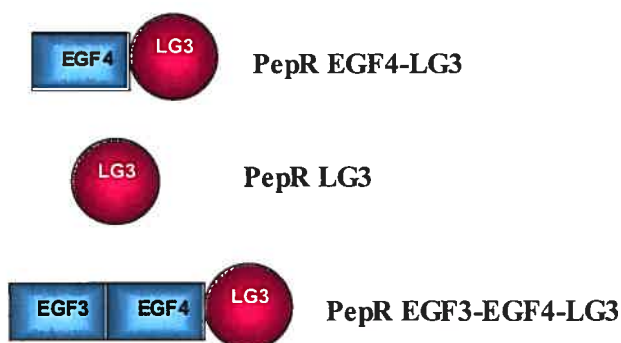


Figure 4. Représentation du Domaine V du perlécan

A) Représentation des motifs constituant le domaine V du Perlécan. B) Séquence en acides aminés du domaine V du perlécan. Les deux motifs en tandem EGF sont encadrés, la séquence du peptide synthétique de 36 a.a. (EGF4-SYNT) est surlignée en bleu. Le site de coupure ND (Asn-Asp) par la

métalloprotéase est surligné en rouge. C) Représentation schématique des motifs du domaine V du perlécan clonés, les peptides recombinants (PepR) EGF4-LG3, LG3 et EGF3-EGF4-LG3.

De plus, la séquence du domaine V contient deux sites Ser-Gly-X-Gly (SGXG) (Fig. 4B) d'attachement potentiel de sucres comme les HS, mais plus probablement pour la chondroïtine sulfate (CS) [87]. Un de ces sites se situe dans le dernier motif EGF (EGF4) à la position 4179 a.a. Le domaine V du perlécan, d'environ 85 kDa, a récemment été renommé Endorepellin par l'équipe du Dr. Iozzo (Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, USA) [88]. Le domaine V est un puissant inhibiteur de la migration des CE veineuses ombilicales d'origine humaines (HUVEC) et a surtout des propriétés anti-angiogéniques lorsque clivé de la molécule de perlécan [88]. Via son domaine LG2, il peut lier l'endostatine et semble contrecarrer ses effets [89]. Le domaine terminal LG3 du domaine V du perlécan semble assumer le plus gros rôle angiostatique. La protéase « bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like », une métalloprotéase de la MEC, clive le domaine V à un site spécifique identifié ND sur la figure 4B, entre Asn4196 et Asp4197, pour générer le module LG3 intact, constituant la partie la plus carboxy-terminale du domaine V du perlécan [90]. La séquence autour du site de clivage est hautement conservée entre les espèces et une mutation Asp4197Ile empêche le clivage du domaine V [90]. En effet, ce site sensible à une protéase, qui génère un fragment débutant avec la séquence DAPGQYG, est conservé entre l'humain et la souris, démontrant qu'un clivage spécifique entre Asn-Asp (N-D) peut survenir près du site amino-terminal du module LG3 [88, 91]. Aussi, des fragments LG3, de masse et de séquence amino-

terminale identiques à celui généré *in vitro* par des cellules en culture, ont été retrouvés dans l'urine de patients en phase terminale atteints de maladies rénales [92] et dans le liquide amniotique de femmes enceintes avec rupture prématurée de la membrane fœtale [93]. Les propriétés bioactives de ce fragment cryptique du domaine V du perlécan restent encore à être découvertes.

La molécule de perlécan est entremêlée dans la MB de la plupart des CE et épithéliales, mais peut aussi être associée à la surface cellulaire via des interactions de haute affinité avec les intégrines, spécialement les $\alpha_2\beta_1$, qui sont les récepteurs principaux du collagène fibrillaire [84]. De plus, le perlécan est exprimé dans les tissus non vascularisés comme le cartilage et une variété de tissus conjonctifs. Donc il n'est pas surprenant que le perlécan soit impliqué dans une panoplie de processus pathologiques tels que l'athérosclérose, l'angiogénèse et le cancer [94-96]. Des mutations non-sens ou un mauvais épissage du gène du perlécan (HSPG2) peuvent causer une maladie récessive, le syndrome non létal de Schwartz-Jampel (SJS), qui affecte la tonicité musculaire. Chez les patients atteints de SJS, une forme tronquée de perlécan manquant le domaine V ou une portion de celui-ci (une délétion de 35 ou 64 a.a. en carboxy-terminal) est sécrétée et partiellement fonctionnelle, entraînant une diminution de l'intégrité de la MB et de la matrice cartilagineuse [97]. Le perlécan comporte un nombre impressionnant d'effets biologiques variés qui dépendent du type cellulaire et de l'environnement [98]. Chez les CML, le perlécan non clivé semble être un inhibiteur de l'adhésion, de la migration et de la prolifération, bien que le mécanisme utilisé n'ait pas été totalement élucidé [98]. En contraste de ses effets

inhibiteurs, le perlécan non clivé peut aussi être un agent pro-angiogénique. Le perlécan inhibe la prolifération des CML et la thrombose artérielle tout en augmentant la prolifération des CE, ce qui pourrait promouvoir une réparation rapide à la suite d'une lésion vasculaire [98]. La bioactivité du perlécan pourrait être dépendante de son origine cellulaire, de changements dans sa structure, de son statut de glycosylation, de sa concentration et de sa cinétique de liaison aux récepteurs cellulaires et surtout de sa protéolyse, ce qui constitue le paradoxe du perlécan [98]. À ce jour, le mécanisme exact de l'action biologique différente du perlécan sur les CE et les CML n'est pas encore bien défini.

1.4.3 Métalloprotéases

Le remodelage de la MEC est le résultat de multiples processus concurrentiels qui varient selon le stimulus initiateur. Par conséquent, les changements structurels et fonctionnels à l'intérieur de la MEC d'un organe qui ont lieu durant une réponse inflammatoire aiguë diffèrent de ceux rencontrés lors du développement ou de l'invasion tumorale [99]. Néanmoins, quelques caractéristiques clés du remodelage tissulaire sont communes à ces processus. Le remodelage au minimum requiert deux événements : la synthèse et la déposition de composants de la MEC d'un côté et leur protéolyse de l'autre côté. Les principales protéases impliquées dans la dégradation de la MEC sont des MMP. Les MMP sont une superfamille de protéases dont plus de 20 MMP humaines et homologues d'autres espèces peuvent cliver pratiquement tous les composants de la MEC [81, 99]. Les MMP sont toutes produites sous forme de

zymogène inactif contenant un propeptide dont le clivage est essentiel à leur activation [99]. Une sous-classe de MMP contient un domaine transmembranaire en plus de son domaine intracellulaire, permettant son insertion dans la membrane cellulaire. L'activité des MMP est contrôlée au moins à trois niveaux : la transcription, l'activation protéolytique de leur forme zymogène et l'inhibition de leur activité enzymatique par des inhibiteurs naturels. La plupart des MMP sont exprimées à un niveau faible et même parfois pas du tout dans la majorité des tissus stables chez l'adulte [81, 99]. Cependant, plusieurs cytokines, facteurs de croissance ainsi que des interactions cellulaires procurent des stimuli pouvant entraîner une induction rapide de l'expression des MMP [99]. Bien que l'activation de la majorité des MMP se fait à l'extérieur de la cellule, quelques MMP, incluant les MMP-11 et -28 ainsi que les MMP liées à la membrane, peuvent être protéolysées par des protéases intracellulaires et même par autoprotéolyse et ainsi être activées à l'intérieur de la cellule avant d'atteindre la membrane cellulaire [99]. Un nombre grandissant de MMP est maintenant reconnu comme étant au moins temporairement localisées à la surface cellulaire, le plus souvent en association à des récepteurs ou des protéoglycanes. Par exemple, la MMP-2 interagit avec le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la MMP-7 lie les HSPG de la surface cellulaire [99]. Récemment, des observations ont démontré que les substrats des MMP pouvaient être autres que les protéines de la MEC. En effet, ces substrats sont aussi variés que des précurseurs de facteurs de croissance, des cytokines et des ligands pour des récepteurs d'adhésion cellulaire [81, 99]. Par exemple, le clivage du perlécan par les MMP-1 ou 3 [99] libère le b-FGF [85] tandis que FasL peut être libéré suite à la protéolyse par la MMP-7 [100]. Les

MMP jouent un rôle essentiel dans les processus physiologiques tels que le développement, le remodelage tissulaire hormone dépendant et la réparation tissulaire [99]. De plus, les MMP jouent aussi un rôle dans certaines conditions pathologiques comme l'inflammation, l'invasion tumorale et les métastases [81].

1.5 Induction d'une résistance à l'apoptose chez les CML

L'apoptose endothéliale est reconnue comme étant un composant important du phénomène de la réponse à l'insulte vasculaire, qui conduit au remodelage et à l'épaississement myointimal. Plusieurs évidences suggèrent que l'acquisition d'une résistance à l'apoptose des CML est un prérequis pour le développement de l'épaississement myointimal. Notre laboratoire a démontré que les CE apoptotiques libèrent des médiateurs solubles dans le milieu (Fig. 5). Brièvement, des HUVEC sont cultivées avec du SS pour 4 h (Fig. 5A). Au cours de ces 4 h d'incubation, les CE entrent en apoptose due à la carence en sérum et libèrent des médiateurs dans le milieu que nous appelons milieu conditionné sans sérum par des CE apoptotiques (SSC) (Fig. 5B). Les CMLr sont incubées avec le SSC pour 24 h ou 48 h ce qui induit une résistance à l'apoptose et une augmentation de leur prolifération, comparativement au milieu contrôle SS [80] (Fig. 5A et B).

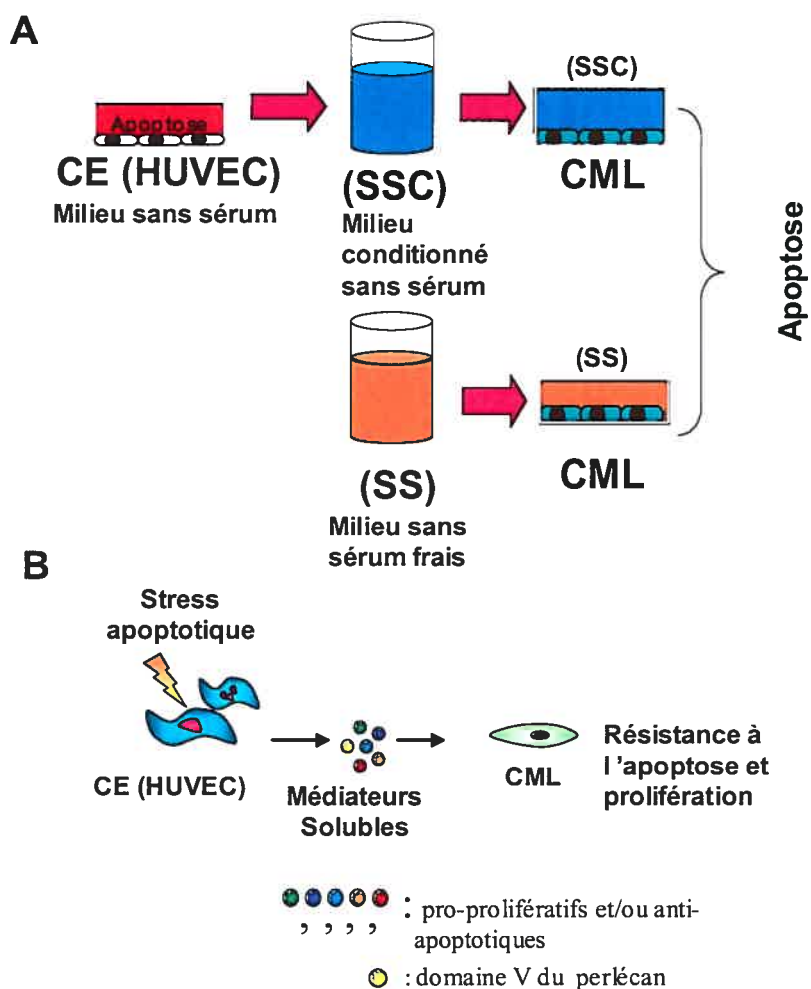


Figure 5. Production de médiateurs solubles par les CE apoptotiques

A) Schéma de la production du milieu conditionné sans sérum par les cellules endothéliales (CE) apoptotiques. Des CE de veines ombilicales humaines (HUVEC) sont soumises à une carence en sérum pendant 4 h. Ces cellules apoptotiques relâchent des médiateurs solubles dans le milieu au cours de cette incubation. Le milieu est récupéré et centrifugé. Le niveau d'apoptose et la prolifération des cellules musculaires lisses de rat (CMLr) exposées au SSC ou SS frais est évalué. B) Schéma récapitulatif des effets des médiateurs produits par les CE apoptotiques sur les CMLr.

Ces résultats suggèrent que le SSC maintient un état prolifératif actif et prévient l'apoptose chez les CMLr. Ces effets sont dépendants de l'activation des caspases

dans les CE apoptotiques, tel que démontré par l'utilisation d'un inhibiteur pan-caspases, le ZVAD-fmk. En effet, le milieu conditionné produit par les CE non-apoptotiques, suite à une pré-incubation avec cet inhibiteur, n'a plus d'effet anti-apoptotique significatif sur les CMLr [80]. Ces derniers résultats suggèrent que la relâche de médiateurs anti-apoptotiques se fait en aval de l'activation des caspases dans les CE apoptotiques. Du côté des CMLr, les résultats montrent une augmentation de Bcl-x_L, au niveau de son ARNm et au niveau protéique, ainsi qu'une suppression de p53 à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines, dans les CMLr exposées pour 24 h au SSC. Le SSC induit une phosphorylation rapide et soutenue de Erk 1/2, une voie de signalisation cellulaire anti-apoptotique et de croissance des CML requise pour le développement de l'épaississement myointimal *in vivo* [101]. L'utilisation d'un inhibiteur de la phosphorylation de Erk 1/2, le PD98059, inhibe l'effet anti-apoptotique du SSC chez les CMLr [80]. Toutes ces données expliqueraient la résistance à l'apoptose retrouvée chez les CMLr suite à leur exposition aux médiateurs du SSC. Afin de caractériser ces médiateurs, le milieu a été concentré et fractionné par ultrafiltration, chaque fraction testée pour son activité biologique et fractionnée une seconde fois par chromatographie d'échange d'ions en FPLC. Des 46 fractions, une seule montrait une activité de survie chez les CMLr. Les fractions ont été analysées par SDS-PAGE et le gel coloré à l'argent, révélant que la fraction bioactive contenait une bande de protéine d'environ 23±2 kDa, qui n'était pas présente dans les autres fractions. Cette bande a été excisée, digérée à la trypsine et identifiée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) comme étant un fragment carboxy-terminal du domaine V du perlécan [80]. L'addition de perlécan

natif à du SS n'inhibe pas l'apoptose des CMLr [80]. Puisque c'est un fragment carboxy-terminal du domaine V du perlécan qui a été retrouvé dans le SSC, ceci suggère que le perlécan natif ne médie pas l'activité biologique retrouvée et que sa protéolyse est essentielle pour la libération du fragment cryptique carboxy-terminal. La séquence du peptide identifiée par spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier précisément son début en amino-terminal. En utilisant ExPASy [102], un serveur de biologie moléculaire, un site de clivage approximatif a été déduit pour le début en amino-terminal, basé sur la masse moléculaire de la bande retrouvée dans la fraction active, soit 23 ± 2 kDa. Ainsi il a été déterminé que le site d'ancrage de sucre (CS ou HS) (SGXG à la position 4179 a.a.), le 4^e motif EGF et le dernier motif LG (LG3) constituent le fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC (on peut revoir la figure 4B). L'ajout de CS ou d'un peptide synthétique représentant le 4^e motif EGF du perlécan (EGF4-SYNT) au SS diminue significativement le développement de l'apoptose chez les CMLr [80]. Par contre, aucun de ses ajouts au SS n'a eu d'effet sur la prolifération des CMLr, laissant croire que ces molécules pourraient être impliquées dans l'activité anti-apoptotique du SSC, mais pas dans son activité pro-proliférative. De plus ces deux molécules ont aussi entraîné l'augmentation du niveau protéique de Bcl-x_L et une phosphorylation soutenue de Erk 1/2 chez les CMLr, pouvant ainsi potentiellement expliquer leur résistance à l'apoptose [80]. Le domaine V du perlécan aurait donc un rôle bioactif réel chez les CMLr, mais ce rôle n'est pas encore très bien caractérisé. En effet, le 3^e motif LG du domaine V n'a pas pu être testé individuellement à ce jour et pourrait avoir un effet additif, voir même tout à fait différent du EGF4-SYNT utilisé jusqu'ici concernant la

réponse anti-apoptotique et la prolifération des CMLr. Le SSC étant un milieu extracellulaire comprenant plusieurs facteurs de croissance et potentiellement d'autres molécules de la MB protéolysées, il ne serait pas étonnant d'attribuer un rôle pro-prolifératif et/ou anti-apoptotique à une de ces molécules qui restent à être identifiées.

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE

2.1 Prémisses

- Certains facteurs de risque pour les maladies vasculaires comme l'athérosclérose et les vasculopathies de transplantation induisent l'apoptose des CE et ce phénomène est loin d'être silencieux et sans répercussions sur l'environnement cellulaire local.
- L'apoptose des CE est un élément initiateur du remodelage vasculaire. Ce remodelage vasculaire se traduit par une augmentation de la résistance à l'apoptose et la prolifération des CML qui mènent à l'épaississement myointimal.
- L'apoptose endothéliale est la clé du phénomène anti-apoptotique observé dans notre système cellulaire *in vitro* utilisant le SSC. Celle-ci conduit à la relâche de médiateurs solubles ayant des propriétés bioactives telles que la protection des cellules à l'apoptose et une augmentation de la prolifération chez les CMLr.
- Un de ces médiateurs peptidiques, un fragment carboxy-terminal du domaine V du perlécan, possède un effet cyto-protecteur sur les CMLr.

- Le domaine V du perlécan est constitué de motifs qui présentent une grande homologie avec certains facteurs de croissance connus tel que l'EGF et à d'autres constituants de la MB comme la laminine.
- Le fragment carboxy-terminal du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC contient un motif EGF (EGF4), un motif LG (LG3) ainsi qu'un site d'attachement pour un sucre (CS ou HS).
- Le EGF4-SYNT induit une protection partielle à l'apoptose chez les CMLr.
- Il a été démontré par une autre équipe que le motif LG3 peut être libéré du domaine V du perlécan suite à une coupure protéolytique par une MMP lorsque le domaine V du perlécan est exprimé dans des cellules humaines.

2.2 Hypothèse

- Un motif EGF ainsi qu'un motif LG se retrouvent dans le fragment de 23 ± 2 kDa isolé du SSC. Nous proposons que ces motifs, seuls ou en combinaison, puissent reproduire l'effet anti-apoptotique et/ou l'effet pro-prolifératif observé avec le SSC sur les CMLr.

2.3 Objectifs

Cloner les différents motifs du domaine V du perlécan dans le but de déterminer quels motifs présents sur la base protéique du perlécan ont une activité anti-apoptotique et pro-proliférative sur les CMLr.

