
Université de Liège
Faculté de médecine



Analyse des modifications induites dans les entérocytes suite à l'ingestion de spermine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en Sciences Biomédicales

Année académique 2006-2007

Gharbi Myriam

Service de Biochimie et Physiologie générale
Professeur G. Dandriofosse



I. INTRODUCTION GENERALE

Les polyamines, telles que la putrescine, la spermidine et la spermine, sont des amines de faible poids moléculaire impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques. Elles interviennent dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires.

Les polyamines présentes dans notre organisme connaissent différentes origines. Outre un métabolisme cellulaire endogène, qui est fortement régulé, et des échanges intercellulaires, ces molécules sont absorbées quotidiennement à partir de notre alimentation (350 à 550 μmol par jour) (Bardocz *et al.*, 1993 ; Shalaby, 1994).

L'ingestion de polyamines exogènes, en particulier la spermine, semble liée directement à la maturation du système digestif chez le rat. En effet, plusieurs arguments lient ce phénomène à l'introduction de la spermine dans le régime alimentaire : (1) l'inhibition de l'ornithine décarboxylase, premier enzyme de la chaîne de biosynthèse de ces molécules, retarde l'établissement d'un phénotype intestinal de type adulte (Luk *et al.*, 1980), (2) la quantité de spermine ingérée via l'alimentation augmente considérablement au moment du sevrage (Romain *et al.*, 1992), (3) le maintien de nouveaux-nés sous une alimentation appauvrie en polyamines retarde le développement normal de la muqueuse intestinale (Yeh & Holt, 1985), (4) l'administration orale de spermine induit précocement le développement postnatal de l'intestin grêle (Dufour *et al.*, 1988) et (5) des pathologies humaines, caractérisées par un retard du développement intestinal, sont considérées comme étant liées à une déficience en polyamines (Kanof *et al.*, 1987).

La première partie du présent travail rappelle brièvement la morphologie générale et la physiologie de l'intestin grêle. Nous rassemblons également l'essentiel des données disponibles concernant les polyamines et le tractus digestif. Par la suite sont présentés plus précisément les objectifs et la stratégie scientifique de notre étude.

1. L'INTESTIN GRELE

L'intestin grêle est, entre autres, le siège de la digestion d'aliments et de l'absorption de nutriments permettant de transférer une partie des molécules organiques, des sels et de l'eau provenant de l'alimentation vers le milieu intérieur où ces substances sont distribuées aux cellules via le système circulatoire.

1.1 Morphologie sommaire de l'intestin grêle

L'intestin grêle, chez les mammifères, a la forme d'un tube cylindrique creux reliant l'estomac au gros intestin. Sa longueur (jusqu'à 6 m chez l'homme et 30 cm chez le rat non sevré) ainsi que la structure de sa muqueuse, en font une surface d'échange très vaste. L'intestin grêle s'étend du pylore au côlon et se subdivise en trois segments successifs distincts, tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel : le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

Le duodénum est un segment court qui suit immédiatement le sphincter pylorique et s'étend jusqu'au ligament de Treitz. Il reçoit les sécrétions de deux organes majeurs du système digestif : le pancréas et le foie. A l'inverse du duodénum, le jéjunum et l'iléon, qui lui font suite, forment une série d'anses intestinales mobiles et flottantes. La transition entre ces deux parties a lieu de manière progressive.

La paroi de l'intestin grêle se compose de quatre couches concentriques appelées, de la cavité abdominale vers la lumière : séreuse, musculuse, sous-muqueuse et muqueuse (figure I.1-1).

La séreuse est formée d'un tissu conjonctif lâche pouvant contenir des adipocytes. Elle constitue le tissu de soutien des gros vaisseaux et des nerfs. En continuité avec le péritoine, elle est revêtue d'un épithélium pavimenteux simple appelé mésothélium.

La musculuse se compose de deux couches épaisses de muscles lisses : une couche interne à disposition circulaire et une couche externe à disposition longitudinale. Ces couches perpendiculaires entre elles génèrent des ondes de contractions (contractions péristaltiques) contrôlées par le plexus nerveux d'Auerbach. Ces mouvements permettent la progression du bol alimentaire dans la lumière intestinale.