Plus spécifiquement :

- Cloner l'équivalent de la partie carboxy-terminale du domaine V du perlécan isolé du SSC, soit le dernier motif EGF (EGF4) ainsi que le dernier motif LG (LG3).
- Cloner le dernier motif LG (LG3) seul, correspondant au fragment cryptique libéré du domaine V du perlécan suite à une coupure par une MMP.
- Exprimer les motifs clonés dans un système cellulaire eucaryote humain pour produire des peptides recombinants (PepR).
- Purifier les PepR sur une colonne d'affinité pour ensuite tester leurs effets anti-apoptotique et pro-prolifératif individuels sur les CMLr.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Réactifs et leur composition :

3.1.1 Réactifs :

Acide acétique, Acide chlorhydrique, NaCl, Sodium thiosulfate, Sodium carbonate anhydre, Tween 20: Fisher (Nepean, ON, CA)

Acrylamide, colonne d'affinité anti-Hémagglutinine (HA) (anti-HA affinity matrix, rat monoclonal antibody (Clone 3F10), cat. No. 1815016), kit Expand High Fidelity PCR System et le kit de prolifération au BrdU : Roche Diagnostics (Indiannapolis, IN, USA)

Agarose : Amersham Bioscience (Uppsala, Suède)

Ampicilline (50 mg/ml dans l'eau), Aprotinine, Bleu de bromophenol, diméthylsulfoxyde (DMSO), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), Ficol 400, Glycérol, Hoechst 33342 (2'-(4-éthoxyphényl)-5-(4-méthyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1 h-benzimidazole), Igepal, K₂HPO₄, NaF, Phosphate de sodium, Thimerosal : Sigma (Oakville, ON, CA)

Ammonium persulfate (APS) et NNN'N'-tetramethylethylenediamine (TEMED): LKBR-Produkter AB (Bromma, Suède)

Bacto-agar, Extrait de levure, Triptone : DIFCO laboratory (Detroit, MI, USA)

Bis N,N'-Methylene-bis-acrylamide : Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Bromure d'Éthidium (10 mg/ml), Hygromycine B (50 mg/ml dans du PBS 1X), kit TA Cloning contenant le plasmide pCR2.1, plasmide pCDNA 3.1, plasmide pCEP4, Lipofectine, Marqueur de masse moléculaire 1 Kb plus, Opti-MEM, Tris base, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 20 mg/ml dissout dans du N,N dimethyl formamide) : Invitrogen (Burlington, Ontario, CA)

Eau milliQ : eau déionisée, passée sur charbon actif et obtenue par osmose inverse

Enzymes de restriction : EcoRI, HindIII, NotI, SfoI, XmnI, tampons de digestion enzymatique NEB1,2 et 3, tampons de dilution enzymatique NEBA, B et C, Phosphatase alcaline intestinale de veau (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (CIP, 10 U/ μ l) : New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

Éthanol 100 % : Alcool éthylique anhydre, Commercial alcool Inc. (Brampton, Ontario)

Glycérol (stérilisé par autoclave pour microbiologie), Glycine, Milieu de culture DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient mixture F-12 (Ham) 1 :1, L-glutamine, 2,43 g/l sodium bicarbonate, pyridoxine hydrochloride, filtré 0,1

micron), RPMI 1640, solutions de PBS (phosphate buffered saline) 10X pH7,2, Sérum foetal bovin (FBS), Trypsine-EDTA (0,05% trypsine, 0,53 mM EDTA 0.4Na dans HBSS (Hepes buffered saline solution)), : Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)

Kit Superscript II RT-PCR One-Step, One Shot Top10 competent E.coli, QIAEX II gel extraction kit, kit RNAeasy Oligotex mRNA spin-column, QIAprep SPIN MINI-PREP kit, MÉGA-PREP endo-free et MAXI-PREP : QIAGEN Sciences (Maryland, USA)

Kit pour le dosage des protéines à l'acide bicinchoninique (BCA, Bicinchnic acid), SDS (sodium dodecyl sulfate) : Pierce (Rockford, IL, USA)

KOH, NaOH : Analar BDH Chemicals (Montréal, Qc, CA).

Leupeptine, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Sodium Orthovanadate : Calbiochem (San Diego, CA, USA)

Membranes de nitrocellulose pour les immunobuvardages : Mandel Scientific company LTD (Guelf, ON, CA)

Peptide synthétique de 36 a.a. représentant le motif EGF4 du domaine V du perlécan (EGF4-SYNT) : le même peptide qu'utilisé pour la production de l'anticorps anti-

perlécan #1 (voir section anticorps) : Institut de recherche et de biotechnologies du Canada (Montréal, Québec, Canada)

Iodure de Propidium (Pi) : Molecular probes (Eugene, OR, USA)

Plasmide pEGFP contenant le gène de la protéine de fluorescence verte (Green Fluorescent Protein) pour les contrôles de transfections transitoires, gene bank # U55763 : Clonetech (Mountain View, California, USA)

Sodium deoxycholate : Biochemical (Poole, England)

Solution de Phénol-Chloroform-Isoamyle (25 : 24 : 1, v/v) : Boehringer Mannheim Corp. (IN, USA)

Tris et Tris-HCl : ACP (Montréal, Qc, CA)

Anticorps :

Anticorps primaires :

- anti-HA (0,4 mg/ml) clone 12CA5 anticorps de souris monoclonal contre la protéine hémagglutinine du virus de l'influenza humain (catalogue # 1 583 816) Roche Diagnostics.

- Anticorps anti-perlécan : des peptides correspondant à deux parties du domaine V du perlécan ont été synthétisés par la technique de Fmoc en phase solide à l'institut de recherche et de biotechnologies du Canada (Montréal, Québec, Canada) de façon à pouvoir immuniser des lapins pour produire des anticorps polyclonaux. L'analyse de la séquence en acides aminés a été réalisée avec un appareil PerkinElmer API III SCIEX de spectrométrie de masse, pour obtenir un peptide synthétique pur à 100%. Environ 2 mg de chaque peptide synthétique ont été utilisés chez SIGMA GENOSYS (The Woodlands, Texas, USA) pour être conjugués à la protéine KLH (Keyhole limpet hemocyanin) selon la méthode EDC (1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride), au groupe carboxy-terminal du peptide. Une fraction d'environ 5 ml de sérum pre-immun est collectée sur chaque animal. Le peptide conjugué a été injecté sous-cutané en plusieurs sites à deux lapins New Zealand White Rabbit. L'immunisation initiale (jour 0) est donnée dans l'adjuvant complet de Freund et les immunisations subséquentes dans l'adjuvant de Freund incomplet, sur une période de 77 jours (5 immunisations au total : jours 0, 14, 28, 42 et 56). Ensuite des fractions de sérum sont collectées aux jours 49 et 63 et 77. Pour vérifier la production d'anticorps spécifiques, la fraction finale de 131 ml est d'abord testée par ELISA et ensuite immunopurifiée sur une colonne d'affinité préparée par couplage du peptide synthétique immunogène au bromure de cyanogène (CNBr) activé sur billes de sépharose 4B, le tout placé dans une colonne. Le sérum contenant les anticorps est passé sur cette

colonne pour être purifié et récupéré. Toutes ces étapes ont été effectuées par SIGMA GENOSYS. Au total, nous avons reçu 33 mg de chaque anticorps, à une concentration de 1,5 mg/ml. Une fois reçus, les anticorps sont divisés en petits volumes, environ 250 µl, une partie conservée à -20°C et l'autre à -80°C.

Les peptides synthétiques ayant servis à l'immunisation des lapins sont les suivants :

Anti-perlécan #1 : peptide de 36 a.a. représentant le motif EGF4 du domaine V du perlécan (**EGF4-SYN**) a.a. 4147 à 4182
CQLREPC LHGGTCQGTRCLCLPGFSG PRCQQGSGHG.

Anti-perlécan #2 : peptide de 41 a.a. représentant la toute fin du domaine V du perlécan, l'extrémité carboxy-terminale, a.a. 4351 à 4391 :
GITGCVKNLVLHSARP GAPPPQPLDLQHRAQAGANTRPCPS. Cette portion d'acides aminés fait partie du motif LG3 du domaine V du perlécan.

Anticorps secondaires monoclonaux : anti-IgG lapin provenant de chèvre #Ali0404 (0,44 µg/ml) et anti-IgG souris provenant de chèvre #AMI3404 (0,7 mg/ml) conjugués à la HRP (Horse Raddish Peroxidase) : Biosource International (Camarillo, California, USA)

3.1.2 Composition de réactifs complexes :

Milieu de culture bactérien Luria-Bertani (LB) : 10g Bacto-Tryptone, 5g extrait de levure, 5g NaCl pour 1 L d'eau milliQ. Dans le cas du milieu solide : ajout de 15g d'agar au mélange précédent.

Tampon TAE 50X : 242 g Tris-Base, 57.1 ml acide acétique glacial, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), pH ajusté à 8.5 dans 1 L.

Colorant d'ADN 6X : 3.75 g Ficoll 400, 62.5 g de Bleu de bromophénol et 62.5 g de Xylène cyanol dans 52 ml de tampon TAE.

Gel d'agarose 1% : 1 g agarose, 2 ml TAE 50X, 98 ml H₂O, 10 µl bromure d'éthidium (10 µg/ml) pour un total de 100 ml. Chauffer la solution jusqu'à ébullition, laisser tiédir et ajouter le Bromure d'éthidium juste avant de couler le gel.

Tampon TAE 1X avec Bromure d'éthidium : 20 ml TAE 50X, 50 µl de Bromure d'éthidium (10 mg/ml) volume complété à 1 L avec de l'eau milliQ.

Tampon de lyse RIPA pour l'extraction des protéines : 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris (Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane)-HCl, 0,1% SDS, 0,1% sodium deoxycholate et 1% Igepal pH8.0)

Gels de séparation des protéines en condition dénaturante (SDS) SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate-PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) pour les immunobuvardages : gel de concentration de 3,5% (3,5% acrylamide, 0,09% Bis N,N'-Methylene-bis-acrylamide, 0,23 M Tris-HCl pH6.8, 0,1% SDS, 0,9% APS, 0,2% TEMED) et gel de séparation de 12% (12% acrylamide, 0,32% bisacrylamide, 0,75 M Tris-HCl pH8.8, 1% SDS, 0,03 % APS, 0,06% TEMED)

Solution d'Acétate de sodium (NaOAc) 3 M pH 5.2 : 20.41 g de NaOAc (3 H₂O) dans 50 ml H₂O, pH ajusté à 5.2 avec acide acétique glacial.

Tampon CIAP 10X : 0.5 M Tris pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 10 mM Spermidine.

Tampon STE : 10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA

Solution de détachement des anticorps fixés sur une membrane de nitrocellulose : 2% SDS, 100 mM 2-Mercapto éthanol 62,5 mM Tris-HCl pH6.7

Tampons utilisés pour la colonne d'affinité anti-HA :

- Tampon élution : 81 ml de 0,75 g Glycine/ 100 ml H₂O, on ajoute 19 ml de HCl 0.1N, on ajuste à pH3.0
- Tampon de lavage et équilibration : 6,805 g de KH₂PO₄ et 8,709 g de K₂HPO₄ pour 1 L, on ajuste à pH7.0 avec du KOH 1N

- Tampon de neutralisation : 4,295 g K_2HPO_4 / 25 ml H_2O

3.2 Protocoles généraux :

3.2.1 Dosage de l'ADN :

Le rapport d'absorbance, qui est proportionnel à la quantité d'ADN ou d'ARN, de chaque échantillon (dilué 1/20 dans l'eau) se fait à 260/280 nm sur un spectrophotomètre DU 800 BECKMAN COULTER : Beckman Coulter Canada Inc. (Mississauga, Ontario, CA)

3.2.2 Réactions de PCR :

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide du kit Expand High Fidelity PCR System de Roche qui contient l'ADN polymérase, les nucléotides (dNTP) et le tampon de PCR 10X, avec l'appareil GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems (Foster City, CA,USA) (voir description détaillée de chaque réaction de PCR section 3.3)

3.2.3 Isolement d'ARNm, production de cDNA et amplification d'une partie carboxy-terminale du domaine V du perlécan :

La réaction de transcription inverse (RT) pour la production de cDNA total à partir d'ARNm polyA⁺ de HUVEC a été réalisée avec des oligos dT du kit Superscript II

Reverse Transcriptase d'Invitrogen. Brièvement, 10×10^6 cellules HUVEC en condition normale à confluence ont été isolées et ont été utilisées pour purifier l'ARNm polyA+ à l'aide du kit RNaseasy Oligotex. Cet ARNm a été utilisé pour un seul clonage après PCR ; le motif EGF4-LG3 dans le pCDNA3.1, section 3.3.1.

Tous les autres clonages ont été réalisés à partir du **clone I-4** (voir figure 12 en annexe) qui est une partie carboxy-terminale du domaine V du perlécan constituée des motifs EGF3-EGF4-LG3 cloné à partir de l'ARNm polyA+ de HUVEC dans le plasmide pCR2.1 du TA Cloning kit et séquencé, qui était disponible dans le laboratoire au moment de ma maîtrise. Donc une fois les ARNm polyA+ isolés, ceux-ci ont été dosés et 5 μ l (1 μ g) ont été utilisés pour la production de cDNA par une réaction de RT avec 1 μ l d'oligos dT (0,5 μ g / μ l) du kit, 1 μ l de dNTP (100 mM), 6 μ l d'eau : 65°C 5 min, ensuite on place sur glace et on ajoute 4 μ l de tampon 5X du kit, 2 μ l de DTT (0,1 mM). Ce mélange est chauffé à 42°C 2 min, puis on ajoute un 1 μ l de l'enzyme Superscript II (200 U/ μ l), on replace à 42°C pour 50 min. La réaction est stoppée par une incubation à 70°C 15 min. Avec 10% (2 μ l) du cDNA produit, une réaction de PCR a été réalisée pour cloner les motifs EGF3-EGF4-LG3 du domaine V du perlécan avec 10 μ l des oligonucléotides suivants (dilués à 1 pmol/ μ l) :

Oligo sens 5'-ATGGTGTCAGTGAATGGCAAAC-3' et

Oligo anti-sens 5'-CCTCGTAGGCACCTGCCTG-3'

Avec 5 μ l de tampon 10X, 2 μ l de dNTP (100 mM), 1 μ l d'ADN polymérase (3,5 U/ μ l) et 20 μ l d'eau. Préchauffage de 94°C 15 min, suivi par 25 cycles des étapes suivantes : 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min et élongation finale à 72°C 10 min.

Le produit de PCR de 939 pb a été purifié sur gel d'agarose 1% et ensuite inséré et lié dans le plasmide pCR2.1 du kit TA cloning kit de Qiagen. Une fois le clone I-4 contenant la partie amplifiée du domaine V du perlécan purifié, celui-ci a été séquencé et un stock de bactéries contenant ce clone congelé à -80°C. C'est à partir de ce clone I-4 que les PCR des autres clonages ont été réalisés. Il faut mentionner que suite au séquençage, 4 mutations silencieuses ont été retrouvées, qui n'affectent pas la séquence en acides aminés (voir la figure 12 en annexe pour les mutations). Seulement les deux dernières mutations se retrouvent dans les autres clones du domaine V du perlécan.

3.2.4 Migration et visualisation de l'ADN sur gel d'agarose 1% :

L'appareil pour couler et migrer les gels d'agarose qui a été utilisé est le « FisherBiotech mini-midi horizontal unit electrophoresis system » de Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA). Les gels sont migrés dans le tampon TAE 1X (TAE 50X dilué 1/50 dans de l'eau milliQ autoclavée) contenant 500 µg/L de Bromure d'éthidium. On ajoute 10 µl de colorant d'ADN 6X à chaque échantillon avant de remplir les puits du gel. Le gel est migré à 150 volts environ 1 h15. Suite à leur migration sur le gel, la taille des ADN ou ARN (5S, 18S et 28S) est estimée grâce au marqueur de masse moléculaire « 1 Kb plus DNA Ladder » (1 µg/µl) qui est migré dans un puit distinct, sur le même gel que les échantillons. L'ADN migré sur gel peut être visualisé par une exposition aux ultraviolets grâce au bromure d'éthidium ajouté dans l'échantillon et dans le tampon de migration. L'appareil « DyNA Light Dual

Intensity UV Transilluminator » de Labnet National company (Woodbridge, NJ, USA) est utilisé pour visualiser l'ADN migré sur gel d'agarose.

3.2.5 Récupération et purification des produits de PCR :

Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1% pour s'assurer qu'on obtenait une bande de masse attendue selon le PCR réalisé (voir détails des clonages) et que celle-ci était suffisante pour être récupérée. Brièvement, la bande à purifier est excisée du gel (sous forme d'une section de gel d'agarose contenant l'ADN) sous illumination aux UV à l'aide d'une lame de scalpel et est insérée et pesée dans un eppendorf. Par la suite le kit QIAEX II gel extraction de QIAGEN est utilisé pour récupérer l'ADN contenu dans la bande d'agarose. Des billes sur lesquelles l'ADN plasmidique va s'adsorber sont ajoutées à la bande d'agarose pesée, en fonction de la masse moléculaire de celle-ci, ensuite le tout est chauffé à 50°C pour 10 min pour faire fondre l'agarose. Le mélange obtenu est centrifugé et lavé 3 fois et finalement centrifugé 30 sec à 14000g et on récupère le culot de billes auxquelles l'ADN s'est lié. L'ADN est élué des billes avec 20 µl d'eau milliQ et est maintenant prêt à utilisation.

3.2.6 Description des plasmides utilisés :

Les plasmides pCR2.1, pCDNA3.1 et pCEP4-HA possèdent un gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide pEGFP possède le gène de résistance à la kanamycine.

L'ampicilline et la kanamycine servent de moyen de sélection pour n'avoir que les bactéries ayant incorporé un plasmide lors de la transformation. Par exemple, le plasmide pCR2.1 contient le gène de résistance à l'ampicilline qui procure un moyen de survie aux bactéries qui l'expriment. Le site de polyclonage du pCR2.1 se situe dans le gène de LacZ α qui produit la β -galactosidase, un enzyme pouvant dégrader le X-Gal en un produit bleu, colorant ainsi la colonie de bactéries hôtes. Lorsque le gène LacZ α est interrompu par un insert, il n'est plus fonctionnel et les bactéries ayant incorporé le plasmide recombinant après transformation forment des colonies blanches. Il est alors possible de sélectionner les colonies blanches ayant un plasmide contenant un insert en repiquant celles-ci sur une nouvelle plaque ou dans du milieu liquide contenant seulement de l'ampicilline, de façon à obtenir des clones isolés contenant un plasmide recombinant (fig. 6)

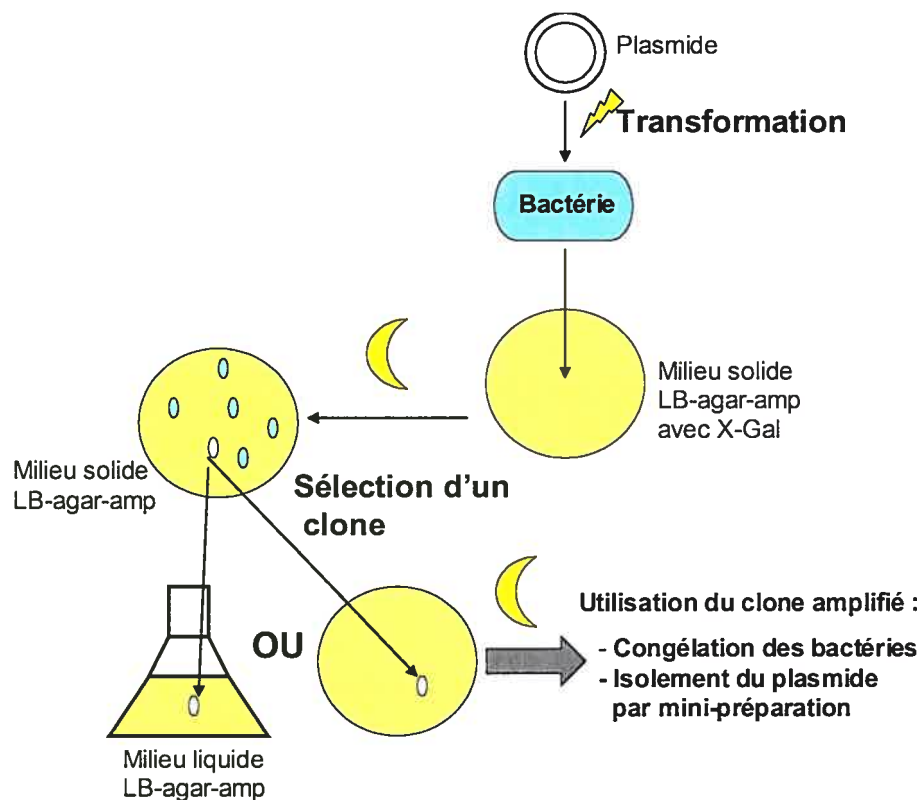


Figure 6. Schéma récapitulatif des étapes de clonage

Transformation plasmidique dans les bactéries chimiquement compétentes, étalement des bactéries transformées sur milieu solide LB-agar-ampicilline (amp) avec X-Gal. Le lendemain, pour isoler une colonie blanche celle-ci est repiquée soit dans du milieu liquide soit sur un milieu solide contenant de l'ampicilline. Le lendemain encore, les bactéries contenant le clone amplifié sont récupérées pour utilisation ; soit pour être congelées, soit pour récupérer les plasmides par mini-préparation d'ADN.

Plasmide pCR2.1 : Le plasmide est fourni sous forme ouverte avec des extrémités cohésives formées par un nucléotide T non apparié, permettant l'incorporation d'un fragment d'ADN cohésif possédant un nucléotide A non apparié, sans le recours à des enzymes de restrictions. La polymérase utilisée pour les réactions de PCR à la particularité d'ajouter le nucléotide A non apparié en 3' du produit de PCR. Ainsi, il

est possible de lier directement le produit de PCR dans le pCR2.1 sans avoir besoin de modifier les extrémités du fragment amplifié par PCR. Le produit de PCR lié se retrouve entre deux sites EcoRI, permettant sa sortie du plasmide par une digestion enzymatique EcoRI. Tel que mentionné plus haut, ce plasmide possède le gène LacZ α , permettant de sélectionner les bactéries ayant un plasmide contenant un insert.

Plasmide pCDNA3.1 : Ce plasmide possède entre autre un gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur CMV permettant l'expression de protéines recombinantes dans un système eucaryote. Dans son site de polyclonage, il y a un site de restriction EcoRI permettant le sous-clonage à partir du plasmide pCR2.1. En 3' loin du site de polyclonage, il y a un site de restriction SfoI, qui permet de déterminer l'orientation des inserts suite à une digestion, car on retrouve aussi un site SfoI dans les motifs clonés du domaine V du perlécan.

Plasmide pCEP4-HA : Ce plasmide possède un site de restriction XmnI qui ne se retrouve pas dans le site de polyclonage permettant la linéarisation du plasmide sans affecter l'insert cloné. Le plasmide possède le gène de résistance à l'Hygromycine B, un agent de sélection cellulaire eucaryote et un gène de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide a été créé par l'équipe du Dr. Bertrand (CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, CA) par l'ajout de trois séquences consécutives de l'épitope hémagglutinine (HA) par clonage. Cet épitope a été cloné HindIII-NotI, soit en 3' du promoteur CMV et du site d'initiation de la traduction, de façon à produire le

peptide HA. Les inserts sont introduits NotI-NotI, à la suite et dans le même cadre de lecture que l'épitope HA, celui-ci se retrouvant en carboxy-terminal de la protéine de fusion recombinante. Nous avons utilisé le plasmide contenant l'épitope HA disponible, il n'y avait pas de plasmide équivalent avec l'épitope HA en N-terminal.

3.2.7 Ligation des inserts dans les plasmides appropriés :

La ligase et le tampon de ligation utilisés pour toutes les réactions de ligation et pour tous les clonages proviennent du kit de clonage TA cloning. En bref la réaction de ligation se fait dans un incubateur à 14°C pour environ 16 h. 6 µl de l'insert purifié est mélangé au plasmide de réception ouvert de façon enzymatique, excepté pour le plasmide pCR2.1 (0,025 µg /µl) du kit TA cloning qui est déjà ouvert et stable dans le kit, 1 µl de tampon de ligation 10X et 1 µl de ligase (1 U/µl) sont ajoutés au mélange, le volume de réaction complété à 10 µl avec de l'eau milliQ et le tout est incubé dans un eppendorf pour la nuit. À la fin de l'incubation, le produit de ligation est entreposé tel quel à -20°C jusqu'à son utilisation pour une transformation bactérienne. (voir détails des clonages pour les quantités exactes utilisés dans chaque cas)

3.2.8 Réaction de Phosphatase Alcaline (CIP) :

Cette réaction est utilisée pour déphosphoryler les plasmides avant la réaction de ligation dans le but d'éviter qu'ils se referment sur eux-mêmes et qu'ils n'incorporent

pas l'insert. Précipiter le plasmide préalablement ouvert par digestion enzymatique, avec la technique de précipitation au Phénol-Chloroforme (voir 3.2.12) et resuspendre dans 3 μl de tampon Tris 10 mM pH 8.0. Ajouter 5 μl de tampon CIAP 10X, 40 μl d'eau milliQ et 1 μl de l'enzyme CIP (10 U/ μl). Incuber à 37°C 30 min. Inactiver l'enzyme en ajoutant 10 μl de tampon STE 10X, 5 μl de SDS 10% (dilué dans l'eau milliQ) et 40 μl d'eau milliQ. Incuber à 68°C 15 min. Précipiter le plasmide déphosphorylé au Phénol-Chloroforme et le resuspendre dans un volume approprié d'eau milliQ.

3.2.9 Transformation des produits de ligation :

Le produit de ligation est utilisé tel quel pour la transformation. Le protocole utilisé est celui fourni avec le kit One Shot Top10 d'Invitrogen. Un eppendorf contenant 50 μl de bactéries chimiquement compétentes *Escherichia coli* (DH5- α) est dégelé sur glace pour chaque transformation. On ajoute 2 μl de produit de ligation aux bactéries dégelées en mélangeant très doucement. Le mélange est incubé sur glace 30 min. Ensuite on fait subir un choc thermique aux bactéries à 42°C pour 30 sec dans un bain, ce qui permet l'entrée de l'ADN plasmidique dans la cellule et on replace sur glace. On ajoute immédiatement 250 μl de milieu SOC (contenu dans le kit) à température pièce et on incube à 37°C dans un bain avec agitation légère (225rpm) pour 1 h. À la toute fin de cette incubation, on étale 10, 25 et 50 μl de bactéries transformées sur des plaques de milieu de culture bactérien solide LB-agar contenant l'antibiotique approprié et du X-Gal. Les plaques sont incubées pour la nuit à 37°C.

Trois quantités sont utilisées pour l'étalage des bactéries de façon à obtenir des clones isolés le lendemain qui seront repiqués individuellement soit sur de nouvelles plaques LB-agar soit dans 5 ml de milieu LB, selon l'utilisation prévue.

3.2.10 Microbiologie :

Les bactéries ont été amplifiées et cultivées dans du milieu LB, soit liquide, soit solide (LB-agar), toute la nuit à 37°C, dans un incubateur de table pour le milieu solide et dans un incubateur avec agitation pour le milieu liquide. Le milieu LB solide contient de l'agar pour solidification et est coulé dans des boîtes de pétri, contenant 25 ml. On ajoute l'antibiotique approprié une fois le milieu tiédi mais encore liquide. Les bactéries sont étalées sur une plaque de milieu solide LB-agar ou inoculées dans 5 ml de milieu liquide LB selon le cas. À chaque isolation d'un clone important de chaque étape de clonage (clones contenant un insert), les clones sont conservés par congélation afin d'avoir un stock pouvant être amplifié si besoin. Brièvement, le culot de bactéries contenant le clone à congeler est récupéré suite à une centrifugation 14000g 30 sec du milieu liquide inoculé la veille et ce culot est re-suspendu jusqu'à homogénéisation dans 1 ml d'un mélange de glycérol stérile/LB (50/50) et congelé à -80°C. Les bactéries contenant les plasmides servant au clonage sont amplifiées et conservées de la même façon que les clones, de façon à avoir un stock de plasmides de clonage.

3.2.11 Extraction de l'ADN plasmidique :

Extraction des plasmides contenus dans les colonies bactériennes après transformation. Le kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN a été utilisé pour toutes les mini-préparations d'ADN plasmidique. La réalisation de mini-préparation d'ADN fournit suffisamment d'ADN pour la digestion enzymatique, ligation, congélation, et séquençage. Pour les besoins plus grands en ADN comme pour les transfections ou stock congelés de plasmides, les kits MÉGA-PREP endo-free et MAXI-PREP de QIAGEN ont été utilisés. Brièvement, la procédure est basée sur une lyse alcaline des bactéries amplifiées dans le milieu liquide ou sur du milieu solide suivie par l'adsorption spécifique de l'ADN sur une membrane de silice en présence d'une concentration élevée en sels. L'ADN est ensuite élué et prêt à utilisation.

3.2.12 Précipitation de l'ADN au Phénol-Chloroforme :

Cette précipitation sert à récupérer de l'ADN d'une solution aqueuse pour le concentrer. Ajouter un volume égal du mélange Phénol-Chloroforme-Alcool Isoamylique à la solution d'ADN à précipiter et vortexer. Centrifuger à 14000g 30 sec. Récupérer la phase aqueuse du dessus contenant l'ADN dans un nouveau tube. Ajouter 1/10 de volume d'Acétate de sodium 3 M pH5.2 (NaOAc) et vortexer. Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% froid et vortexer. Placer le tube à -20°C environ 15 min pour aider la précipitation de l'ADN. Centrifuger 20 min, 14000g à 4°C. Enlever le surnageant en prenant soin de ne pas déranger le culot d'ADN. Ajouter 2

volumes d'éthanol 70% froid sans déranger le culot, ne pas agiter le tube. Centrifuger une dernière fois 20 min, 14000g à 4°C. Retirer tout le surnageant et laisser sécher le culot d'ADN à l'air libre à température pièce. Une fois le culot sec, resuspendre l'ADN dans un volume approprié d'eau milliQ, d'eau stérile ou de tampon selon le cas.

3.3 Protocoles détaillés des clonages :

3.3.1 Motif EGF4-LG3 dans pCDNA3.1:

Pour ce clonage seulement, le PCR a été réalisé à partir d'un mélange de cDNA total produit à partir des ARNm polyA+ de HUVEC (voir section 3.2.3) avec des oligos dT du kit Superscript II Reverse Transcriptase d'Invitrogen. Le PCR a été fait à partir de 2 µl du mélange des cDNA produit et avec 10 µl des oligonucléotides suivants (dilués à 1 pmol/µl):

Oligo sens : 5'-ATGTGCCAGCTCCGTGAACC-3' et

Oligo anti-sens : 5'-CCTCGTAGGCACCTGCCTG-3'

Préchauffage de 94°C 15 min, suivi par 25 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 64°C 45 sec, 72°C 45 sec terminé par une élongation finale à 72°C 8 min.

Le produit de PCR a été migré sur gel agarose 1% et la bande d'environ 750 pb correspondant au segment amplifié attendu a été excisée et purifiée par la technique d'extraction décrite dans la section 3.2.5. Ensuite, 6 µl du produit de PCR purifié ont

été liés dans le pCR2.1 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2 μl utilisés) tel que décrit dans la section 3.2.7. Transformation de 2 μl du produit de ligation selon protocole décrit dans la section 3.2.9. Le produit de transformation a été étalé sur trois plaques de milieu LB-agar contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline et 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de X-Gal. Le lendemain, 7 colonies blanches ont été repiquées sur une nouvelle plaque avec ampicilline et incubée à 37°C pour la nuit. Le lendemain, trois de ces colonies (clone 1-1, 1-2 et 1-4) sont repiquées dans 5 ml de milieu LB contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline pour expansion des bactéries. Ensuite le milieu contenant les bactéries amplifiées est utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmidique par mini-préparation d'ADN décrit dans la section 3.2.11. L'ADN récupéré est dosé et 2 μg sont digérés par l'enzyme EcoRI car cet enzyme permet de vérifier la présence ou non d'un insert. Donc 2 μg d'ADN sont mélangés avec 1 μl EcoRI (10 U/ μl), 2 μl de tampon de digestion pour EcoRI 10X et le volume de la réaction complété à 20 μl avec de l'eau milliQ, le tout est incubé dans un bain à 37°C pour 3 h. Les produits de digestion sont migrés sur gel d'agarose 1% tel que décrit dans la section 3.2.4. Les 3 clones visualisés sur le gel possédaient un insert de masse attendu (environ 750 pb). Le clone 1-2 a été séquencé et un stock de bactéries (voir section 3.2.6 ; culture bactérienne) à été fait avec les 3 clones possédant un insert : 1-1, 1-2 et 1-4.

3.3.1.1 Sous clonage du clone 1-2 motif EGF4-LG3 dans le pCDNA3.1 :

Suite à l'analyse du séquençage du clone 1-2, l'insert a été sorti du pCR2.1 par digestion EcoRI pour être sous-cloné EcoRI-EcoRI dans le pCDNA3.1. L'insert obtenu suite à la digestion EcoRI (5 μg du clone 1-2, même protocole que ci haut) a

été purifié sur gel d'agarose 1% (tout le contenu de la digestion est mis sur gel) inséré et lié dans le plasmide pCDNA3.1 préalablement ouvert suite à une digestion EcoRI (1 µg de plasmide digéré, même protocole que ci haut suivi d'une incubation à 65°C 20 min pour inactiver l'enzyme) tel que décrit dans la section 3.2.7. Ligation : plasmide 1 µl (50 ng*) et 2 µl d'insert purifié (~350 ng*) (* : Lorsque les concentrations des plasmides et des inserts ne sont pas indiquées, c'est qu'elles n'étaient pas disponibles, faute de dosage). Transformation du produit de ligation et étalage des bactéries sur trois plaques de LB-agar contenant 50 µg/ml d'ampicilline. Après incubation toute la nuit, 15 colonies (clones I-1 à I-15) sont repiquées dans 5 ml de LB-agar-amp (50 µg/ml). Le lendemain, les clones repiqués sont utilisés pour une mini-préparation. Digestion EcoRI des clones isolés par mini-préparation d'ADN tel que décrit ci haut pour voir la présence d'un insert, clones I-2, I-4, I-11 et I-14 avaient un insert de la bonne taille (750 pb). L'orientation des inserts a ensuite été vérifiée sur gel agarose 1% suite à une digestion avec l'enzyme SfoI : 2 µl de tampon de digestion NEB2 10X, 1 µg d'ADN plasmidique, 1 µl de SfoI (1 U/µl), volume de la réaction complété à 20 µl avec de l'eau milliQ et incubation dans un bain à 37°C pour 2 h. SfoI coupe dans la portion 3' de l'insert presque à sa toute fin et aussi en 3' du site de polyclonage de pCDNA3.1, ce qui permet de déterminer l'orientation de l'insert une fois visualisé sur gel. En effet, dépendamment de l'orientation de l'insert dans le plasmide, les fragments obtenus après digestions seront de tailles différentes. Deux clones, I-11 et I-14 avaient un seul insert qui était dans la bonne orientation, ces deux clones ont été séquencés et un stock bactérien a été congelé. Deux stocks plasmidiques du clone PCR#1-2 I-14 qui s'est avéré parfait au séquençage ont été

réalisés avec les kits MÉGA-PREP endo-free et MAXI-PREP de QIAGEN et conservés à -80 °C.

3.3.2 Motif LG3 :

Le PCR a été réalisé à partir de 1 µl du clone I-4 (voir section 3.2.3) avec 10 µl des oligonucléotides suivants (dilués à 1 pmol/µl):

Oligo sens : 5'-ATGGATGCCCTGGGCAGTA-3' et

Oligo anti-sens : 5'- CCTCGTAGGCACCTGCCTG -3'

Préchauffage de 15 min à 94°C suivi de 25 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 62°C 45 sec, 72°C 45 sec. Terminé par une élongation finale à 72°C 8 min.

Le produit de PCR a été migré sur gel agarose 1% et la bande de 599 pb correspondant au segment amplifié attendu a été excisée et purifiée par la technique d'extraction. Ensuite 6 µl du produit de PCR purifié ont été insérés et liés dans le pCR2.1 (µg/µl, 2 µl utilisés). Transformation de 2 µl du produit de ligation. Le produit de transformation a été étalé sur trois plaques de milieu LB-agar-amp (50 µg/ml) contenant 40 µg/ml de X-Gal et incubée à 37°C. Le lendemain, 7 colonies blanches ont été repiquées sur une nouvelle plaque LB-agar-amp (50 µg/ml) incubée à 37°C pour la nuit. Le lendemain, trois de ces colonies (clone 2-1S, 2-3 et 2-5S) sont repiquées dans 5 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline pour expansion des bactéries. Le lendemain encore les bactéries amplifiées sont utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique cloné par mini-préparation d'ADN. L'ADN récupéré est dosé et 2 µg sont digérés par l'enzyme EcoRI 1 µl (10 U/µl), 2 µl de

tampon de digestion NEB pour EcoRI 10X et le volume de la réaction complété à 20 μ l avec de l'eau milliQ, le tout est incubé dans un bain à 37°C pour 3 h. Les produits de digestion sont migrés sur gel d'agarose 1% et visualisés. Les 3 clones possédaient un insert de masse attendue soit environ 599 pb. Le clone 2-1S a été séquencé et un stock de bactéries (voir section culture bactérienne 3.2.6) a été fait avec les 3 clones possédant un insert : 2-1S, 2-3 et 2-5S.

3.3.2.1 Sous clonage du clone 2-1S motif LG3 dans le pCDNA3.1 :

Suite à l'analyse du séquençage du clone 2-1S, l'insert a été sorti du pCR2.1 par digestion EcoRI pour être sous-cloné EcoRI-EcoRI dans le pCDNA3.1. L'insert obtenu suite à la digestion EcoRI (5 μ g du clone 1-2, même protocole que ci-haut) a été purifié sur gel d'agarose 1% (tout le contenu de la digestion est mis sur gel) inséré et lié dans le plasmide pCDNA3.1 préalablement ouvert suite à une digestion EcoRI (1 μ g de plasmide digéré, même protocole que ci-haut suivi d'une incubation à 65°C 20 min pour inactiver l'enzyme). Ligation : plasmide pCDNA3.1 1 μ l (50 ng) et 2 μ l d'insert purifié (~350 ng). Transformation du produit de ligation et étalage des bactéries sur trois plaques de LB-agar-amp (50 μ g/ml). Après incubation toute la nuit, 20 colonies (clones II-1C à II-20C) sont repiquées sur plaque LB-agar-amp (50 μ g/ml). Le lendemain, les clones repiqués la veille sont utilisés pour une mini-préparation d'ADN. Digestion EcoRI des clones isolés par mini-préparation d'ADN tel que décrit ci haut pour voir la présence d'un insert, les clones II-3C, II-4C II-11C et II-18C avaient un insert de la bonne taille. L'orientation des inserts a ensuite été vérifiée par digestion avec l'enzyme SfoI : 2 μ l de tampon de digestion NEB2 10X, 1

μg d'ADN plasmidique, 1,5 μl de SfoI (1 U/ μl), volume de la réaction complété à 20 μl avec de l'eau milliQ et incubation dans un bain à 37°C pour 2 h. Deux clones, II-3C et II-18C avaient un seul insert dans la bonne orientation, ces deux clones ont été séquencés et un stock bactérien congelé. Deux stocks plasmidiques du clone PCR#2-1S II-3C qui s'est avéré parfait au séquençage ont été réalisés avec les kits MÉGA-PREP endo-free et MAXI-PREP de QIAGEN et conservés à -80 °C.

3.3.3 Motif EGF4-LG3 pour expression avec l'épitope HA

Le PCR a été réalisé à partir de 1 μl du clone I-4 (voir section 3.2.3) avec 10 μl des oligonucléotides suivants (dilués à 1 pmol/ μl) contenant le site de restriction NotI pour pouvoir sous cloner NotI-NotI en 3' de l'épitope HA dans le plasmide pCEP4-HA:

Oligo sens NotI: 5'-GCGGCCGCTGCCAGCTC-3' et

Oligo anti-sens NotI : 5'-CCCTCGTAGGCGGCCGC-3'

Préchauffage de 94°C 10 min, suivi par 5 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 45 sec pour faciliter l'appariement des oligonucléotides qui ne semblait pas bien se faire en une seule étape à 62 °C. Ensuite 20 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 62°C 45 sec, 72°C 45 sec terminé par une élongation finale à 72°C 8 min.

Le produit de PCR a été migré sur gel agarose 1% et la bande de 754 pb correspondant au segment amplifié attendu a été excisée et purifiée par la technique d'extraction. Ensuite 6 μl du produit de PCR purifié ont été insérés et liés dans le

pCR2.1 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2 μl utilisés). Transformation de 2 μl du produit de ligation. Le produit de transformation a été étalé sur trois plaques de milieu LB-agar-amp (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) contenant 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de X-Gal et incubée à 37°C. Le lendemain, 7 colonies blanches ont été repiquées sur une nouvelle plaque incubée à 37°C pour la nuit. Le lendemain, 4 de ces colonies (clone 4-1, 4-4, 4-5 et 4-6) sont repiquées dans 5 ml de milieu LB contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline pour expansion des bactéries. Le lendemain encore les bactéries sont utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique par mini-préparation d'ADN. L'ADN récupéré est dosé et 2 μg sont digérés par l'enzyme EcoRI 1 μl (10 U/ μl), 2 μl de tampon de digestion NEB pour EcoRI 10X et le volume de la réaction complété à 20 μl avec de l'eau milliQ, le tout est incubé dans un bain à 37°C pour 3 h. Les produits de digestion sont migrés sur gel d'agarose 1% et visualisés. Les 4 clones possédaient un insert de masse attendue soit environ 754 pb. Les clones 4-1 et 4-5 ont été séquencés et un stock de bactéries a été fait avec les 4 clones possédant un insert.