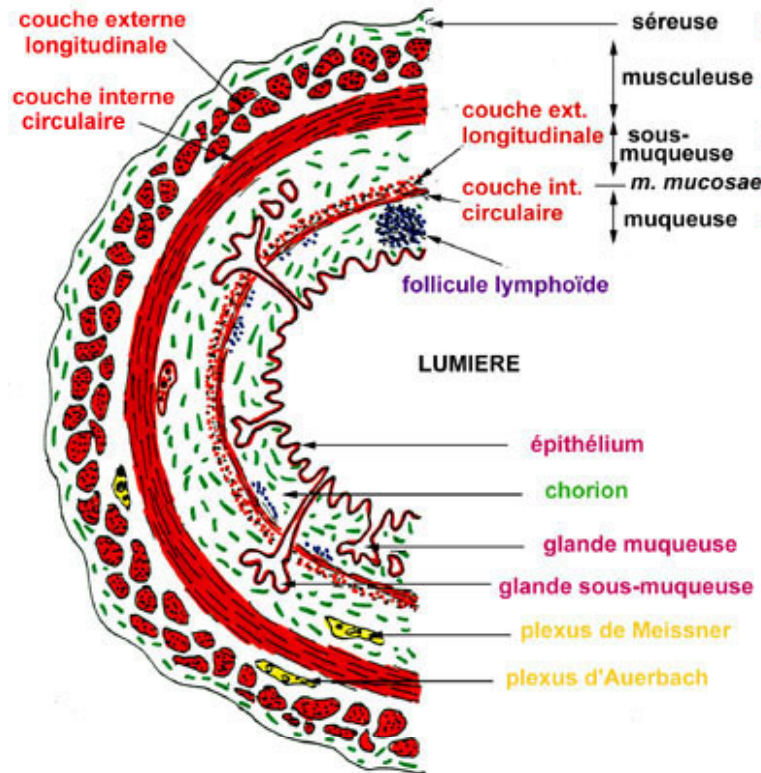


Figure I.1-1 : Structure de la paroi de l'intestin grêle, dessinée en coupe transversale.

La sous-muqueuse est formée d'un tissu conjonctif lâche riche en fibres élastiques et fortement vascularisé. Elle contient également le plexus de Meissner qui innerve la *muscularis mucosae*. Celle-ci est une couche mince formée de fibres musculaires lisses organisées de la même manière que la musculeuse, c'est-à-dire en deux plans : un plan interne de fibres circulaires "encerclant la lumière" et un plan externe de fibres longitudinales, orientées parallèlement à la paroi.

La muqueuse est constituée des trois couches suivantes :

- un épithélium simple à cellules cylindriques intervenant dans la digestion et l'absorption des aliments ;
- une couche de tissu conjonctif, le chorion, qui supporte l'épithélium et contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques ;
- la *muscularis mucosae* dont les fibres musculaires lisses permettent les replis de la face luminale de l'épithélium ainsi que les contractions assurant les mouvements propres à la muqueuse, indépendamment des contractions de la paroi.

La muqueuse de l'intestin grêle forme de nombreux replis qui contribuent à en augmenter considérablement la surface d'échange. Elle forme des projections vers la lumière intestinale, appelées villosités, et des invaginations entre celles-ci, dénommées cryptes de Lieberkhün. Elle possède des valvules conniventes qui sont des replis circulaires permanents impliquant également la sous-muqueuse. Ces valvules sont surtout présentes dans la première partie du jéjunum. La surface d'échange est encore étendue par la présence de nombreuses microvillosités situées au pôle apical des entérocytes, c'est-à-dire des cellules cylindriques de l'épithélium revêtant les villosités et les cryptes.

1.2 Les villosités intestinales

Le nombre et la taille des villosités de l'intestin grêle diminuent progressivement en direction du côlon, ce dernier étant caractérisé par une absence totale de ces structures. L'épithélium recouvrant ces villosités comprend trois principaux types de cellules : les entérocytes ou cellules absorbantes, les cellules à mucus ou caliciformes et les cellules entéroendocrines (figures I.1-2 et I.1-3).

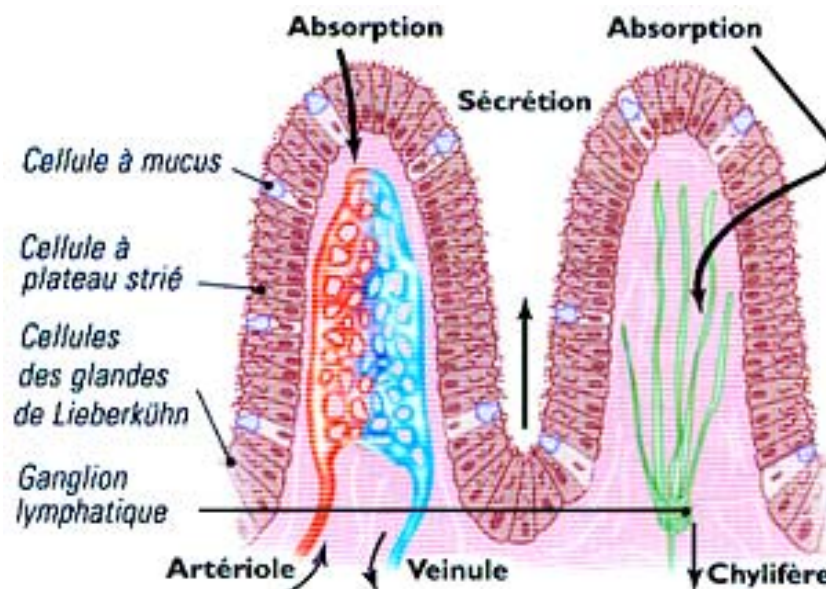


Figure I.1-2 : Structure des villosités intestinales, dessinée en coupe longitudinale.

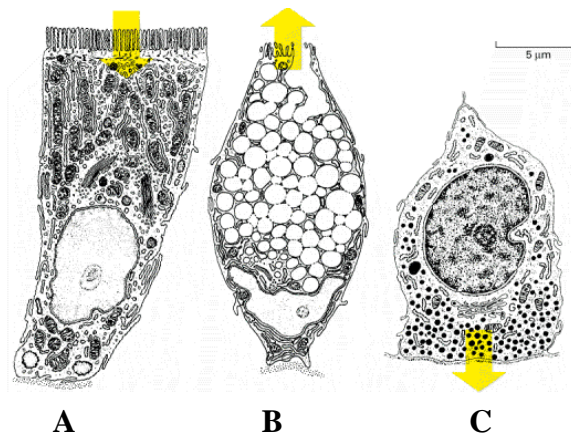


Figure I.1-3 : Types cellulaires présents dans les villosités de l'intestin grêle. A : entérocyte ; B : cellule caliciforme ; C : cellule entéroendocrine. Les flèches indiquent le sens d'absorption (entérocytes) ou de sécrétion (cellules caliciformes et entéroendocrines).

Les entérocytes

Les entérocytes sont des cellules spécialisées dans l'absorption de molécules issues du bol alimentaire. Ils interviennent également dans l'hydrolyse de petites molécules présentes dans le chyme. Ils représentent environ 95% de la population cellulaire totale des villosités intestinales (Cheng & Leblond, 1974a).

A leur sommet, les entérocytes sont liés entre eux par des jonctions serrées qui séparent physiquement leurs pôles apicaux et baso-latéraux. La membrane plasmique du pôle apical présente de nombreuses microvillosités qui forment la bordure en brosse ou plateau strié. Ce type de structure permet une optimisation de la surface d'échange dans le processus d'absorption intestinale. A ce niveau, la membrane cellulaire contient de nombreuses hydrolases ainsi que des systèmes de transport d'acides aminés et de monosaccharides. Ces hydrolases, telles que les disaccharidases et les aminopeptidases, sont des glycoprotéines enchâssées plus ou moins profondément dans la membrane. Au pôle basolatéral, la membrane des entérocytes matures présente de nombreux replis. On y trouve des ATPases ainsi que des récepteurs pour différentes substances présentes dans le milieu interstitiel.