3.3.3.1 Sous clonage du clone 4-4 motif EGF4-LG3 dans pCEP4-HA :

Suite à l'analyse du séquençage du clone 4-4, l'insert a été sorti du pCR2.1 par digestion NotI pour être sous-cloné NotI-NotI dans le pCEP4-HA. L'insert obtenu suite à la digestion NotI (8 μg du clone 4-4, 4 μl tampon digestion NEB3 10X, 4 μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μl NotI (10 U/ μl) volume de la réaction complété à 40 μl avec de l'eau milliQ et incubation toute la nuit à 37°C) est purifié sur gel d'agarose 1% (tout le contenu de la digestion est mis sur gel) inséré et lié dans le plasmide pCEP4-HA préalablement ouvert suite à une digestion NotI : 5,6 μg de plasmide digéré, même

protocole que ci-haut suivi d'une précipitation au phénol-chloroforme et d'une déphosphorylation du vecteur pour l'empêcher de se refermer sur lui-même (voir sections 3.1.10 et 3.1.11). Ligation : plasmide 4 μ l (~800 ng) et 2 μ l d'insert purifié (~2 μ g). Transformation du produit de ligation (4 μ l au lieu de 2 μ l habituellement utilisés) et étalage des bactéries sur trois plaques de LB-agar-amp (50 μ g/ml). Après incubation toute la nuit, 10 colonies (clones IV-1 à IV-10) sont repiquées sur plaque LB-agar-amp (50 μ g/ml). Le lendemain, les clones repiqués sont utilisés pour une mini-préparation d'ADN. Double digestion HindIII/SfoI des clones isolés par mini-préparation d'ADN pour voir la présence d'un insert : 1 μ g de plasmide, 2 μ l de tampon de digestion NEB2 10X, 1 μ l SfoI (8 U/ μ l), 1 μ l HindIII (10 U/ μ l) volume de la réaction complété à 20 μ l avec de l'eau milliQ et incubation dans un bain à 37°C pour 2 h. Ici on peut utiliser 2 enzymes pour déterminer en même temps la présence et l'orientation de l'insert dans le plasmide. SfoI coupe dans l'insert et HindIII dans le plasmide pCEP4-HA au tout début du site de polyclonage, juste avant l'épitope HA. Les clones IV-1, IV-4, IV-9, IV-10 avaient un insert de la bonne taille et dans la bonne orientation. Deux clones (PCR#4-4 IV-9 et PCR#4-4 IV-10) ont été séquencés et un stock bactérien des 4 clones avec insert congelé. Un stock plasmidique du clone PCR#4-4 IV-10 qui s'est avéré parfait au séquençage a été réalisé avec le kits MÉGA-PREP endo-free de QIAGEN et conservé à -80 °C.

3.3.4 Motif LG3 pour expression avec l'épitope HA :

Le PCR a été réalisé à partir de 1 μ l du clone I-4 (voir section 3.2.3) avec 10 μ l des oligonucléotides suivants (dilués à 1 pmol/ μ l) contenant le site de restriction NotI pouvoir sous cloner NotI-NotI en 3' de l'épitope HA dans le plasmide pCEP4-HA:

Oligo sens NotI : 5'-GCGGCCGCGATGCCCCT-3' et

Oligo anti-sens NotI : 5'- CCCTCGTAGGCGGCCGC -3'

Préchauffage de 94°C 3 min, suivi par 25 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec terminé par une élongation finale à 72°C 5 min.

Le produit de PCR a été migré sur gel agarose 1% et la bande de 604 pb correspondant au segment amplifié attendu a été excisée et purifiée par la technique de gel extraction. Ensuite 6 μ l du produit de PCR purifié ont été insérés et liés dans le pCR2.1 (μ g/ μ l, 2 μ l utilisés). Transformation de 2 μ l du produit de ligation. Le produit de transformation a été étalé sur trois plaques de milieu LB-agar-amp (50 μ g/ml) contenant 40 μ g/ml de X-Gal et incubées à 37°C. Le lendemain, 15 colonies blanches ont été repiquées sur une nouvelle plaque LB-agar-amp (50 μ g/ml) incubée à 37°C pour la nuit. Le lendemain, 10 de ces colonies (clone 5-B1 à 5-B10) sont repiquées dans 5 ml de milieu LB contenant 50 μ g/ml d'ampicilline pour expansion des bactéries. Le lendemain le milieu contenant les bactéries utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmidique par mini-préparation d'ADN. L'ADN récupéré est dosé et 2 μ g sont digérés par l'enzyme EcoRI 1 μ l (10 U/ μ l), 2 μ l de tampon de digestion NEB pour EcoRI 10X et le volume de la réaction complété à 20 μ l avec de l'eau milliQ, le tout est incubé dans un bain à 37°C pour 3 h. Les produits de digestion sont migrés sur gel d'agarose 1% et visualisés. Les clones 5-B1, 5-B2, 5-B3, 5-B5 et 5-B7

possédaient un insert de masse attendue soit environ 604 pb. Tous les clones ayant un insert ont été séquencés et un stock de bactéries a été fait avec ces clones.

3.3.4.1 Sous clonage du clone 5-B3 motif LG3 dans pCEP4-HA :

Suite à l'analyse du séquençage du clone 5-B3, l'insert a été sorti du pCR2.1 par digestion NotI pour être sous-cloné NotI-NotI dans le pCEP4-HA. L'insert obtenu suite à la digestion NotI (5 µg du clone 5-B3, 4 µl tampon digestion NEB3 10X, 4 µl BSA (1 µg/µl), 2 µl NotI (10 U/µl) volume de la réaction complété à 40 µl avec de l'eau milliQ et incubation 5 h à 37°C) a été purifié sur gel d'agarose 1% (tout le contenu de la digestion est mis sur gel) inséré et lié dans le plasmide pCEP4-HA préalablement ouvert suite à une digestion NotI : 5,6 µg de plasmide digéré, même protocole que ci-haut, suivi d'une précipitation au phénol-chloroforme et d'une déphosphorylation du vecteur pour l'empêcher de se refermer sur lui-même (voir sections 3.1.8 et 3.1.12). Ligation : plasmide 4 µl (~800 ng) et 2 µl d'insert purifié (~2 µg). Transformation du produit de ligation (4 µl au lieu de 2 µl habituellement utilisés) et étalement des bactéries sur trois plaques de LB-agar-amp (50 µg/ml). Après incubation toute la nuit, 10 colonies (clones V-1 à V-10) sont repiquées sur plaque LB-agar-amp (50 µg/ml). Le lendemain, les clones repiqués la veille sont utilisés pour une mini-préparation d'ADN. Double digestion HindIII/SfoI des clones isolés par mini-préparation d'ADN pour voir la présence d'un insert : 1 µg de plasmide, 2 µl de tampon de digestion NEB2 10X, 1 µl SfoI (8 U/µl), 1 µl HindIII (10 U/µl) volume de la réaction complété à 20 µl avec de l'eau milliQ et incubation dans un bain à 37°C pour 2 h. Ici encore on peut utiliser deux enzymes pour

déterminer en même temps la présence et l'orientation de l'insert dans le plasmide. SfoI coupe dans l'insert et HindIII dans le plasmide pCEP4-HA. Les clones V-1, V-2, V-5, V-10 avaient un insert de la bonne taille et dans le bon sens. Deux clones (PCR#5-B3 V-2 et PCR#5-B3 V-10) ont été séquencés et un stock bactérien des 4 clones avec insert a été congelé. Un stock plasmidique du clone PCR#5-B3 V-10 qui s'est avéré parfait au séquençage a été réalisé avec le kits MÉGA-PREP endo-free de QIAGEN et conservé à -80 °C.

3.3.5 Motif EGF3-EGF4-LG3 pour expression avec l'épitope HA:

Le PCR a été réalisé à partir du clone I-4 (voir section 3.2.3) avec 10 µl des oligonucléotides suivants (dilués à 1 pmol/µl) contenant le site de restriction NotI pour pouvoir sous cloner NotI-NotI en 3' de l'épitope HA dans le plasmide pCEP4-HA :

Oligo sens NotI : 5'-GCGGCCGCGTGTTCAGTGA-3' et

Oligo anti-sens NotI : 5'- CCCTCGTAGGCGGCCGC -3'

Préchauffage de 94°C 10 min, suivi par 5 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 45 sec pour faciliter l'appariement des oligonucléotides qui ne semblait pas bien se faire en une seule étape à 62 °C. Ensuite 20 cycles des étapes suivantes : 94°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec terminé par une élongation finale à 72°C 8 min.

Le produit de PCR a été migré sur gel agarose 1% et la bande de 955 pb correspondant au segment amplifié attendu a été excisée et purifiée par la technique

de gel extraction. Ensuite 6 μl du produit de PCR purifié ont été insérés et liés dans le pCR2.1 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2 μl utilisés). Transformation de 2 μl du produit de ligation. Le produit de transformation a été étalé sur trois plaques de milieu LB-agar-amp (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) contenant 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de X-Gal et incubées à 37°C. Le lendemain, 15 colonies blanches ont été repiquées sur de nouvelles plaques incubées à 37°C pour la nuit. Le lendemain, 8 de ces colonies (clones DomV-NotI-1 à DomV-NotI-8) sont repiquées dans 5 ml de milieu LB contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline pour expansion des bactéries. Suite à l'expansion des bactéries elles sont utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique par mini-préparation d'ADN. L'ADN récupéré est dosé et 2 μg sont digérés par l'enzyme EcoRI 1 μl (10 U/ μl), 2 μl de tampon de digestion NEB pour EcoRI 10X et le volume de la réaction complété à 20 μl avec de l'eau milliQ, le tout est incubé dans un bain à 37°C pour 3 h. Les produits de digestion sont migrés sur gel d'agarose 1% et visualisés. Tous les clones possédaient un insert de masse attendue soit environ 955 pb.

3.3.5.1 Sous clonage des clones DomV-NotI-3,4 et 5 motifs EGF3-EGF4-LG3 dans pCEP4-HA :

L'insert des clones DomV-NotI-3, DomV-NotI-4 et DomV-NotI-5 a été sorti du pCR2.1 par digestion NotI pour être sous-cloné NotI-NotI dans le pCEP4-HA. Ici, 3 clones ayant un insert ont été utilisés pour le sous clonage afin d'augmenter les chances d'avoir un insert correct au séquençage final puisque les clones n'ont pas été séquencés dans le pCR2.1 pour ce clonage uniquement. L'insert obtenu suite à la digestion NotI (8 μg des clones, 4 μl tampon digestion NEB3 10X, 4 μl BSA (1

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl NotI (10 U/ μl) volume de la réaction complété à 40 μl avec de l'eau milliQ et incubation toute la nuit à 37°C) est purifié sur gel d'agarose 1% (tout le contenu de la digestion est mis sur gel) inséré et lié dans le plasmide pCEP4-HA préalablement ouvert suite à une digestion NotI : 5,6 μg de plasmide digéré, même protocole que ci-haut suivi d'une précipitation au phénol-chloroforme et d'une déphosphorylation du vecteur pour l'empêcher de se refermer sur lui-même (voir sections 3.1.10 et 3.1.11). Ligation : plasmide 4 (~800 ng) et 10 μl d'insert purifié (~2 μg). Transformation du produit de ligation (8 μl au lieu de 2 μl habituellement utilisés) et étalage de 60 μl de bactéries transformées sur une plaque de LB-agar-amp (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Après incubation toute la nuit, entre 4 et 8 colonies de chaque clone sont repiquées sur plaque LB-agar-amp (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le lendemain, les clones sont utilisés pour une mini-préparation d'ADN. Double digestion HindIII/SfoI des clones isolés par mini-préparation d'ADN pour voir la présence d'un insert : 1 μg de plasmide, 2 μl de tampon de digestion NEB2 10X, 1 μl SfoI diluée 50/50 dans le Buffer B 10X NEB (4 U/ μl final), 1 μl HindIII (10 U/ μl) volume de la réaction complété à 20 μl avec de l'eau milliQ et incubation dans un bain à 37°C pour 2 h. Ici encore on peut utiliser 2 enzymes pour déterminer en même temps la présence et l'orientation de l'insert dans le plasmide. SfoI coupe dans l'insert et HindIII dans le plasmide pCEP4-HA. Les clones DomV-NotI-3-4, 3-6 et 3-7, DomV-NotI-4-1, 4-2 et 4-4 ainsi que DomV-NotI-5-4, 5-5 et 5-7 avaient un insert de la bonne taille et dans la bonne orientation. Trois clones (PCR#DomV-NotI-3-4, PCR#DomV-NotI-4-2 et PCR#DomV-NotI-4-4) ont été séquencés et un stock bactérien des 3 clones avec insert congelé. Un stock plasmidique du clone PCR#DomV-NotI-4-2 qui s'est avéré

parfait au séquençage a été réalisé avec le kits MÉGA-PREP endo-free de QIAGEN et conservé à -80 °C.

3.4 Culture Cellulaire :

3.4.1 Lignées cellulaires et conditions de culture :

Les CMLr, cellules A7R5 d'une lignée clonale de muscle lisse d'aorte thoracique d'embryon de rat ont été obtenues de ATCC Rockville, MD, USA. Les fibroblastes WI38, sont des fibroblastes humains provenant de tissu pulmonaire embryonique normal, proviennent aussi d'ATCC. Les cellules Namalwa, lymphocytes B humains (Burkitt's lymphoma) ont été gracieusement fournies par le Dr. Bertrand, (CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) et proviennent d'ATCC. Les CMLr sont cultivées dans le milieu DMEM-F12 enrichi de 10% de FBS. Les fibroblastes sont cultivés dans du FBM (Fibroblast Basal Medium, (Cambrex, Walkersville, MD) enrichi de 10% de FBS. Les Namalwas sont cultivées en suspension dans le milieu RPMI 1640 avec L-glutamine 300 mg/l contenant de 10% FBS et maintenues à environ 1,5 millions de cellules par ml. Les Namalwas transfectées sont cultivées dans le RPMI 1640 contenant 10% FBS et additionné d'Hygromycine B (Invitrogen) 50 ou 100 mg/ml selon le cas. Tous les types cellulaires prolifèrent à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'air saturé en eau pour reproduire le plus fidèlement possible l'environnement du corps humain. Pour passer

les CMLr et les fibroblastes, les cellules sont lavées avec du PBS 1X (PBS 10X dilué 1/10 dans de l'eau stérile), puis traitées avec de la trypsine pour les décoller et ensuite le milieu contenant les cellules en suspension est centrifugé à 1400rpm 10 min. Le surnageant est enlevé et le culot de cellules re-suspendu dans un volume approprié de milieu frais, puis ce mélange est déposé dans une nouvelle plaque ou flasque de culture. Pour passer les Namalwas, les cellules sont centrifugées à 1400rpm 10 min, le milieu est ensuite retiré et le culot de cellules re-suspendu dans un volume approprié de milieu frais. La congélation des Namalwas se fait comme suit : environ 10 millions de cellules sont centrifugées à 14000g 10 min et le culot resuspendu dans 1 ml d'un mélange à 10% DMSO, 45% FBS et 45% RPMI 1640. Ce mélange est laissé toute une nuit à -80°C et ensuite transféré dans l'azote liquide.

3.4.2 Transfections :

Les cellules ont été transfectées en utilisant la Lipofectine comme agent cationique lipidique. Opti-MEM 1 Reduced-Serum Medium 1X avec (w/Gluta Max-1) 2,4g/l sodium bicarbonate, HEPES buffer, hypoxanthine, thymidine, sodium pyruvate. L'ADN plasmidique utilisé pour les transfections provient de méga-préparation endo-free, i.e. exempte de toxines bactériennes. Brièvement, il faut préparer les solutions A et B dans des tubes stériles et laisser reposer à température pièce 15 min.

Solution A : pour chaque transfection, diluer 4 µg d'ADN à transférer à 100 µl d'Opti-MEM

Solution B : pour chaque transfection, déposer 10 μ l de Lipofectine sur 100 μ l d'Opti-MEM

Après repos de ces solutions, combiner les mélanges A et B sans trop mélanger et laisser à température pièce 10 à 15 min. Pendant ce temps, préparer les cellules, préalablement lavées une fois au PBS 1X (environ 2 ml), en les mettant à une densité de $2-3 \times 10^6$ dans 0,8 ml de milieu de culture sans sérum Opti-MEM dans une plaque de 6 puits. Ajouter le mélange de solutions A-B sur les cellules et mélanger doucement pour uniformiser. Incuber à 37°C pour 8h. Ensuite, récupérer les cellules dans les puits en y ajoutant 4 ml de milieu de culture cellulaire approprié et centrifuger le tout à 1400rpm 10 min à 4°C. Enlever le surnageant et resuspendre les cellules à une densité d'environ $0,5 \times 10^6$ dans du milieu de culture cellulaire approprié contenant 10% FBS, incuber à 37°C pour 48 h. Changer le milieu de culture aux 48-72 h. Ajouter l'agent de sélection, si requis 96 h post-transfection.

3.4.2.1 Transfection des Namalwas :

Pour les Namalwas, les plasmides (pCEP4-HA) ont été préalablement linéarisés par digestion enzymatique XmnI dans le but de favoriser l'insertion dans le génome et créer des lignées stables. Digestion XmnI : 15 μ g de chaque clone (EGF4-LG3 IV-10, LG3 5-10 et EGF3-EGF4-LG3 DomV 4-2), 5 μ l de tampon NEB2 10X, 5 μ l de BSA (1 μ g/ μ l), 15 μ l de XmnI (20 U/ μ l), volume de la réaction complété à 50 μ l avec de l'eau milliQ, 4 h à 37°C ensuite 20 min à 65°C pour inactivation de l'enzyme. Une petite fraction des produits de digestions a été migrée sur gel d'agarose 1% et visualisée pour s'assurer que les plasmides étaient bien linéarisés. L'ADN des

digestions a été précipité par l'ajout 1/10 de volume d'acétate de sodium et 1 ml d'éthanol 100% et placé à -80°C 48 h pour le récupérer et re-dissout dans 14 μl d'eau stérile pour avoir une concentration finale d'environ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 4 μg d'ADN précipité ont été utilisés pour les transfections. Suite aux transfections, l'Hygromycine B est ajoutée selon le cas à partir de 96 h post-transfection à une concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, puis 4 jours plus tard, augmentée à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et gardée constante à chaque changement de milieu des cellules pour sélectionner les cellules transfectées de façon stable.

3.5 Immunobuvardage pour les peptides recombinants-HA :

3.5.1 Immunobuvardage de type Western

Une fraction aliquote d'environ 10 millions de cellules Namalwas transfectées avec les différents clones est prélevée dans un tube de 15 ml, centrifugée à 1400rpm 10 min et le culot de cellules re-suspendu dans un eppendorf avec 250 μl de tampon de lyse RIPA contenant des inhibiteurs de protéases (0,04 mg/ml aprotinine, 0,01 mg/ml leupeptine et 0,1% PMSF) et des phosphatases (1 mM sodium orthovanadate et 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NaF). Après sonication de 25 sec sur glace, les échantillons sont incubés sur glace pour 1 h et ensuite centrifugés à 14000 rpm 20 min à 4°C . Le surnageant contenant les protéines est récupéré et dosé par la méthode de BCA. En bref, 5 μl de chaque extrait protéique sont dilués dans 95 μl d'eau, puis 2 ml d'un mélange (50/1)

de la solution A (carbonate de sodium, sodium bicarbonate, acide bicinchoninique, tartrate de sodium dans 0,1 M d'hydroxyde de sodium) avec la solution B (4% cupric sulfate) sont ajoutés pour une incubation de 30 min à 37°C. La mesure d'absorbance, qui est proportionnelle à la quantité de protéines de chaque échantillon, se fait à 562 nm sur un spectrophotomètre DU 800 BECKMAN COULTER.