La membrane apicale est un site majeur de capture de macromolécules et de fixation de microorganismes. Des glycoprotéines, des protéoglycans et des glycolipides forment sur la membrane des microvillosités une fine couche de 0,1 à 0,5 µm d'épaisseur appelée *glycocalyx*

(Ito, 1969 ; Ugolev *et al.*, 1979 ; Frey *et al.*, 1996 ; Kovbasnjuk & Spring, 2000 ; Pappenheimer, 2001). Ces molécules sont considérées comme des médiateurs importants de l'attachement de bactéries et de l'absorption de substances intraluminales. Ainsi, *Escherichia coli* se lie à un résidu mannose d'une glycoprotéine des microvillosités (Golderman *et al.*, 1985). Par ailleurs, le *glycocalyx* favorise le processus d'absorption de certains produits de digestion. En effet, l'amylase pancréatique et d'autres hydrolases intraluminales sont adsorbées sur ce réseau de filaments. Les réactions de lyse ont ainsi lieu associées aux microvillosités. Dans d'autres cas, la couche de *glycocalyx* peut, à l'inverse, s'opposer au passage de certaines molécules, telle l'insuline qui y est partiellement dégradée par les enzymes adsorbées au *glycocalyx* (Ugolev *et al.*, 1979 ; Aoki *et al.*, 2005a ; Aoki *et al.*, 2005b).

Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes sont dispersées entre les entérocytes des villosités. Elles produisent du mucus qui s'accumule dans leur cytoplasme sous forme de granules jusqu'à la libération du contenu de ceux-ci à la surface de l'épithélium. Lors de cette libération, le mucus s'hydrate fortement, augmente de volume et forme un hydrogel (Kraehenbuhl *et al.*, 1997). Ce mucus constitue alors une couche recouvrant toute la surface de l'épithélium. Il joue un rôle de lubrifiant et de véhicule, peut engluer des microorganismes et influence également l'absorption de certains peptides. Ceux-ci interagissent avec des composants du mucus (lipides ou mucines) selon leur degré d'hydrophilicité et leur poids moléculaire (Larhed *et al.*, 1998).

Les cellules entéroendocrines

Les cellules endocrines de l'intestin grêle représentent une population très hétérogène. En effet, au moins dix types cellulaires ont été décrits dans la muqueuse intestinale humaine. De petite taille, les cellules endocrines sont localisées à la base des villosités et dans les cryptes. Leur caractéristique commune est de posséder des granules de sécrétion au niveau de leur partie basale (Cheng & Leblond, 1974b). L'identification de ces cellules se base essentiellement sur le type de peptide sécrété. Les peptides gastro-intestinaux libérés par ces cellules jouent différents rôles, notamment, dans le contrôle des sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales ainsi que dans la motricité et la trophicité du système digestif.

La sécrétion des hormones intestinales est contrôlée par la nourriture présente dans la lumière intestinale, par le système nerveux et par d'autres hormones. Certaines cellules endocrines comportent, à leur partie apicale, des microvillosités plus nombreuses et plus épaisses que les entérocytes adjacents. La présence de « récepteurs » au niveau de cette région transmet probablement des informations intraluminales à la cellule. Par exemple, l'arrivée dans le duodénum et le jéjunum du chyme acide stimule la libération de sécrétine. Ce peptide stimule la sécrétion de NaHCO_3 par le pancréas et le tractus biliaire, ce qui neutralise l'acidité du chyme. La sécrétine inhibe également la motilité gastrique.

Les peptides intestinaux sont généralement sécrétés dans la circulation et dans la lumière intestinale. Ils peuvent avoir ainsi une action endocrine et paracrine. De plus, ils peuvent influencer l'activité cérébrale via des fibres nerveuses vagues provenant de la lumière intestinale (Kirkup *et al.*, 2001). Par exemple, la présence de lipides dans l'intestin stimule la libération de cholécystokinine (CCK) à partir des cellules entéroendocrines présentes dans la muqueuse. Cette hormone active des récepteurs présents sur les terminaisons de fibres nerveuses vagues afférentes. La stimulation de ces fibres entraîne alors une inhibition de la motilité gastrique qui peut être observée lors de la perfusion intestinale de lipides chez le rat (Raybould, 2003).

1.3 Les cryptes intestinales

Les cryptes intestinales (cryptes de Lieberkhün) s'ouvrent à la base des villosités. Leur épithélium peut être subdivisé en trois zones distinctes : une zone supérieure dont l'organisation est semblable à celle des villosités ; une zone médiane constituée de cellules non différenciées ou en voie de différenciation, dont certaines prolifèrent, constituant une population de cellules souches ; une zone inférieure comprenant les cellules de Paneth (figure I.1-4).

Les cellules de Paneth

Chaque crypte intestinale contient 5 à 12 cellules de Paneth. Celles-ci ont migré depuis la zone de cellules souches vers la partie inférieure des cryptes où elles survivent une vingtaine de jours (Cheng, 1974 ; Bry *et al.*, 1994).

Les cellules de Paneth renferment un grand nombre de granules de sécrétion situés à leur pôle apical. Ces granules contiennent du lysozyme (Erlandsen *et al.*, 1974), de la phospholipase A2 à sécréter (sPLA2 ; Nevalainen *et al.*, 1995) et des défensines (Cunliffe *et al.*, 2001).

Le lysozyme est une enzyme capable de digérer la paroi de certaines bactéries Gram-positives. La sPLA2, libérée dans la lumière intestinale suite à une stimulation par des produits bactériens, possède une activité bactéricide sur *Salmonella typhimurium* et *Listeria monocytogenes* (Qu *et al.*, 1996). Les défensines sont de petits peptides cationiques, de 29 à 45 acides aminés, possédant une activité anti-microbienne. Elles se subdivisent en deux classes principales, les α - ou β -défensines, selon la distribution des ponts disulfures de leur structure (Ouellette & Bevins., 2001 ; Cunliffe *et al.*, 2004).

Par l'intermédiaire de ces enzymes et des défensines ainsi que par la phagocytose, les cellules de Paneth peuvent limiter la prolifération de la flore bactérienne présente au niveau des cryptes.

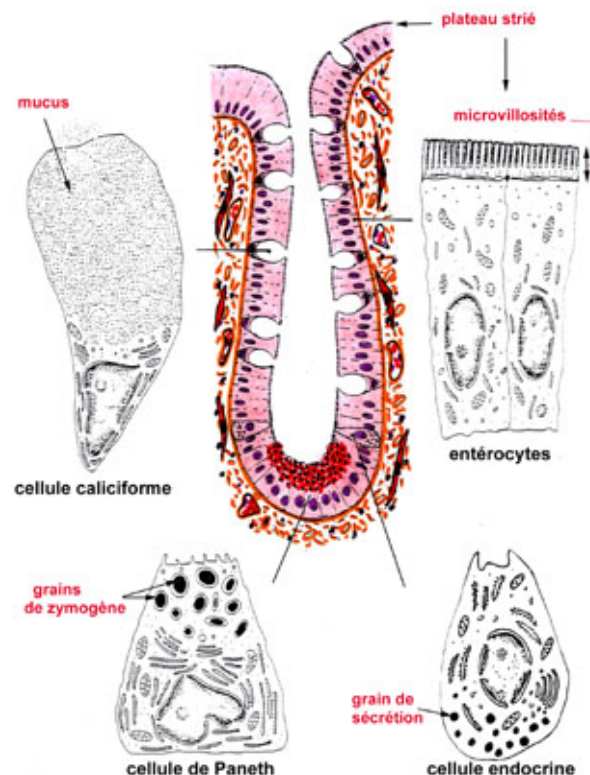


Figure I.1-4 : Structure des cryptes intestinales, dessinées en coupe longitudinale

1.4 La différenciation des entérocytes

Les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale se renouvellent tous les deux ou trois jours chez le rat adulte (Cairnie *et al.*, 1965), à partir de la population de cellules souches présente dans les cryptes intestinales. Ces cellules sont à l'origine des quatre types cellulaires de l'épithélium : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines (Cheng & Leblond, 1974b). La division cellulaire est suivie d'une migration et d'une différenciation des cellules le long de l'axe crypto-villositaire. Lors de cette différenciation, les cellules acquièrent des caractéristiques particulières (activités enzymatiques, sécrétion de mucus, ...) en fonction de leur localisation le long de l'axe antéro-postérieur de l'intestin, de leur position dans l'axe crypto-villositaire et de l'âge de l'individu. Les mécanismes responsables de l'acquisition de ces phénotypes différenciés ont fait l'objet de nombreuses études (pour revue : Bjerknes & Cheng, 2005).