Les échantillons contenant 100 à 150 µg de protéines sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE avec un gel de concentration de 3,5 % et un gel de séparation de 12%. L'électrophorèse se fait avec l'appareil Bio-Rad Mini Protean 3 System à 40 mA par gel pendant environ 1 h dans le tampon d'électrophorèse (1,5% Glycine, 0,3% Tris pH8.3). Le contenu des gels est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose avec le même appareil que pour l'électrophorèse, mais avec le module « Trans-Blot », dans le tampon de transfert (20% Méthanol, 0,3% Tris, 1,44% glycine) à 30 volts toute la nuit à 4°C. La membrane de nitrocellulose est bloquée avec une solution de TBS 1X (20 mM Tris pH7,5 ; 0,5 M NaCl) contenant 5% (m/v) de lait écrémé (Nestlé, North York, ON, Canada) pendant 1 h à la température ambiante. Ensuite, les membranes sont incubées toute la nuit avec une solution TBS/lait 1% / (1/1000) Thimérosal contenant l'anticorps primaire approprié. Les membranes sont lavées 3 fois 5 min suivi de 1 h avec du TBS contenant 0,05% de Tween 20. Les membranes sont ensuite incubées 1 h avec l'anticorps secondaire approprié dilué 1/2000 dans une solution TBS/lait 1%, soit l'anti-IgG lapin de chèvre, soit l'anti-IgG souris de chèvre (voir partie anticorps dans section 3.1.1), conjugués à la HRP (horseradish peroxydase) (Biosource, Camarillo, CA, USA). Les membranes sont encore une fois

lavées 3 fois 5 min suivi de 1 h avec la même solution TBS/Tween 20. Finalement, les protéines reconnues par les anticorps correspondant sont révélées à l'aide du kit Lumi-Light ou Lumi-Light^{PLUS} Western blotting substrate, selon le cas, en exposant la membrane à un film sensible à la lumière Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

3.5.1.1 Ré-exposition d'une membrane à un deuxième anticorps primaire :

Pour révéler une même membrane avec deux anticorps primaires différents, il faut tout d'abord décoller les anticorps fixés suite au premier immunobuvardage. La membrane est incubée avec agitation légère 30 min à 50°C dans une solution de détachement des anticorps fixés pour décrocher tous les anticorps qui s'y étaient fixés (voir composition des réactifs complexes section 3.1.2). Suite à cette incubation, la membrane est lavée 3 fois rapidement à l'eau milliQ et ensuite utilisée comme une membrane qui sort du transfert, i.e. que la membrane est bloquée avec du lait et utilisée comme décrit dans la section 3.5.1.

3.5.2 Immunobuvardage par point :

Cette technique est utilisée en remplacement d'un immunobuvardage classique, car elle est plus rapide et nécessite seulement de très petites quantités de protéines. Il faut tout d'abord laver la membrane de nitrocellulose 10 min au TBS 1X. Assécher la membrane à l'air. Appliquer les échantillons par point à l'aide d'une pipette en laissant diffuser lentement et en espaçant les échantillons. Appliquer entre 2,5 et 5 µl des échantillons et des contrôles d'anticorps primaire et secondaire aux dilutions

choisies (dans du lait 1%). Laisser sécher 15 min. Bloquer la membrane avec du lait 3% pour 1 h à température pièce avec légère agitation. Retirer la membrane et laisser sécher 15 min. Appliquer 2,5 µl de la solution d'anticorps primaire au titre choisi sur chacun des points d'échantillons et de contrôle. Laisser sécher 15 min. Laver la membrane 4 fois 5 min dans du TTBS 0,05% Tween. Rincer rapidement au TBS 1X et incuber la membrane avec la solution d'anticorps secondaire au titre choisi pour 1 h. Laver la membrane comme précédemment et révéler avec le système choisi.

3.6 Purification des peptides recombinants sur colonne d'affinité

anti-HA :

La colonne d'affinité anti-HA est préalablement lavée et équilibrée avec 20 ml de tampon lavage et équilibration (voir réactifs pour composition des tampons). L'extrait protéique à purifier (250 µl) est dilué dans 750 µl de tampon d'équilibration pour avoir 1 ml à appliquer sur la colonne. L'extrait protéique est appliqué sur la colonne et repassé 5 fois pour assurer une bonne liaison du peptide à l'anticorps fixé de façon covalente dans la colonne. Une fraction de 1 ml est récupérée après le 5^e passage, avant l'ajout du tampon de lavage et nommée L0 (lavage zéro). Ensuite la colonne est lavée pour éluer les protéines non-spécifiques qui ne se lient pas à l'anticorps avec 20 ml de tampon de lavage. Au cours de cette étape, des fractions de 1 ml sont collectées et identifiées. Ces fractions (échantillon dilué 20X dans l'eau pour le dosage) sont ensuite dosées à 260/280 nm (blanc = tampon de lavage passé

sur la colonne, dilué 20X dans l'eau). Le lavage de la colonne se poursuit jusqu'à ce que le dosage indique une très faible présence de protéines, i.e. qui s'approche du blanc. Le peptide-HA peut maintenant être élué par le passage de 15 ml de tampon d'éluion. Au cours de l'éluion, des fractions de 0,5 ml sont récupérées dans des tubes contenant 0,5 ml de tampon de neutralisation. Environ 20 fractions sont alors recueillies. Ces fractions (échantillon dilué 20X dans l'eau pour le dosage) sont ensuite dosées à 260/280 nm pour identifier un pic d'éluion du peptide-HA (blanc = tampon éluion/tampon neutralisation 50/50, dilué 20X dans l'eau). Les fractions de lavage et d'éluion sont ensuite analysées par immunobuvardage par point pour tester la présence du peptide-HA à purifier à l'aide soit de l'anticorps anti-HA, soit de l'anticorps anti-perlécan #1 ou bien de l'anti-perlécan #2 (voir partie anticorps dans la section 3.1.1). Suite à cette analyse et toujours en fonction du dosage des fractions, celles contenant le peptide-HA sont regroupées et le total est dosé pour évaluer la quantité de protéines totales selon la méthode BCA. Finalement on divise le peptide-HA purifié en plus petites fractions (250 à 500 μ l) et on les congèle à -80°C pour les conserver. Entre toutes ces vérifications et l'échantillonnage, les fractions sont conservées à 4°C pour un maximum de 48 h et toutes les manipulations impliquant le produit final sont faites de façon stérile. On utilise un mélange de tampons d'éluion et de tampon de neutralisation 50/50 (Tp) comme contrôle dans les expériences d'apoptose et de prolifération impliquant les PepR.

3.7 Évaluation de l'apoptose par microscopie de fluorescence :

Le niveau d'apoptose est évalué par coloration des CMLr non-fixées/non-perméabilisées avec le Hoechst 33342 (Ho) et avec l'iodure de propidium (Pi) tel que décrit dans les travaux précédents publiés par le laboratoire [103]. Le niveau d'apoptose est évalué par microscopie de fluorescence, suite à la coloration des cellules avec le Ho/Pi. Il a été démontré que cette technique différencie avec exactitude les cellules en apoptose précoce, tardive et en nécrose primaire. Les CMLr prolifèrent jusqu'à confluence dans une plaque de 24 puits. Suite à l'exposition aux différentes conditions, les cellules sont incubées avec le Ho (1 µg/ml) pour 10 min à 37°C et ensuite lavées au PBS 1X, puis 500 µl de PBS contenant du Pi (5 µg/ml) est ajouté avant la prise de photos en microscopie de fluorescence (filtre d'excitation λ : 360-425 nm). Trois photographies de plans différents (triplicata de mesures) sont prises dans chacun des puits de la plaque, chaque puits représentant une expérience indépendante (n). Le pourcentage de cellules normales, apoptotiques et nécrotiques adhérentes est déterminé par un évaluateur qui ne connaît pas les conditions expérimentales. En bref, voici comment les cellules sont classifiées. Les cellules viables montrent un noyau et une morphologie cytoplasmique normale et sont colorées en bleu par le Ho. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une condensation nucléaire et conservent leur intégrité membranaire. La condensation de la chromatine est associée à une coloration au Ho plus intense, alors que la conservation de l'intégrité membranaire exclue la coloration au Pi. Les cellules nécrotiques sont caractérisées par une augmentation du volume cellulaire et une perte

de la perméabilité membranaire, donc le Pi peut colorer ces cellules nécrotiques en rouge.

3.8 Détermination de la prolifération :

La mesure de l'incorporation de BrdU lors de la synthèse de l'ADN se fait sur des CMLr sous-confluentes en utilisant l'essai colorimétrique « Cell Proliferation ELISA BrdU ». Les cellules à 50% de confluence sont soumises aux différentes conditions dans des plaques de 96 puits. Quatre heures avant la fin de la période d'incubation de 24 h, 1 μ l de la solution de BrdU 1000X (10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridine dans du PBS, pH 7,4) est ajouté à chacun des puits contenant 100 μ l de milieu. Une fois la période d'incubation terminée, la plaque est vidée et 200 μ l de FixDenat sont ajoutés pour 30 min. Les cellules fixées sont ensuite incubées avec 100 μ l de la solution contenant l'anticorps anti-BrdU conjugué à la peroxydase (anticorps monoclonal provenant de cellules de souris hybrides, clone BMG 6H8, Fab fragment, dilué 1/100 avec la solution de dilution de l'anticorps) pendant 1 h. Après trois lavages avec 200 μ l de Tp de lavage dilué 1/10 (PBS), 100 μ l de la solution de substrat sont ajoutés par puits pour 15 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de 25 μ l de H₂SO₄ 1 M, puis la plaque est agitée pendant 1 min à 300 rpm. L'absorbance de chaque puits, qui est proportionnelle à l'incorporation de BrdU, est déterminée par une lecture de la plaque à 450 nm avec un appareil de spectrophotométrie pour plaques de 96 puits AM OPSYS MR Dynex Technology Microplate Reader.

3.9 Analyses informatiques :

- Estimation de la masse moléculaire des PepR à l'aide du site internet www.expasy.org : ExPASy [102] Proteomics Server (Expert Protein Analysis System) Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), dans la section primary structure analysis (pI/MW). À l'aide de ce site, on soumet la séquence en acides aminés des PepR avec l'épitope HA pour avoir une approximation de la masse moléculaire en kDa des peptides produits.
- Analyses statistiques : les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'erreur-type divisé par la racine carrée du nombre de données. Les données sont analysées en utilisant le test T de Student. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme une différence statistiquement significative deux moyennes.

4. RÉSULTATS

4.1 Transfections transitoires :

Le clonage des motifs du domaine V du perlécan avait pour objectif de tester les protéines recombinantes produites chez les types cellulaires du système vasculaire que nous étudions dans le laboratoire, afin d'évaluer lequel ou lesquels des motifs présents sur le fragment du domaine V du perlécan (produit durant l'apoptose des CE) est responsable de l'effet anti-apoptotique ou pro-prolifératif observé chez les CMLr. Les CMLr font partie de ces types cellulaires sur lesquels les travaux du laboratoire sont basés, mais il faut aussi mentionner les fibroblastes WI38 d'origine humaine qui sont utilisés dans l'étude des effets biologiques du SSC et du domaine V du perlécan. Ainsi, les premières constructions plasmidiques contenant les motifs EGF4-LG3 et LG3 dans le pCDNA3.1 ont été transfectées de façon transitoire dans les fibroblastes WI38 pour évaluer leur effet biologique sur la survie des cellules. Nous avons tout d'abord utilisé les fibroblastes pour réaliser une première transfection, car c'est une lignée facilement transfectable qui permet d'évaluer la toxicité potentielle des PepR. Nous voulions déterminer si les PepR pouvaient se retrouver dans le milieu extracellulaire ou seulement dans les cellules. Il était attendu que les PepR se retrouveraient de façon intra-cellulaire puisque les constructions peptidiques dans le pCDNA3.1 ne contiennent pas de peptide signal permettant leur sécrétion. Cependant, une production importante des PepR par les fibroblastes pourrait résulter en une exportation des PepR vers le milieu extracellulaire. Étant donné que ces PepR ne possèdent pas de séquence signal, nous pensons qu'ils seraient surexprimés au niveau intracellulaire, ce qui pourrait entraîner un certain

niveau de toxicité pour les cellules. Nous voulions ensuite déterminer si la transfection des constructions dans les WI38 nous permettrait de récupérer et de purifier les PepR exprimés en assez grande quantité pour tester leurs propriétés anti-apoptotique et pro-proliférative sur les CMLr. Ensuite nous voulions déterminer si l'expression des PepR par une cellule humaine (WI38) pouvait avoir un effet de survie sur les cellules en situation de stress induit par une carence en sérum, donc cultivées dans du SS. Pour répondre à toutes ces questions nous avons donc utilisé les WI38 en premier recours pour la transfection des constructions plasmidiques contenant les motifs EGF4-LG3 et LG3 dans le pCDNA3.1. 24 h post-transfection, les cellules sont exposées à du N (milieu de culture normal selon le type cellulaire utilisé) ou SS (milieu de culture RPMI 1640) pour 24 h supplémentaires et par la suite le nombre de cellules apoptotiques est évaluée par la technique de coloration au Ho/Pi. Le taux de mortalité cellulaire évalué par la coloration au Ho/Pi était anormalement élevé (autant dans le SS que N), comparativement aux résultats que le laboratoire obtient par cette technique de routine. Pour vérifier l'efficacité de transfection, un plasmide contenant la protéine fluorescente verte (GFP), dont l'expression est contrôlée par le même promoteur que le plasmide pCDNA3.1, a été transfecté en même temps comme contrôle. Il s'est avéré que l'efficacité de transfection pour le GFP était assez faible, soit environ 15% (résultats non montrés). La figure 7 montre les résultats obtenus sur la mortalité des fibroblastes suite à ces transfusions transitoires et suite à l'exposition soit au milieu N soit au SS pour 24 h.

Transfection transitoires chez les fibroblastes

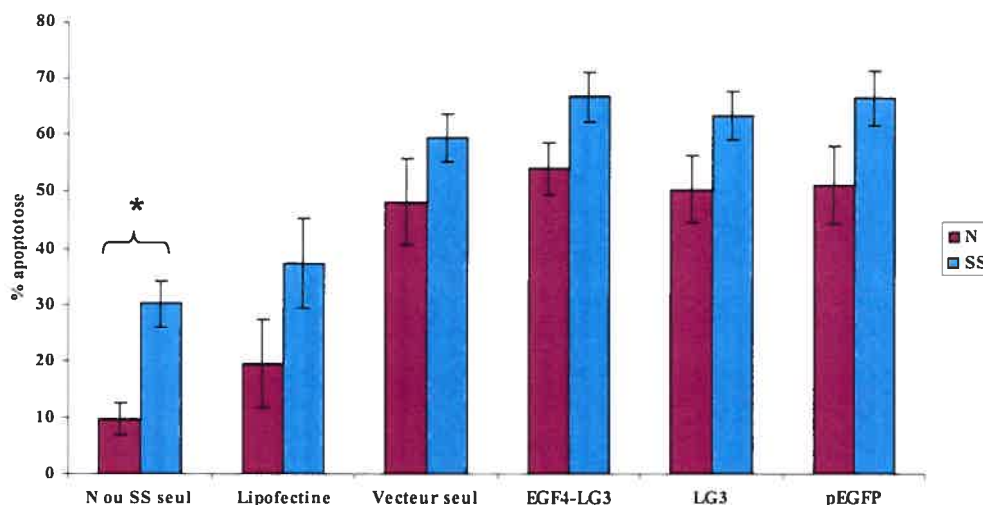


Figure 7. Activité anti-apoptotique des peptides recombinants sur les fibroblastes

Pourcentage de cellules apoptotiques estimé par la coloration au Hoechst 33342 et au Pi suite à une exposition de 24 h au milieu N ou SS. Aucun des PepR n'induit une diminution de l'apoptose chez les fibroblastes. Les cellules présentent un taux élevé d'apoptose en présence de tous les vecteurs plasmidiques et de la lipofectine et ce, dans les deux milieux d'exposition N et SS. On retrouve significativement moins d'apoptose dans le milieu N que dans le SS. (* $p=0.0005$, $n = 4$)

L'apoptose des cellules est évaluée selon la technique de coloration au Ho/Pi tel que décrit dans la section 3.7 du chapitre 3. La viabilité des cellules semble grandement affectée lorsqu'on transfecte un ou l'autre des plasmides, soit le pCDNA3.1 ou le pEGFP donc nous n'avons pas un bon système pour pouvoir produire les PepR, car l'efficacité de transfection est faible et la mort cellulaire élevée. Les PepR transfectés

n'apportent aucune résistance à l'apoptose, ni dans le milieu N, ni dans le SS. De plus, l'agent de transfection, la lipofectine, semble affecter les cellules de façon non négligeable, le taux d'apoptose dans le N et le SS étant assez élevé (fig. 7). En conclusion, même si généralement les fibroblastes sont une lignée cellulaire facilement transfectable, ici les résultats montrent une sensibilité trop grande à la transfection pour pouvoir obtenir des résultats valables. Suite à ces résultats décevants, rien ne peut être avancé quant à une protection éventuelle contre l'apoptose par les PepR puisque toutes les conditions comportent un taux anormalement élevé d'apoptose. Finalement, il n'était pas envisageable non plus à ce moment de purifier les PepR advenant le cas où ils auraient été produits en assez grande quantité par les fibroblastes transfectés puisque nous possédions seulement l'anticorps anti-perlécan #1 en quantité insuffisante pour faire une immunoprécipitation des PepR. De plus, la purification à l'aide de cet anticorps aurait été trop coûteuse et la technique encore à élaborer et à mettre au point. Donc pour des raisons pratiques et suite aux essais de transfections transitoires décevants nous avons opté pour l'utilisation des secondes constructions plasmidiques des motifs EGF4-LG3 et LG3 dans le plasmide pCEP4-HA pour permettre leur purification.

Cette fois, un essai de transfection a été réalisé en duplicata dans les fibroblastes avec le PepR EGF4-LG3 dans le pCEP4-HA seulement, car à ce moment, la construction LG3 n'était pas encore disponible dans le pCEP4-HA. Nous avons utilisé le plasmide pEGFP encore une fois comme contrôle de transfection. 24 h post-transfection, les cellules ont été exposées à du milieu N ou SS pour 24 h supplémentaires. 48 h post-

transfection, les cellules ont été récupérées et un extrait protéique total réalisé afin de vérifier, par immunobuvardage, l'expression du PepR. Le milieu extracellulaire des cellules a été conservé pour vérifier la présence de PepR potentiellement sécrété. Un immunobuvardage de type Western réalisé avec les extraits protéiques n'a pas permis d'identifier une quelconque expression du PepR EGF4-LG3 par son épitope HA (résultats non montrés). De plus, un immunobuvardage par point a été réalisé avec les mêmes extraits protéiques ainsi que le milieu extracellulaire. Encore une fois, aucune expression du PepR n'a pu être observée, ni dans l'extrait protéique, ni dans le milieu extracellulaire (résultats non montrés). La faible efficacité de transfection du plasmide contenant le GFP et l'absence d'expression du PepR EGF4-LG3 laissent croire que la transfection transitoire dans les fibroblastes n'est peut-être pas la meilleure façon de vérifier l'effet anti-apoptotique des PepR sur ces cellules. Nous n'avons pas non plus fait de transfusions transitoires sur les CMLr, puisqu'elles sont plus difficiles à transférer.

Nous avons donc choisi d'exprimer les PepR dans un autre type cellulaire humain, de purifier les PepR exprimés grâce à leur épitope HA et ensuite de tester les propriétés biologiques de ces PepR sur les CMLr.

4.2 Immunobuvardages

4.2.1 Les cellules Namalwas expriment les peptides recombinants transfectés

Suite au clonage et au séquençage des différents motifs du domaine V du perlécan nous avons choisi de les produire dans un système eucaryote humain et ensuite de les purifier afin de tester leur effet biologique sur les CMLr en utilisant une stratégie similaire à celle utilisée par d'autres équipes pour générer les fragments recombinants de perlécan [88]. Donc ces motifs du domaine V du perlécan qui ont été introduits dans le plasmide pCEP4-HA ont été transfectés dans les cellules Namalwas pour permettre leur expression dans un système eucaryote en vue de leur purification grâce à leur épitope HA. Pour vérifier que les cellules transfectées exprimaient bien les PepR, un extrait total de protéines a été réalisé. L'extrait total de chaque lignée cellulaire transfectée ainsi que les contrôles ont été appliqués directement sur la membrane de nitrocellulose pour l'immunobuvardage par points (figure 8) et ce dernier révélé avec un anticorps contre l'épitope HA. Les PepR EGF4-LG3 et LG3 sont exprimés et identifiables grâce à leur épitope HA. On voit que la lignée normale des Namalwas non transfectées n'exprime pas l'épitope HA.