Dès le stade embryonnaire, on voit apparaître chez le rat un contrôle de la différenciation cellulaire au niveau des interactions entre endoderme et mésenchyme. En effet, le mésenchyme semble dicter la morphologie et l'organisation de la muqueuse digestive tandis que les cellules épithéliales « informent » le mésoderme afin qu'il forme un mésenchyme intestinal et une structure musculaire (Kedinger *et al.*, 1981, Kedinger *et al.*, 1990). Ainsi, la greffe d'une réassociation hétérotypique d'endoderme du côlon avec du mésenchyme provenant d'intestin grêle montre une différenciation de cet endoderme avec, entre autres, l'apparition d'une activité lactase et sucrase-isomaltase (Duluc *et al.*, 1997). Ces greffes hétérotypiques sont caractérisées par une modification de l'expression de certains gènes à *homeobox* (HOXA9, HOXC8, CDX-1 et CDX-2), qui adoptent alors une expression typique de l'intestin grêle. Ces résultats suggèrent que ces gènes contrôlent, au moins partiellement, la différenciation de l'épithélium intestinal suivant l'axe antéro-postérieur (Duluc *et al.*, 1997).

Les gènes à *homeobox* codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire pendant le développement des métazoaires (McGinnis & Krumlauf, 1992). Ces gènes ont initialement été identifiés chez la drosophile (Mlodzik *et al.*, 1985) et, depuis lors, dans tout le règne animal (Kessel *et al.*, 1990) ainsi que chez les plantes (Vollbrecht *et al.*, 1991 ; Smith *et al.*, 1992). Bien que la structure fine et la fonction précise de ces gènes puissent varier d'un organisme à l'autre, leur rôle général comme facteur de régulation de l'expression génique est conservé.

Les gènes à *homeobox* de la famille *caudal*, CDX-1 et CDX-2, sont exprimés dans l'épithélium intestinal (James & Kazenwadel, 1991). Chez la drosophile, ces gènes participent à l'établissement du gradient céphalo-caudal au cours de l'embryogenèse précoce. Ils ont un profil d'expression biphasique : expression très précoce dans l'aire extra-embryonnaire et embryonnaire, expression tardive restreinte aux organes d'origine endodermique (Freund *et al.*, 1998). Ainsi CDX-1 et CDX-2, chez les rongeurs et l'homme, sont exprimés dans l'endoderme intestinal au cours du développement et dans l'épithélium de l'organe mature selon un gradient croissant le long de l'axe proximo-distal (James & Kazenwadel, 1991). Il existe une nette frontière au niveau du sphincter pylorique en amont duquel ces gènes ne sont pas exprimés. De plus, dans l'intestin de souris, les protéines *cdx-1* et *cdx-2* montrent une intéressante complémentarité puisque la première est exprimée dans les cellules des cryptes et la seconde principalement dans les cellules des villosités.

En plus du rôle attribué aux gènes CDX dans l'information de position le long de l'axe longitudinal de l'intestin, un rôle a été proposé dans le contrôle de la progression des cellules de l'état de prolifération à celui de différenciation le long de l'axe crypto-villositaire (Suh & Traber, 1996 ; Lorentz *et al.*, 1997). Les travaux réalisés impliquent des transfections de cellules intestinales (Caco-2 et IEC) afin de surexprimer ces gènes ou d'inhiber leur expression endogène. Par inhibition de CDX-1 avec un ARN anti-sens, la croissance des cellules Caco-2 est réduite *in vitro*, suggérant que ce gène, exprimé en majorité dans les cryptes, puisse participer au contrôle de la prolifération cellulaire. Contrairement à la situation observée avec CDX-1, la prolifération des cellules Caco-2 et IEC est réduite par une surexpression de CDX-2. De plus, cette surexpression déclenche la polarisation et la différenciation fonctionnelle des cellules IEC, indifférenciées à l'état basal. Au niveau des cellules Caco-2, qui se différencient spontanément, la surexpression de CDX-2 stimule cette différenciation. En effet, une augmentation de l'expression de CDX-2, dans les cellules Caco-2, active les molécules qui sont préférentiellement exprimées dans les cellules épithéliales des villosités par rapport aux cellules des cryptes, comme les enzymes digestives (sucrase, lactase) et les molécules impliquées dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice.

L'implication d'autres gènes dans la régulation de la différenciation cellulaire a pu être démontrée à partir d'expériences de *knock-out*. Ainsi, Kaestner et ses collaborateurs (1997) ont montré chez la souris que le *knock-out* du gène codant pour le facteur de transcription Fkh6 (*Forkhead homolog 6*) provoquait une hyperprolifération au niveau des cryptes

intestinales et l'augmentation du nombre de cellules à mucus. Le *knock-out* du gène codant pour l'intégrine- β 4 induit une mort précoce peu de jours après la naissance. Dans ce cas, on observe une diminution du nombre et de la taille des villosités. Le taux de prolifération dans les régions intervillositaires est également réduit (Murgia *et al.*, 1998).

Arrivées au sommet des villosités intestinales, les cellules sénescents meurent par apoptose et desquament dans la lumière intestinale (Potten & Allen, 1977 ; Hall *et al.*, 1994).

1.5 L'immunité cellulaire associée à la muqueuse

Du tissu lymphoïde est observable le long du tractus gastro-intestinal soit sous forme d'un infiltrat lymphocytaire diffus, soit sous forme d'agrégats volumineux non encapsulés. Dans les plus gros amas, des follicules peuvent se former, avec des centres germinatifs semblables à ceux présents dans les ganglions lymphatiques. Associée aux petits agrégats folliculaires et infiltrats lymphocytaires de l'arbre trachéo-bronchique et du tractus génito-urinaire, cette masse lymphoïde forme le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT = *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). Le MALT associé au tube digestif se nomme plus spécifiquement le GALT (= *Gut Associated Lymphoid Tissue*). Il est localisé au niveau des plaques de Peyer, de la *lamina propria* et entre les entérocytes de l'épithélium. Au niveau des plaques de Peyer, l'épithélium possède des cellules M, spécialisées dans le transport des antigènes vers le tissu lymphoïde.

La muqueuse intestinale humaine est riche en lymphocytes T. Ces cellules sont distribuées dans la *lamina propria* mais aussi dans l'épithélium lui-même, entre les entérocytes et la lame basale (Otto, 1973). Détectés très tôt dans l'ontogenèse de l'intestin (Orlic & Lev, 1977), ces lymphocytes expriment de manière prépondérante le marqueur de surface CD8 par rapport au marqueur CD4 (Spencer *et al.*, 1986). Dans l'intestin normal, leur nombre varie en fonction du segment intestinal examiné. Il diminue en direction du côlon (Hirata *et al.*, 1986).

Chez la souris, les lymphocytes intraépithéliaux proviennent probablement des plaques de Peyer où ils sont activés par un stimulus local. Ils quittent ensuite les plaques de Peyer, migrent vers les ganglions mésentériques puis dans le canal thoracique et retournent ainsi à la muqueuse intestinale par la circulation sanguine (Guy-Grand *et al.*, 1974).

Chez l'homme, la plus grande partie du système immunitaire associé à la muqueuse se trouve dans la *lamina propria*. La population lymphocytaire à ce niveau est beaucoup plus hétérogène que celle présente dans l'épithélium. Elle est constituée de plasmocytes, de lymphocytes T, de mastocytes, d'une variété de cellules issues de la lignée des phagocytes mononucléés et d'un certain nombre de cellules moins fréquentes comme des éosinophiles, des basophiles et des neutrophiles. La distribution entre les sous-groupes de lymphocytes T est différente de celle de l'épithélium : la proportion de CD8⁺ est plus faible (40% des lymphocytes dans la *lamina propria*, 70% dans l'épithélium). On trouve également de nombreux lymphocytes B activés et des plasmocytes qui sécrètent les IgA libérées ensuite dans la lumière intestinale.