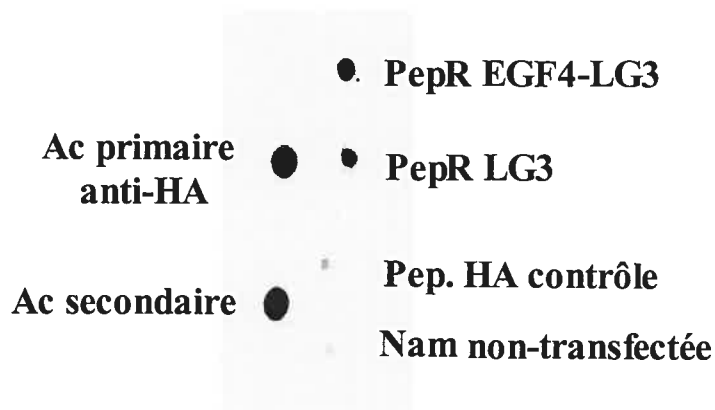


Figure 8. Les cellules Namalwas transfectées expriment les peptides recombinants

Immunobuvardage par points montrant que les peptides recombinants (PepR) sont exprimés et peuvent être détectés dans un extrait protéique total par leur épitope HA. Peptide HA contrôle : protéine contenant l'épitope HA provenant du laboratoire du Dr. Bertrand (Université de Montréal, Qc, Canada). Les Namalwas (Nam) non-transfectées ne réagissent pas avec l'anticorps (Ac) anti-HA. L'anticorps primaire (anti-HA) et secondaire (anti-IgG de souris) sont appliqués directement sur la membrane comme des échantillons et servent de contrôles positifs.

4.2.2 Les peptides recombinants exprimés sont identifiables à l'aide de plusieurs anticorps :

Pour re-confirmer l'expression des PepR par les Namalwas transfectées avant de les purifier, un immunobuvardage de type Western a été réalisé avec d'autres extraits protéiques totaux. Ces extraits totaux ont été migrés sur gel SDS-PAGE, les protéines transférées sur des membranes de nitrocellulose incubées avec les différents anticorps pouvant reconnaître les PepR. Ces immunobuvardages permettent de déterminer la masse approximative des PepR puisque les protéines sont séparées en

fonction de leur masse moléculaire. Les estimations de masses moléculaire réalisées à l'aide d'ExPASy [102] pour les PepR, contenant l'épitope HA, tiennent compte de la masse de ce dernier, soit environ 4,6 kDa pour 40 a.a.

Dans la figure 9A on observe que les PepR EGF4-LG3 et LG3 sont détectables à l'aide de l'anticorps anti-perlécan #2 dirigé contre la partie la plus carboxy-terminale du domaine V du perlécan (voir partie anticorps dans la section 3.1.1 du chapitre 3 pour une description détaillée). Les deux PepR sont observables à la masse moléculaire attendue telle qu'estimée par ExPASy [102]. Le PepR EGF4-LG3 (285 a.a.) a une masse moléculaire apparente d'environ 30 kDa (ExPASy [102] : 30.3 kDa) et le PepR LG3 (235 a.a.) a une masse moléculaire apparente d'environ 28 kDa (ExPASy [102] : 25,1 kDa) selon l'immunobuvardage de la figure 9A. Dans la figure 9B, de nouveaux extraits protéiques totaux sont migrés sur gel et la membrane obtenue est incubée avec l'anticorps anti-HA pouvant reconnaître les épitopes des deux PepR. Le PepR EGF4-LG3 est encore observé à environ 30 kDa et le PepR LG3 à environ 28 kDa. Dans la figure 9C des extraits protéiques des Namalwas transfectées produisant les PepR EGF4-LG3 et EGF3-EGF4-LG3 sont migrés sur gel et transférés tel que décrit précédemment et la membrane est incubée en premier lieu avec l'anticorps anti-perlécan #1 dirigé contre le motif EGF4 du domaine V du perlécan et révélée pour donner la figure 9C de gauche. Ensuite, pour savoir si on pouvait visualiser les mêmes PepR avec un anticorps différent (anti-HA), la même membrane est lavée et les anticorps fixés décrochés par incubation avec une solution de décrochage des anticorps fixés tel que décrit dans le chapitre 3, section 3.5.1.1. La

membrane exempte d'anticorps est incubée pour une seconde fois avec l'anticorps primaire anti-HA et révélée pour donner la figure 9C de droite. Donc, les PepR EGF4-LG3 et EGF3-EGF4-LG3 sont détectables grâce aux deux anticorps utilisés, anti-perlécan #1 et anti-HA. Encore une fois, le PepR EGF4-LG3 est visible à environ 30 kDa. Le PepR EGF3-EGF4-LG3(352 a.a.) est visible à environ 40 kDa tel qu'estimé avec (ExpPASy [102] : 37.7 kDa).

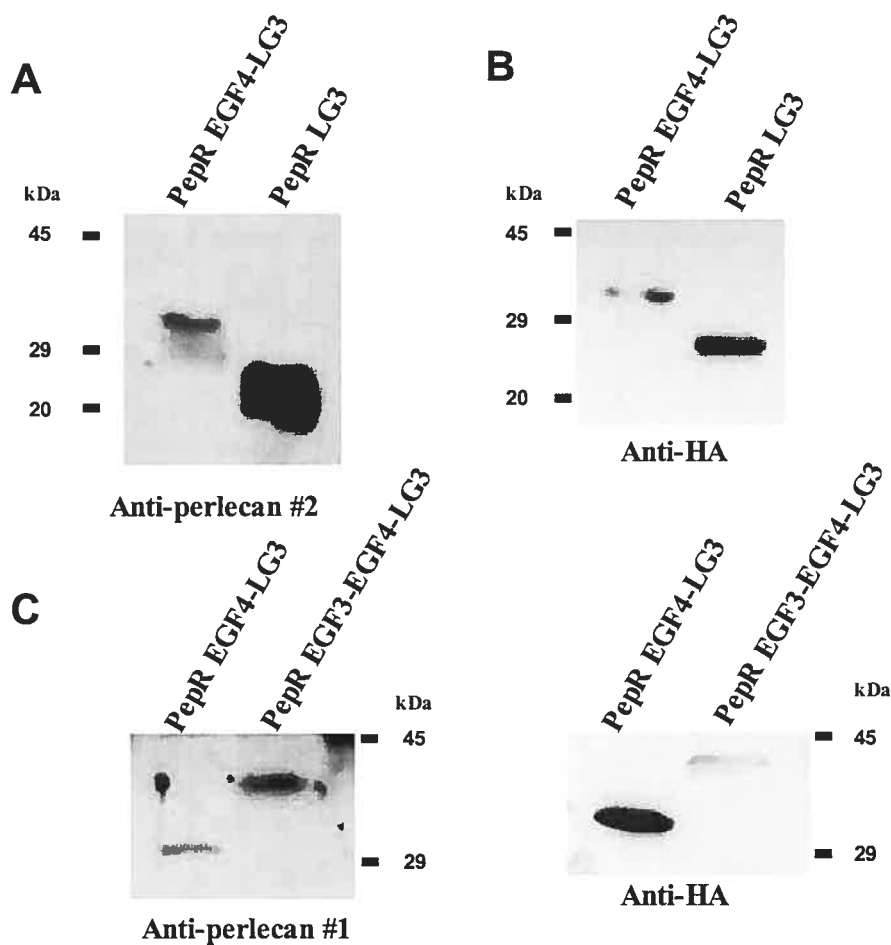


Figure 9. Immunobuvardage permettant d'estimer la masse moléculaire des peptides recombinants

Immunobuvardages montrant l'expression des peptides recombinants (PepR) exprimant l'épitope HA par les Namalwas (Nam) transfectées. **A)** et **B)** Extraits protéiques totaux provenant des Nam

exprimant les PepR EGF4-LG3 et LG3. C) Extraits protéiques totaux provenant des Nam exprimant les PepR EGF4-LG3 et EGF3-EGF4-LG3. Membrane lavée pour décrocher les anticorps fixés avant deuxième exposition à l'anticorps anti-HA. Anti-perlécan #1 : anticorps primaire contre le motif EGF4 du domaine V du perlécan. Anti-perlécan #2 : anticorps primaire contre les derniers 42 a.a. de la partie carboxy-terminale du domaine V du perlécan. Anti-HA : anticorps primaire contre l'épitope HA des PepR.

4.3 Effet anti-apoptotique des peptides recombinants

Les résultats obtenus par le laboratoire avec le EGF4-SYNT et le SSC suggèrent qu'un ou des motifs clonés du domaine V du perlécan pourraient avoir un effet sur l'apoptose des CMLr. Pour purifier les PepR, un extrait protéique total, pour chaque PepR provenant des Namalwas transfectées, a été purifié sur une colonne d'affinité anti-HA, les fractions d'élution contenant le PepR rassemblées et dosées par spectrophotométrie à 260/280 nm. Finalement la solution de PepR (dans un mélange 50/50 tampon élution/tampon neutralisation) a été dosée selon la méthode au BCA pour déterminer sa concentration. Donc, une fois les PepR purifiés grâce à leur épitope sur la colonne anti-HA, il s'est avéré essentiel de tester leur effet anti-apoptotique sur les CMLr. Pour ce faire, les cellules sont incubées pour une période de 24 h avec les conditions suivantes : milieux N, SS, SSC, le PepR EGF4-LG3 ou son Tp correspondant, aux concentrations 1 µg/ml et 0,1 µg/ml et finalement le PepR LG3 ou son Tp correspondant, aux concentrations 1 µg/ml et 0,1 µg/ml. Les PepR et leur Tp respectif ont été dilués dans du SS. L'apoptose des cellules est ensuite

évaluée selon la technique de coloration au Ho/Pi tel que décrit dans la section 3.7 du chapitre 3.

La figure 10 est le résultat de neuf expériences avec les mêmes conditions. Dans cette figure, les CMLr exposées aux PepR EGF4-LG3 et LG3 à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ présentent un niveau d'apoptose significativement inférieur aux CMLr exposées au SS. Si on compare le niveau d'apoptose des PepR à 1 $\mu\text{g/ml}$ au niveau d'apoptose induit par le SSC, on ne retrouve pas de différence significative. Donc selon la figure 10, les PepR utilisés à 1 $\mu\text{g/ml}$ semblent protéger les CMLr de la mort cellulaire au même titre que le SSC. De plus, la figure 10 démontre clairement que les Tp correspondant aux PepR EGF4-LG3 et EGF3 à 1 $\mu\text{g/ml}$ n'induisent pas une protection contre la mort cellulaire, la différence du niveau d'apoptose entre les Tp et leur PepR étant significative. Finalement, le niveau d'apoptose des CMLr n'est pas différent selon que les cellules sont incubées en présence du PepR EGF4-LG3 ou du PepR LG3. Ceci laisse supposer que le motif LG3 serait suffisant pour induire la protection contre l'apoptose chez les CMLr.

Effets des motifs EGF4 et LG3 du Domaine V du Pérlecan sur l'apoptose des CMLr

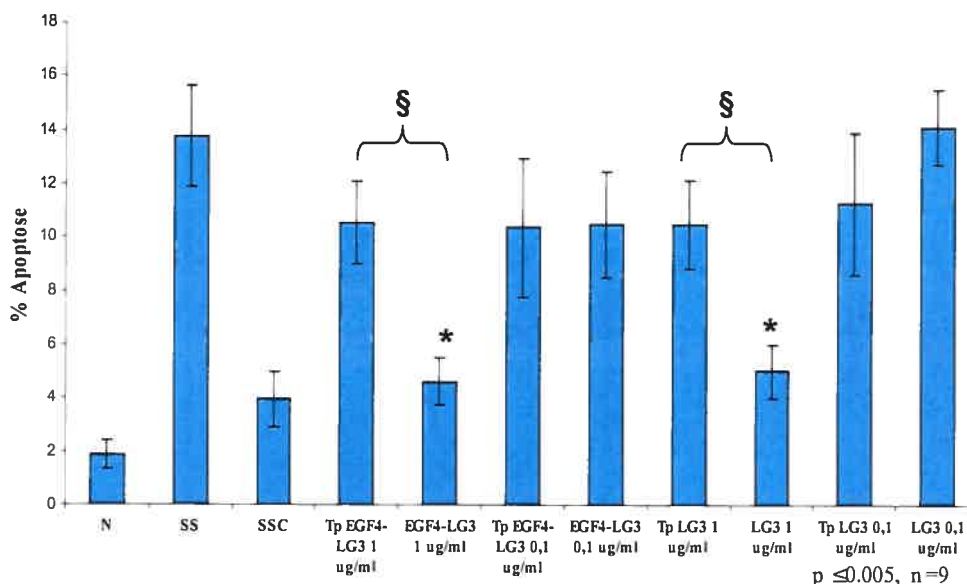


Figure 10. Activité anti-apoptotique des peptides recombinants sur les CMLr

Pourcentage de cellules apoptotiques estimé par la coloration au Hoechst 33342 et au Pi des CMLr suite à une exposition de 24 h aux peptides recombinants (PepR) et tampons (Tp) (dilués dans du SS), N, SS ou SSC. Significativement moins de cellules apoptotiques sont retrouvées dans les conditions N, SSC, EGF4-LG3 et LG3 (1 µg/ml) comparativement au SS. (*p ≤ 0,0005, n=9) Significativement moins d'apoptose est observée avec les PepR EGF4-LG3 et LG3 (1 µg/ml) par rapport à leur Tp respectif. (§p ≤ 0,0005, n=9)

4.4 Activité proliférative des peptides recombinants

Les résultats du laboratoire ont démontré que le SSC avait un effet pro-prolifératif et anti-apoptotique sur les CMLr. Par contre, le EGF4-SYNT n'a aucun effet

significatif sur la prolifération des CMLr [80]. Nous savons que le milieu SSC contient plusieurs facteurs susceptibles d'avoir un effet sur les CMLr et que le fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans ce milieu conditionné est constitué de 2 motifs distincts. Jusqu'à ce jour, nous ne pouvions pas déterminer l'implication exacte du fragment du domaine V retrouvé dans le SSC sur la prolifération des CMLr puisque nous n'avons que le EGF4-SYNT qui ne représente qu'une petite partie de ce fragment. Pour déterminer si l'effet pro-prolifératif du SSC peut être médié en totalité ou en partie par le fragment du domaine V du perlécan et pour déterminer l'implication potentielle des motifs qui le constituent les propriétés prolifératives des PepR ont été testées sur les CMLr. Pour ce faire, la même technique utilisée pour tester l'effet prolifératif du SSC et du EGF4-SYNT est employée, soit l'incorporation de BrdU aux CMLr en phase de croissance. Brièvement, les CMLr sont incubées pour 24 h avec les conditions suivantes : milieux N, SS, le PepR EGF4-LG3 ou son Tp correspondant aux concentrations 1 µg/ml et 0,1 µg/ml et finalement le PepR LG3 ou son Tp correspondant aux concentrations 1 µg/ml et 0,1 µg/ml. Les PepR et leur Tp respectif ont été dilués dans du SS. Les concentrations de PepR utilisées ici sont les mêmes que celles trouvées actives au niveau de l'inhibition de l'apoptose des CMLr (section 4.3, Fig.10). Il est à noter que des concentrations de PepR plus élevées n'ont pas été testées en raison de la trop grande toxicité des tampons correspondants. Le BrdU est ajouté à toutes les conditions 4h avant la fin de la période d'incubation totale de 24 h pour permettre aux cellules de l'incorporer. À la fin de la période d'incubation de 24 h, l'incorporation du BrdU en fonction des différentes conditions est déterminée tel que décrit dans la section 3.8 du chapitre 3.

Dans la figure 11, ni le PepR EGF4-LG3 ni le recombinant LG3 n'ont d'effet sur la prolifération des CMLr. Il n'y a pas d'augmentation ou de diminution observable de la prolifération par rapport au SS pour les deux concentrations utilisées des PepR et de leur T_p respectif. Tel qu'aussi observé dans les résultats précédents du laboratoire, les CMLr prolifèrent en présence de milieu N. Ces résultats viennent appuyer ceux déjà observés avec le EGF4-SYNT et la CS, qui n'augmentaient pas la prolifération des CMLr, dans un essai d'incorporation de BrdU [80]. Donc les concentrations de PepR actives au niveau de l'inhibition de l'apoptose n'ont pas d'effet significatif sur la prolifération des CMLr, suggérant que le domaine V du perlécan participe à l'inhibition de l'apoptose, mais non à l'augmentation de la prolifération. Il y aurait donc d'autres composants bioactifs présents dans le SSC responsable de l'activité pro-proliférative de ce dernier. Ces médiateurs pro-prolifératifs restent à être identifiés.

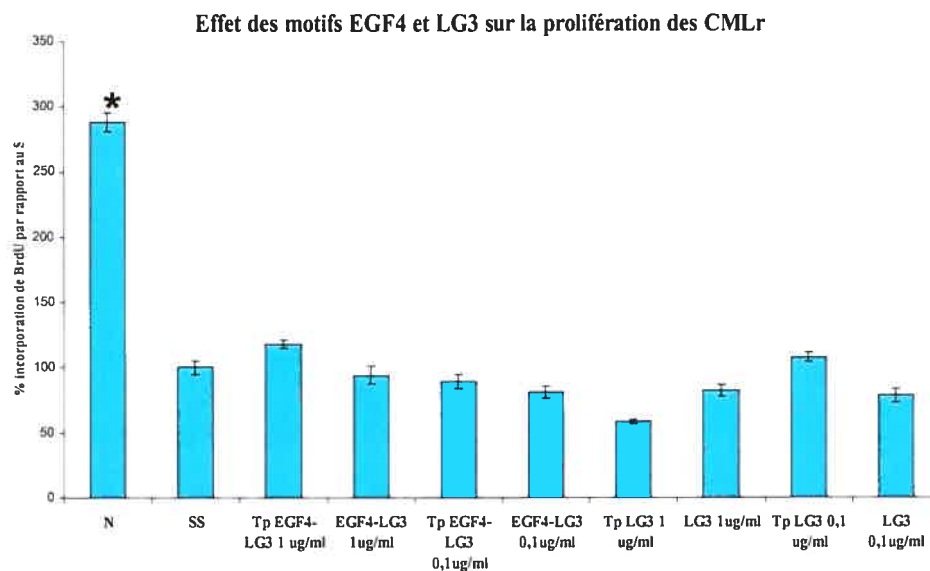


Figure 11. Les peptides recombinants n'induisent pas la prolifération des CMLr

Incorporation de BrdU par les CMLr sous-confluentes exposées pour 24 h aux peptides recombinants (PepR) et tampons (Tp) (dilués dans SS), N ou SS. Une augmentation significative de l'incorporation de BrdU est observée pour le N seulement, comparativement au SS. (* $p \leq 0,00005$, $n=6$)

5. DISCUSSION

5.1 Clonage

Les résultats du laboratoire avec le EGF4-SYNT ainsi que les résultats du SSC (le milieu conditionné sans sérum par des CE apoptotiques) sur l'apoptose des CMLr nous amènent à nous questionner sur l'importance des différents motifs présents dans le domaine V du perlécan. Le premier but de ce mémoire était donc de cloner les différents motifs du fragment carboxy-terminal du domaine V du perlécan retrouvés dans le SSC, dans des vecteurs de clonage permettant leur purification afin de les utiliser ultérieurement sur les CMLr. Tel que décrit en détails dans le chapitre 3, j'ai réalisé trois constructions importantes du domaine V du perlécan dans différents vecteurs. La première construction représente le fragment protéique séquencé retrouvé dans le SSC contenant les motifs EGF4-LG3 du domaine V du perlécan, dont le site de coupure en amino-terminal est encore non-défini. La position amino-terminale de ce fragment a été estimée selon la masse moléculaire obtenue sur gel et selon les fragments retrouvés suite à l'analyse par spectrométrie de masse [80]. Nous avons déduit que le fragment retrouvé dans le SSC débute à la position 4147 a.a. et se termine à la toute fin du domaine V soit à la position 4391 a.a. La première construction EGF4-LG3 débute donc à la position 4147 a.a. pour se terminer à 4391 a.a. et contient le site d'attachement de sucre (CS ou HS) à la position 4179 a.a. Les oligonucléotides ont été créés de façon à obtenir ce fragment EGF4-LG3 dans le plasmide d'expression eucaryote pCDNA3.1 ne contenant aucun épitope. La deuxième construction est basée sur le site de coupure par une protéase situé à la position 4196-4197 a.a. et représente le motif LG3 qui ne contient pas le site SGXG

d'attachement pour des sucres [90]. Ce fragment a aussi été cloné dans le pCDNA3.1. Ensuite, aux deux motifs EGF4-LG3 et LG3, j'ai ajouté deux sites de restriction NotI en 5' et en 3' permettant leur clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pCEP4-HA. Ce vecteur a été modifié par l'équipe du Dr. Bertrand (CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, CA) pour l'insertion HindIII-NotI de trois répétitions de l'épitope HA. Il n'était pas possible ici d'utiliser une stratégie de clonage directionnel pour faciliter les étapes d'intégration des inserts dans le plasmide pCEP4-HA puisque aucune combinaison d'enzyme présent dans l'insert et dans le plasmide n'était utilisable pour ce faire. La meilleure solution était donc de cloner NotI-NotI, réduisant le nombre d'enzyme à utiliser lors des digestions enzymatiques et du clonage. Un autre clone a aussi été réalisé de la même façon dans le pCEP4-HA, il s'agit de la toute fin du motif LG2 débutant à la position 4080 a.a., ainsi que des motifs EGF3-EGF4 et LG3 nommé : EGF3-EGF4-LG3. Donc, nous avons cloné plusieurs motifs du domaine V du perlécan afin de générer différents fragments individuels ou combinés pour identifier plus clairement lequel ou lesquels possèdent une activité anti-apoptotique et/ou pro-proliférative. En effet, le site de coupure amino-terminal du fragment du domaine V retrouvé dans le SSC n'est pas encore bien défini et n'est probablement pas le seul site de coupure possible à l'intérieur de ce domaine protéique du perlécan. Il était donc indispensable de produire les différents fragments du domaine V identifiés à ce jour pour évaluer et comparer leurs effets biologiques seuls ou en combinaison. Parmi ces motifs identifiés, il y a le fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC, constitué des motifs EGF4-LG3 et ensuite le fragment LG3 provenant d'une

protéolyse par la protéase « bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like » [90], mais il existe vraisemblablement d'autres sites protéolytiques qui pourraient par exemple libérer le domaine V complet de la molécule de perlécan ou d'autres combinaisons des motifs le constituant. Il serait aussi probable que lors de l'apoptose endothéliale il y ait protéolyse en série du perlécan générant des fragments de différentes masses se retrouvant dans le SSC qui n'auraient pas encore été identifiés. Une telle protéolyse en série pourrait dégager des sites de coupure autrement inaccessibles pour des protéases. Nous avons déterminé qu'un motif EGF4 synthétique (EGF4-SYNT) possède une activité anti-apoptotique, mais aussi qu'un fragment comprenant les motifs EGF4 et LG3 avait une telle activité. Pour identifier l'effet séparé et potentiellement synergique des différents motifs sur la régulation de l'apoptose et de la prolifération, nous avons clonés ces différents motifs EGF4 et LG3 ensemble et LG3 seul, ainsi qu'environ la moitié du domaine V du perlécan comprenant les motifs EGF3-EGF4-LG3. Ce dernier PepR a été généré afin de pouvoir travailler ultérieurement à identifier le site de coupure précis en amino-terminal du fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC et les protéases impliquées dans cette protéolyse durant l'apoptose endothéliale.

5.2 Transfections transitoires

Des transfections transitoires des clones EGF4-LG3 et LG3 dans le pCDNA3.1 ont été faites dans les fibroblastes WI38. Mes buts étaient de déterminer si l'expression

transitoire des PepR EGF4-LG3 et LG3 par des fibroblastes humains pouvait avoir un effet sur la survie cellulaire de base en situation de stress et par déprivation de facteurs de croissance (incubation de 24 h dans du SS), de déterminer si les PepR ou leur tampon respectif induisaient une toxicité cellulaire et de déterminer si les PepR étaient produits et sécrétés dans le milieu extracellulaire. Les résultats obtenus suite à ces transfections ont démontré une faible efficacité de transfection et une mortalité cellulaire élevée. L'agent de transfection, la lipofectine semble aussi toxique pour les cellules. Un plasmide contrôle, le pEGFP, exprimant une protéine fluorescente verte a été transfecté en même temps que les PepR comme contrôle du niveau de transfection. Même pour ce contrôle, l'efficacité de transfection s'est avérée faible, soit environ 15%. Les fibroblastes étant normalement des cellules relativement faciles à transfecter, nous ne voulions pas recommencer l'expérience sur des CMLr encore plus fragiles, étant donné la mortalité élevée obtenue avec le premier type cellulaire. Malgré la toxicité de l'agent de transfection, il était intéressant de vérifier si les PepR sous le contrôle d'un autre promoteur, dans le plasmide pCEP4-HA étaient produits par les cellules moins affectées. De plus, il aurait été difficile et trop coûteux financièrement, et en matériel protéique, d'immunopurifier le PepR à l'aide de l'anticorps anti-perlécan #1. Pour palier à ce problème, j'ai utilisé les mêmes constructions, mais dans le plasmide pCEP4-HA pour pouvoir retracer les PepR.

Une deuxième série de transfection transitoire a été réalisée avec le PepR EGF4-LG3 dans le pCEP4-HA et le plasmide contrôle pEGFP. À ce moment, la construction LG3 dans le pCEP4-HA n'était pas encore disponible. Les résultats obtenus ne sont

pas montrés puisque suite à la transfection des cellules et à l'extraction des protéines totales 48 h plus tard, aucune protéine recombinante n'a pu être identifiée, ni dans l'extrait protéique total, ni dans le milieu extracellulaire. La présence des PepR a été vérifiée par deux immunobuvardages, un de type Western et l'autre par point et ce à partir de deux échantillons pour chaque condition, avec l'anticorps anti-HA. Cette dernière technique, très semblable à un immunobuvardage de type Western est beaucoup plus rapide et nécessite beaucoup moins de matériel et a permis de vérifier rapidement si les PepR étaient exprimés. L'absence d'expression de PepR par les fibroblastes transfectés nous a poussé à utiliser un autre moyen pour produire les PepR afin de les tester sur les CMLr. Nous nous sommes tournés vers une autre lignée cellulaire humaine destinée à produire les PepR transfectés en grande quantité de façon à pouvoir les purifier et ultimement de tester leurs propriétés anti-apoptotiques et prolifératives.

5.3 Transfections dans les Namalwas

Pour réaliser une nouvelle transfection des constructions dans le plasmide pCEP4-HA, nous avons choisi une nouvelle lignée cellulaire facile à transférer et à sous cultiver. Les cellules Namalwas sont une lignée lymphoblastique humaine qui peuvent être cultivées en suspension dans de gros volumes et ce facilement. Nous utilisons une lignée humaine pour produire les PepR afin d'obtenir un fragment de perlécan le plus semblable possible biologiquement à celui produit par les CE de

notre système, i.e. qui pourrait être glycosylé au site SGXG. Le motif LG3 ne possédant pas ce site de glycosylation, n'avait pas à être obligatoirement produit dans ce système, mais nous voulions produire tous les PepR dans un seul et même système cellulaire afin de pouvoir comparer leurs effets sans mettre en jeu de nouvelles variables lors des expériences. Cette fois, les plasmides contenant les clones à transférer ont été linéarisés par une digestion XmnI pour favoriser leur incorporation dans le génome des Namalwas afin d'avoir des lignées stables. Une fois les trois constructions dans le pCEP4-HA (EGF3-EGF4-LG3, EGF4-LG3 et LG3) transfectées individuellement dans les Namalwas, il était essentiel de déterminer si les lignées stables obtenues exprimaient les PepR. Les lignées stables ont été obtenues grâce au gène de sélection par l'Hygromycine B apporté par le vecteur pCEP4-HA. Les cellules ont été sélectionnées entre 4-8 semaines avant de faire un premier extrait protéique total.

5.4 Immunobuvardages

Une fois les trois constructions dans le pCEP4-HA transfectées dans les Namalwas, il était essentiel de déterminer si elles exprimaient les PepR. Premièrement, j'ai réalisé un extrait cellulaire total de chaque lignée transfectée par les différents clones et testé ces extraits protéiques par un immunobuvardage par point. Au moment de réaliser cette expérience, la lignée Namalwa contenant le clone EGF3-EGF4-LG3 n'était pas disponible, donc cet extrait protéique n'apparaît pas sur la Figure 8. Grâce à leur

épitope HA, les PepR EGF4-LG3 et LG3 ont pu être identifiés dans les extraits protéiques totaux à l'aide de cette technique. Par contre, cette technique ne permet pas de déduire la taille des protéines révélées sur l'immunobuvardage.

Il a donc été essentiel de réaliser un immunobuvardage de type Western pour s'assurer que les PepR identifiés précédemment avaient la masse moléculaire attendue. Plusieurs extraits protéiques totaux ont été réalisés et migrés sur gel pour donner les membranes présentées à la figure 9. Les trois PepR EGF3-EGF4-LG3, EGF4-LG3 et LG3 ont pu être identifiés grâce à leur épitope HA. Ces mêmes PepR ont pu être identifiés à l'aide des deux anticorps anti-perlécan qui étaient disponibles au moment de ces expériences. L'anticorps anti-perlécan #2 nous a permis de détecter tous les PepR puisqu'il est dirigé contre les derniers 41 a.a. du domaine V du perlécan. Les masses moléculaires théoriques des PepR ont été déduites selon une analyse de la séquence en acides aminés de chaque PepR à l'aide du site internet ExPASy [102]. Les masses déduites sur ce site comprennent l'épitope HA (4,6 kDa) pour chaque PepR. Aux figures 9A et 9B, bien qu'étant deux membranes différentes, on voit que les PepR migrent environ à la même masse moléculaire lors des deux essais. La bande du PepR LG3 sur la figure 9A est plus ou moins claire probablement dû à un moins bon transfert, mais on voit sur la figure 9B que le PepR semble bien migrer aux environ de 28 kDa. Pour ce qui est de la figure 9C, la même membrane a été révélée avec l'anticorps anti-perlécan #1 et ensuite avec l'anticorps anti-HA pour s'assurer que les PepR EGF4-LG3 et EGF3-EGF4-LG3 étaient identifiables à la même masse moléculaire et avec ces deux anticorps. Maintenant

l'identité et la masse moléculaire des PepR confirmés, ceux-ci pouvaient être isolés et purifiés grâce à leur épitope HA sur une colonne d'affinité anti-HA.

Nous n'avons pas à ce jour vérifié si les PepR produits et purifiés étaient glycosylés, ni pu déterminer leur degré de pureté puisqu'il nous aurait fallu une plus grande quantité pour ce faire. Cependant, il est entendu que la glycosylation des différents PepR et leur degré de pureté seront vérifiés ultérieurement. Selon l'apparence de la bande séquencée de la fraction bioactive du SSC dans le gel coloré à l'argent, nous pensons qu'il est peu probable que le fragment identifié et séquencé de cette bande soit glycosylé [80]. En effet, la bande était mince et nette, contrairement à ce qui serait attendu d'un fragment glycosylé où la bande aurait été plus large et diffuse, puisque plusieurs sucres différents (CS, HS) peuvent être attachés au même site sur des fragments différents apportant ainsi des masses variées pour une seule et même séquence peptidique présente dans la bande analysée. De plus, comme le SSC est un mélange de plusieurs composants, il se pourrait que des enzymes présents coupent les sucres qui pourraient se retrouver attachés sur le fragment analysé de la bande représentant la fraction bioactive du SSC, rendant ainsi impossible à déterminer la présence ou non de sucres sur ce fragment uniquement par la visualisation de la bande du gel. En fait, dans le perlécan humain produit par des CE il ne semble pas y avoir de CS attachée sur le squelette protéique, mais seulement de l'HS, contrairement à ce qui est observable chez le perlécan de souris [85]. La présence de l'HS ou de la CS dans le domaine V du perlécan humain est encore incertaine, mais tout de même probable et reste à être vérifiée.

5.5 Effet anti-apoptotique des peptides recombinants

Les PepR EGF4-LG3 et LG3 ont été purifiés sur une colonne d'affinité anti-HA pour pouvoir tester leur effet anti-apoptotique sur les CMLr. Donc, une fois les PepR isolés et dosés, les CMLr sont incubées pour 24 h avec ces PepR et leur Tp respectifs ainsi que du milieu N, SS et SSC. Au même titre que le SSC, les deux PepR à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ apportent une protection significative contre la mort des CMLr comparativement au SS seul. Les Tp respectifs utilisés à la même concentration n'ont aucun effet protecteur, ce qui confirme que l'effet anti-apoptotique observé provient bien des motifs présents chez les PepR. Par contre, à une concentration 10 fois moindre (0,1 $\mu\text{g/ml}$), on perd l'effet protecteur des PepR sur les CMLr et il n'y a plus de différence significative entre ceux-ci et leur Tp respectifs. On observe aussi qu'il n'y a pas de différence au niveau du pourcentage d'apoptose selon que le PepR EGF4-LG3 ou LG3 (1 $\mu\text{g/ml}$) est utilisé. Ceci porte à croire que le motif LG3 seul serait suffisant pour induire une protection contre l'apoptose et que le motif EGF4 n'est pas essentiel à cet effet. En fait, le motif EGF4 n'ajoute pas à l'effet de protection contre la mort cellulaire, aucune différence significative n'étant observable entre les deux PepR ou même avec le SSC ou le N, suggérant qu'en présence du motif LG3, l'activité anti-apoptotique est médiée par le motif LG3. Bien que le EGF4-SYNT apporte une protection contre l'apoptose chez les CMLr, tel qu'observé dans les résultats antérieurs du laboratoire [80], le niveau d'apoptose observé avec ce EGF4-SYNT lors de ces expériences antérieures [80] semble moins diminué par rapport au SSC que lorsqu'on utilise un ou l'autre des

PepR (fig. 10), et ce toujours à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$. Les PepR semblent reproduire de plus près l'effet anti-apoptotique du SSC que le EGF4-SYNT, la différence d'apoptose entre les PepR à 1 $\mu\text{g/ml}$ n'étant pas significative par rapport au SSC. L'effet protecteur induit par le SSC proviendrait donc en majeure partie du motif LG3 du domaine V du perlécan, phénomène très vraisemblable puisque le fragment LG3 peut être libéré du domaine V du perlécan par une coupure protéolytique [90], mais il est aussi possible que la dissociation du EGF4 d'avec le LG3 permette alors au motif EGF4 d'avoir une activité anti-apoptotique. Cette expérience nous montre aussi que le motif LG3 est efficace peu importe que le motif EGF4 soit présent ou non. L'implication d'une voie reliée aux récepteurs EGF n'est donc pas indispensable, mais tout ceci suggère plutôt qu'une voie de récepteurs naturels du module LG3, les récepteurs intégrines, soit impliquée. En effet, il a été démontré que le module globulaire de la chaîne α des laminines est le module qui interagit spécifiquement avec le récepteur intégrine $\alpha_2\beta_1$ [89]. Ces résultats en révélant le rôle prédominant du motif LG3 fournissent des pistes sur les récepteurs potentiels présents à la surface des CML et impliqués dans la transmission du message anti-apoptotique. Ces résultats ont permis de mieux décortiquer les effets des motifs du fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC, bien que beaucoup de travail reste à faire pour comprendre totalement les effets de ce milieu conditionné complexe. Il faudra aussi tenir compte de protéolyse plus complexe et même en série pouvant entraîner la relâche de fragments de masses diverses et qui n'auraient pas encore été identifiés, comme par exemple le motif LG3 seul, dans notre système, mais qui pourraient jouer un rôle dans l'activité anti-apoptotique et

proliférative. Le fragment EGF3-EGF4-LG3, qui sera discuté plus loin, sera un outil important pour l'identification d'autres sites de protéolyse à l'intérieur du domaine V du perlécan.

5.6 Activité proliférative des peptides recombinants

Suite aux expériences réalisées avec le SSC sur les CMLr, des propriétés prolifératives lui ont été attribuées. Cependant, comme le SSC est un mélange de plusieurs facteurs produits par les CE apoptotiques, il est difficile de prime abord de déterminer quels sont les joueurs impliqués dans cette réponse proliférative. Comme le fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC contient un motif EGF, il est tentant de croire que celui-ci puisse avoir un effet prolifératif sur les CMLr. Cependant, le EGF4-SYNT utilisé à 1 et 0,1 $\mu\text{g/ml}$ n'a entraîné aucune augmentation de la prolifération chez les CMLr, telle qu'observée précédemment par le laboratoire [80]. Pour vérifier si les PepR pouvaient avoir un effet prolifératif sur ces cellules, un essai d'incorporation de BrdU a été réalisé, de la même façon qu'avec le EGF4-SYNT. Comme la figure 11 le démontre, aucune différence d'incorporation de BrdU n'est observable avec les PepR et ce aux deux concentrations testées, soit 1 et 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ni le motif EGF4, ni le motif LG3, ni même la combinaison des deux n'a d'effet sur la prolifération des CMLr. Il y aurait donc des facteurs autres que le domaine V du perlécan dans le SSC pour supporter l'effet pro-prolifératif observable chez les CMLr. Ceci appuie les données du laboratoire qui démontrent que les

médiateurs prolifératifs ne sont pas les mêmes que les médiateurs anti-apoptotiques [80].

5.7 Perspectives

Suite à l'identification d'un effet anti-apoptotique des PepR EGF4-LG3 et LG3 sur les CMLr, il sera nécessaire de caractériser la voie de signalisation impliquée dans ce phénomène. Comme les résultats du laboratoire ont démontré une augmentation de phosphorylation de Erk 1/2 induite par le EGF4-SYNT et aussi par la CS, il sera intéressant de vérifier si les PepR induisent un effet similaire. Un autre effet observé sur les CMLr avec le SSC, le EGF4-SYNT et la CS était une augmentation du niveau protéique de Bcl-x_L. Il sera alors nécessaire de vérifier si les PepR peuvent aussi induire une augmentation de Bcl-x_L et si cette augmentation est spécifique à l'un ou l'autre des motifs ou même à la combinaison des deux. Maintenant que l'importance du motif LG3 est mise en lumière, la voie des récepteurs intégrines serait une piste intéressante puisqu'il est connu dans la littérature que c'est le motif globulaire de la chaîne α des laminines qui interagit spécifiquement avec ceux-ci. Il a récemment été prouvé que le domaine V du perlécan interagit avec le récepteur intégrine $\alpha_2\beta_1$ entraînant une cascade de signalisation encore mal définie [89], mais qui pourrait être impliquée dans l'effet anti-apoptotique observé dans notre système.

Maintenant que le laboratoire possède l'anticorps anti-perlécan #2 dirigé contre la partie carboxy-terminale du fragment du domaine V du perlécan, il permettra l'immunopurification des protéines recombinantes qui ont été clonées dans le plasmide pCDNA3.1. Ces PepR exempts d'épitope de purification pourront être testés de la même manière que ceux comportant l'épitope HA. Ainsi, il sera possible de vérifier que l'épitope HA n'intervient en rien dans l'effet anti-apoptotique observé chez les CMLr. De plus, il sera peut-être possible d'observer un effet anti-apoptotique plus important avec des PepR sans épitopes, puisque même si l'épitope HA est relativement petit (40 a.a.), il se pourrait qu'il influence le repliement des PepR, modifiant ainsi la disponibilité d'acides aminés clés pour l'activité biologique observée.

Comme nous ne connaissons toujours pas l'extrémité amino-terminale du fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le SSC, l'anticorps anti-perlécan #2 nous servira à immunoprécipiter ce fragment en quantité suffisante pour le faire séquencer par la technique de dégradation d'Edman afin d'identifier le début amino-terminal exact de ce fragment d'environ 23 ± 2 kDa. Une fois cette extrémité connue, il sera plus facile d'identifier à l'aide de logiciels spécialisés des protéases candidates pouvant cliver à cet endroit le domaine V du perlécan. Le PepR EGF3-EGF4-LG3 a initialement été conçu pour servir à tester des protéases candidates pouvant cliver le domaine V du perlécan. Il serait très envisageable qu'il y ait plus d'une protéase en dehors des MMP pouvant cliver de façon spécifique ou non, le domaine V du perlécan et de générer le fragment retrouvé dans le SSC. Ce PepR sera donc utilisé

pour tester les protéases candidates, présentes dans l'environnement des CE, pouvant générer le fragment retrouvé dans le SSC.