Après leur activation, les cellules T CD4⁺ de la *lamina propria* sécrètent de l'interleukine 2 (Fiocchi *et al.*, 1984) tandis que les cellules mononucléées activées peuvent produire diverses cytokines comme l'interféron γ (Lieberman *et al.*, 1988), l'interleukine 1- β (Sartor *et al.*, 1988) et le CSF (*colony stimulating factor*) (Pullman *et al.*, 1988).

1.6 La maturation intestinale postnatale

Chez de nombreux vertébrés, une maturation de l'intestin grêle (et du tractus digestif en général) se produit au cours des premières semaines de vie postnatale. Chez le rat, cette maturation se déroule à la fin de la troisième semaine de vie qui suit la naissance. Elle permet aux jeunes animaux de s'adapter aux changements d'environnement et d'alimentation qui surviennent au moment du sevrage. L'intestin subit alors de nombreuses modifications d'ordre morphologique, biochimique, physiologique et immunologique.

Description des phénomènes accompagnant la maturation intestinale

Au moment du sevrage, on observe, chez les murins, une augmentation de la hauteur des villosités et de la profondeur des cryptes ainsi qu'un accroissement de la vitesse de prolifération et de migration des entérocytes le long de l'axe crypto-villositaire (Al-Nafussi & Wright, 1982).

Pendant la période néonatale, l'intestin grêle immature n'est pas une barrière aussi efficace que chez l'adulte et la muqueuse intestinale se caractérise par une activité pinocytosique

nettement plus élevée (Henning, 1981). Chez les murins, la perméabilité intestinale aux macromolécules décroît depuis la naissance pour devenir quasi nulle au moment du sevrage (Clarke & Hardy, 1969). Ce processus porte le nom de *gut closure* et s'accompagne de la disparition des récepteurs intestinaux aux immunoglobulines provenant du lait maternel (Morris & Morris, 1976).

Les entérocytes de l'intestin immature, en particulier dans les villosités de l'iléon, sont pourvus de grands lysosomes qui refoulent le noyau à la base de la cellule : les vacuoles supra-nucléaires. Ces lysosomes participent à la digestion des protéines alimentaires. Chez les murins, elles disparaissent au moment du sevrage (Veress & Baintner, 1970). La digestion lysosomiale est alors remplacée par celle existant dans la lumière intestinale, associée à la bordure en brosse. A ce moment, on observe une augmentation de l'activité de protéases provenant du pancréas (Henning, 1981).

Certaines activités enzymatiques apparaissent ou sont augmentées lors de la maturation de l'intestin tandis que d'autres décroissent avec l'âge de l'animal. Chez le rat, dans le cas particulier de la phosphatase alcaline, une enzyme spécifique des entérocytes dans l'intestin, l'activité spécifique de l'enzyme augmente dans le jéjunum mais diminue dans l'iléon (Millington & Towell, 1969 ; Goldstein *et al.*, 1971 ; Uezato & Fujita, 1983 ; Tojyo, 1984). Les activités de la lactase, de la glucose-6-phosphatase (Menard & Malo, 1978) et de la neuraminidase (Dickson & Messer, 1978) sont maximales durant la première semaine de vie postnatale puis diminuent jusqu'au sevrage. A l'inverse, les activités spécifiques de la maltase (Reddy & Wostmann, 1966), de la glucoamylase (Menard & Malo, 1978) et de la tréhalase (Menard & Malo, 1978) sont basses à la naissance et augmentent à partir de la deuxième semaine de vie postnatale. Dans le cas de la sucrase, la transition est particulièrement abrupte. En effet, l'activité de cette enzyme est indétectable dans la muqueuse du rat non sevré. Elle apparaît aux alentours du 15^{ème} jour qui suit la naissance de cet animal (Galand, 1989 ; Henning, 1981) et s'accroît jusqu'après le sevrage.

D'un point de vue immunitaire, on observe, dès le sevrage (jours 20-22), dans le jéjunum du rat, une augmentation du poids des ganglions mésentériques ainsi que du nombre d'éosinophiles et de cellules à mucus. Par la suite (jours 22-24), c'est le nombre de lymphocytes intraépithéliaux qui s'accroît (