De plus, pour prouver le concept qu'un état de résistance à l'apoptose des CLM entraîne la formation de néo-intima tel que rencontré dans la vasculopathie de transplantation et les microangiopathies thrombotiques, nous utiliserons les PepR du domaine V du perlécan dans un système *in vivo*. Brièvement, nous envisageons de travailler dans un système vasculaire chez le rat pour vérifier si l'expression locale dans un vaisseau, des différents PepR, peut induire un état de résistance à l'apoptose chez les CMLr et ultimement conduire à la formation de néo-intima. Ainsi, les constructions plasmidiques qui ont déjà été réalisées dans le plasmide pCDNA3.1 seront sous-clonées dans un vecteur pCEP4 contenant une séquence Kozak-peptide signal du VEGF (don du Dr. Rivard, Université de Montréal, Qc, Canada) suivie trois répétitions HA. Les constructions seront clonées HindIII-NotI dans le bon cadre de lecture suite à la séquence Kozak et l'épitope HA. Ces nouvelles séquences « Kozak-peptide signal du VEGF-HA-fragment du perlécan » seront ensuite clonées dans un vecteur adénoviral en collaboration avec le Dr. Langelier (Université de Montréal, Qc, Canada). Un adénovirus exprimant la séquence « Kozak-peptide signal du VEGF-HA-GFP » sera utilisé comme contrôle. La séquence signal du VEGF sera utilisée pour assurer la sécrétion des fragments de perlécan par les cellules transduites. Cette séquence signal a assuré une sécrétion appropriée du transgène dans un modèle d'injure par ballon dans une expérience en collaboration avec le Dr. Langelier [104, 105]. L'efficacité de transduction va être évaluée sur les HUVEC in

in vitro en utilisant l'immunofluorescence pour GFP, la sécrétion des peptides sera confirmée par ÉLISA grâce à l'épitope HA. Les vecteurs seront délivrés dans l'artère iliaque de lapin blanc de Nouvelle Zélande avec une distension minimale avec le ballon afin de minimiser la dénudation endothéliale et l'induction de la formation de néo-intima. Nous pourrions ensuite évaluer si la formation de néo-intima est augmentée dans les vaisseaux transduits par les séquences de fragment du domaine V du perlécan. Nous regarderons aussi si la formation de la néo-intima est associée à l'activation des récepteurs intégrines.

À plus long terme, avec une meilleure compréhension du rôle anti-apoptotique de notre fragment du domaine V du perlécan, il serait intéressant de développer un agent bloquant spécifiquement cet effet afin de mieux contrôler le phénomène de réparation vasculaire, empêchant ainsi une réparation excessive entraînant la fibrose et/ou l'occlusion via un épaississement myointimal du vaisseau affecté. En effet, la formation de néo-intima est causée par une dérégulation de l'apoptose et une augmentation de la prolifération des CML. En élaborant un agent qui pourrait inhiber l'effet anti-apoptotique des fragments du domaine V du perlécan produits par les CE apoptotiques au site de lésion, nous serions en mesure d'éviter l'épaississement myointimal pathologique et ainsi favoriser une réparation optimale de la lésion. Cet agent bloquant pourrait entre autre être utile dans les cas d'athérosclérose ou de greffes d'organes où en contrôlant l'état de résistance à l'apoptose des CML de la néo-intima, on pourrait favoriser à la disparition par apoptose des CML surnuméraires suite à la réparation de la lésion. Beaucoup de travail reste à faire pour

identifier clairement le rôle de chacun des motifs du domaine V du perlécan et les protéases pouvant générer des combinaisons ou des motifs seuls.

6. CONCLUSION

Dans un contexte d'insulte endothéliale vasculaire, il est fort probable que des MMP soient activées et entraînent une protéolyse de la MB, clivant ainsi le domaine V du perlécan pour générer un ou des fragments comprenant les motifs EGF4 et LG3. D'autres types de protéases présentes lors de l'apoptose des CE pourraient aussi cliver à différents endroits et peut-être de manière séquentielle le domaine V du perlécan. Dans notre système cellulaire *in vitro*, des CE en situation de stress libèrent effectivement un fragment cryptique du domaine V du perlécan comprenant les motifs EGF4 et LG3. Ces motifs, sous forme de PepR, ont un effet anti-apoptotique, mais non pro-prolifératif, sur les CMLr. Les PepR EGF4-LG3 et LG3 peuvent expliquer en grande partie l'effet anti-apoptotique observé avec le SSC, toutefois, l'effet pro-prolifératif n'est pas médié par ces PepR mais probablement par d'autres médiateurs encore inconnus. Le SSC étant un milieu extracellulaire complexe comportant certainement d'autres médiateurs actifs, sa caractérisation est loin d'être terminée. Bien que la prolifération soit le mécanisme classique associé au remodelage vasculaire, il est maintenant de plus en plus clair que l'apoptose, l'inflammation et la fibrose vasculaire sont des processus dynamiques qui peuvent aussi influencer le degré de remodelage suite à l'insulte. Dans ce mémoire, nous nous sommes concentrés sur l'effet anti-apoptotique du fragment du domaine V du perlécan, l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique des CML étant un événement crucial de la réponse de réparation du vaisseau endommagé. Toutefois, il demeure intéressant de découvrir quels sont les autres médiateurs impliqués dans la réponse pro-proliférative puisque celle-ci est aussi essentielle au remodelage vasculaire et à la formation de la néo-intima suite à une lésion. Aussi, l'importance potentielle de

l'inflammation de la paroi vasculaire d'un point de vue thérapeutique demeure un domaine, intéressant mais encore bien peu caractérisé, pour de potentielles applications concernant la participation de nouveaux médiateurs dans le remodelage vasculaire suite à une insulte. Une meilleure compréhension des médiateurs impliqués dans le remodelage vasculaire suite à une lésion permettra de mieux contrôler la réparation excessive et pathologique conduisant à la fibrose du vaisseau, compromettant la fonction des organes et contribuant à des complications vasculaires. Le motif LG3 du domaine V du perlécan est une cible intéressante pour contrôler la sensibilité à l'apoptose des CML de la paroi vasculaire lors de dommages vasculaires entraînant le remodelage des vaisseaux, comme par exemple dans les cas de greffe d'organe.

7. RÉFÉRENCES

1. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**: p. 115-126.
2. Clowes, A.W., M.A. Reidy, and M.M. Clowes, *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium*. Lab Invest, 1983. **49**(3): p. 327-33.
3. Jobin, F., *La thrombose*. Les Presses de l'Université Laval, Québec, 1995. **319**.
4. Sata, M. and K. Walsh, *Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1682-1689.
5. Shimizu, A., et al., *Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine*. Lab Invest 2002 Jun;82(6):673-86, 2002. **82**(6): p. 673-86.
6. Suzuki, J., et al., *Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts*. Cardiovascular Res, 2000. **45**: p. 783-787.
7. Laurence, J. and D. Mitra, *Apoptosis of microvascular endothelial cells in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura/sporadic hemolytic uremic syndrome*. Seminars in Hematology, 1997. **34**: p. 98-105.
8. Mitra, D., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells*. Blood, 1997. **89**: p. 1224-34.
9. Bombeli, T., et al., *Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant*. Blood, 1997. **89**: p. 2429-2442.
10. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets*. Blood, 1999. **93**: p. 3831-3848.
11. Casciola-Rosen, L., et al., *Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 1624-29.
12. Greeno, E., R. Bach, and C. Moldow, *Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity*. Lab Invest, 1996. **75**: p. 281-9.
13. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**: p. 801-809.
14. Banskota, N.K., et al., *Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(8): p. 1183-90.
15. Hultgardh-Nilsson, A., et al., *Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries*. Differentiation, 1991. **47**(2): p. 99-105.
16. Majack, R.A., *Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures*. J Cell Biol, 1987. **105**(1): p. 465-71.

17. Majack, R.A., M.W. Majesky, and L.V. Goodman, *Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta*. J Cell Biol, 1990. **111**(1): p. 239-47.
18. Majesky, M.W., E.P. Benditt, and S.M. Schwartz, *Expression and developmental control of platelet-derived growth factor A-chain and B-chain/Sis genes in rat aortic smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): p. 1524-8.
19. Raines, E.W., S.K. Dower, and R. Ross, *Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA*. Science, 1989. **243**(4889): p. 393-6.
20. Salhany, K.E., et al., *Differential induction of the c-fos promoter through distinct PDGF receptor-mediated signaling pathways*. J Cell Physiol, 1992. **150**(2): p. 386-95.
21. Sjolund, M., et al., *Expression of PDGF alpha- and beta-receptors in rat arterial smooth muscle cells is phenotype and growth state dependent*. Growth Factors, 1990. **3**(3): p. 191-203.
22. Thyberg, J., et al., *Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells*. Arteriosclerosis, 1990. **10**(6): p. 966-90.
23. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
24. Gussoni, E., et al., *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.
25. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
26. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.
27. Brazelton, T.R., et al., *From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1775-9.
28. Habib, R., H. Mathieu, and P. Royer, *Le syndrome hémolytique urémique de l'enfant*. Nephron, 1967. **4**: p. 139-72.
29. Habib, R., et al., *Etude anatomo-pathologique de 35 observations de syndrome hémolytique et urémique de l'enfant*. Arch Fr Pediatr, 1969. **26**: p. 391-401.
30. Vitsky, B., et al., *The hemolytic-uremic syndrome: A study of renal pathologic alterations*. Am J Pathol, 1969. **57**: p. 627-47.
31. Gervais, M., et al., *Immunofluorescent and histologic findings in the hemolytic uremic syndrome*. Pediatrics, 1971. **47**: p. 352-9.
32. Morel-Maroger, L., et al., *Prognostic importance of vascular lesions in acute renal failure with microangiopathic hemolytic anemia (hemolytic-uremic syndrome): clinicopathologic study in 20 adults*. Kidney Int, 1979. **15**: p. 548-58.
33. Remuzzi, G. and P. Ruggenenti, *The hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 1995. **47**: p. 2-19.

34. Pisone, R. and G. Remuzzi, *Thrombotic microangiopathy*. Eur J Intern Med, 2000. **3**: p. 135-139.
35. Lian, E., *Thrombotic thrombocytopenic purpura--a syndrome caused by multiple pathogenetic mechanisms*. Invest Clin, 2001. **42**: p. 75-86.
36. Kakishita, E., *Pathophysiology and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome (TTP/HUS)*. Int J Hematol, 2000. **71**: p. 320-327.
37. Matsumae, T., S. Takebayashi, and S. Naito, *The clinico-pathological characteristics and outcome in hemolytic-uremic syndrome of adults*. Clin Nephrol, 1996. **45**: p. 153-62.
38. Renaud, C., et al., *Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors in children over 3 years of age*. Pediatr Nephrol, 1995. **9**(1): p. 24-9.
39. Gagnadoux, M.F., et al., *Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome*. Clin Nephrol, 1996. **46**: p. 39-41.
40. Pollman, M., et al., *Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease*. Nat Med, 1998. **4**(2): p. 222-227.
41. Diez, J., et al., *Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats*. Eur Heart J, 1998. **Suppl G**: p. G29-G33.
42. Malik, N., et al., *Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty*. Circulation, 1998. **98**(16): p. 1657-1665.
43. Sata, M., et al., *Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1213-1217.
44. Guevara, N., et al., *The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo*. Nat Med, 1999. **5**: p. 335-339.
45. Kerr, J., A. Wyllie, and A. Currie, *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**: p. 239-257.
46. Perlman, H., et al., *Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury*. Circulation, 1997. **95**(4): p. 981-7.
47. Wei, G.L., et al., *Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty*. Circ Res, 1997. **80**(3): p. 418-26.
48. Bochaton-Piallat, M., et al., *Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1059-1064.
49. Couzinet, A., Z. Hérincs, and A.-O. Hueber, *Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique*. Médecine/sciences, 2002. **18**(8-9): p. 841-52.
50. Wyllie, A., J. Kerr, and A. Currie, *Cell death: The significance of apoptosis*. Int Rev of Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
51. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1415-30.
52. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**: p. 770-776.

53. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. *Embo J*, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
54. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. *Cell*, 2000. **102**(1): p. 33-42.
55. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP protein*. *Cell*, 2000. **102**: p. 43.
56. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 469-74.
57. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 789-795.
58. Hu, S., et al., *I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(28): p. 17255-7.
59. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. *Nature*, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
60. Srinivasula, S.M., et al., *FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18542-5.
61. Shu, H.B., D.R. Halpin, and D.V. Goeddel, *Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis*. *Immunity*, 1997. **6**(6): p. 751-63.
62. Han, D.K., et al., *MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11333-8.
63. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 491-501.
64. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptor*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 481-490.
65. Suzuki, J., et al., *Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation*. *Circulation*, 2002. **106**: p. 847-853.
66. Pollman, M., L. Naumovski, and G. Gibbons, *Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells*. *Circulation*, 1999. **99**: p. 2019-26.
67. George, S., et al., *Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis*. *Gene Ther*, 2001. **8**: p. 668-76.
68. Hirata, A., et al., *Nifedipine suppresses neointimal thickening by its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth via a MEK-ERK pathway coupling with Pyk2*. *Br J Pharmacol*, 2000. **131**(8): p. 1521-30.
69. Chipuk, J.E., et al., *Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis*. *Science*, 2004. **303**(5660): p. 1010-4.

70. Fukuo, K., et al., *Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis*. Gerontology, 1997. **43 Suppl 1**: p. 35-42.
71. Cai, W., et al., *The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis, 1997. **131(2)**: p. 177-86.
72. Geng, Y.J., et al., *Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17(10)**: p. 2200-8.
73. Schneider, D.B., et al., *Expression of Fas ligand in arteries of hypercholesterolemic rabbits accelerates atherosclerotic lesion formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20(2)**: p. 298-308.
74. Dong, C., et al., *Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy*. Lab Invest, 1996. **74(5)**: p. 921-31.
75. Takahashi, T., et al., *Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand*. Cell, 1994. **76(6)**: p. 969-76.
76. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356(6367)**: p. 314-7.
77. Sata, M., et al., *Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia*. Faseb J, 2001. **15(13)**: p. 2530-2.
78. Bellemare, S., et al., *Enhanced development of caspase-independent cell death in kidneys of non-heart beating donors*. Transplantation, 2001 (submitted).
79. Raymond, M., et al., *Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291(2)**: p. 261-9.
80. Raymond, M.A., et al., *Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC*. Faseb J, 2004. **18(6)**: p. 705-7.
81. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J Pathol, 2003. **200(4)**: p. 423-8.
82. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3(6)**: p. 422-33.
83. Patarroyo, M., K. Tryggvason, and I. Virtanen, *Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis*. Semin Cancer Biol, 2002. **12(3)**: p. 197-207.
84. Iozzo, R.V., *Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6(8)**: p. 646-56.
85. Whitelock, J.M., et al., *The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases*. J Biol Chem, 1996. **271(17)**: p. 10079-86.

86. Komoriya, A., et al., *Biologically active synthetic fragments of epidermal growth factor: localization of a major receptor-binding region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(5): p. 1351-5.
87. Kallunki, P. and K. Tryggvason, *Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules and epidermal growth factor*. J Cell Bio, 1992. **116**: p. 559-571.
88. Mongiat, M., et al., *Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 4238-4249.
89. Bix, G., et al., *Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin*. J Cell Biol, 2004. **166**(1): p. 97-109.
90. Gonzalez, E.M., et al., *BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7080-7.
91. Friedrich, M.V., et al., *Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V*. J Mol Biol, 1999. **294**(1): p. 259-70.
92. Oda, O., et al., *Purification and characterization of perlecan fragment in urine of end-stage renal failure patients*. Clin Chim Acta, 1996. **255**(2): p. 119-32.
93. Vuadens, F., et al., *Identification of biologic markers of the premature rupture of fetal membranes: proteomic approach*. Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1521-5.
94. Iozzo, R.V. and J.D. San Antonio, *Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 349-55.
95. Nugent, M.A., et al., *Perlecan is required to inhibit thrombosis after deep vascular injury and contributes to endothelial cell-mediated inhibition of intimal hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6722-7.
96. Jiang, X., et al., *Essential contribution of tumor-derived perlecan to epidermal tumor growth and angiogenesis*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(12): p. 1575-90.
97. Nicole, S., et al., *Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia)*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 480-3.
98. Segev, A., N. Nili, and B.H. Strauss, *The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(4): p. 603-10.
99. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.
100. Powell, W.C., et al., *The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis*. Curr Biol, 1999. **9**(24): p. 1441-7.
101. Shichiri, M., et al., *Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 989-97.

102. ExPASy, *ExPASy Proteomics Server (Expert Protein Analysis System)*, in *Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)*. www.expasy.org.
103. Raymond, M., et al., *Apoptosis of endothelial cells promotes survival of vascular smooth muscle cells: Evidence for a novel paracrine anti-apoptotic loop*. *Hypertension*, 2001 (submitted).
104. Gennaro G, M.C., Giasson E, Michaud SE, Palasis M, Meloche S, Rivard A., *Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**: p. 204-10.
105. Gennaro G, M.C., Michaud SE, Rivard A., *Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor*. *Circulation*, 2003. **107**: p. 230-3.

8. ANNEXE

8.1 Représentation de la séquence du clone I-4 utilisé pour le clonage des motifs du domaine V du perlécan

5' GTGTCAGTGAATGGCAAACGGCTGGACCTCACCTACAGTTTCCTAGGCAGCCAGG
 GCATCGGGCAATGCTATGA (G/C) AGCTCCCCATGTGAGCGCCAGCCTTGCCAACAT
 GGTGCCACGTGCATGCCCGCTGGCGAGTATGAGTTCCAGTGCCTGTGTGCGAGATGGA
 (A/C) TCAAAGGAGACCTGTGTGAGCACGAGGAGAACCCCTGCCAGCTCCGTGAACC
 CTGTCTGCATGGGGGCACCTGCCAGGGCACCCGCTGCCTCTGCCTCCCTGGCTTCTC
 TGGCCCACGCTGCCAACAAGGCTCTGGACATGGCATAGCAGAGTCCGACTGGCATCT
 TGAAGGCAGCGGGGGCAATGATGCCCTGGGCAGTACGGAGCCTATTTCCACGATGA
 TGGCTTCCTCGCCTTCCCTGGCCATGTCTTCTCCAGGAGCCTGCCCGAGGTGCCCGA
 GACCATCGAGCTGGAGGTTCCGACCAGCACAGCCAGTGGCCTCCTGCTCTGGCAGGG
 TGTGGAGGTGGGAGAGGCCGGCCAAGGCAAGGACTTCATCAGCCTCGGGCTTCAAGA
 CGGGCACCTTGTCTTCAGGTACCAGCTGGGTAGTGGGGAGGCCCGCCTGGTCTCTGA
 GGACCCCATCAATGACGGCGAGTGGCACCGGGTGACAGCACTGCGGGAGGGCCGCAG
 AGGTTCCATCCAAGTCGACGGTGAGGAGCTGGTCAGCGGCCGGTCCCCAGGTCCCAA
 CGTGGCAGTCAACGCCAAGGGCAGC (A/C) TCTACATCGGCGGAGCCCCCTGACGTGG
 CCACGCTGACCGGGGGCAGATTCTCCTC (G/A) GGCATCACAGGCTGTGTCAAGAAC
 CTGGTGTGCTGCACTCGGCCCCGACCCGGCGCCCCGCCCCACAGCCCCTGGACCTGCAG
 CACCGCGCCCAGGCCGGGGCCAACACACGCCCTGCCCTCGTAGGCACCTGCCTG-
 3'

Figure 12. Séquence en acides nucléiques du clone I-4 ayant servi au clonage des différents motifs du domaine V du perlécan

Identifications des 4 mutations non-codantes dans la séquence carboxy-terminale clonée du domaine V du perlécan représentant les motifs EGF3-EGF4-LG3. La base mutée est surlignée en rouge et le changement de base est représenté (A/C). Seules les deux dernières mutations (A/C) et (G/A) se retrouvent dans les clones des motifs du domaine V du perlécan, dont les PCR ont été réalisés à partir de ce clone I-4.

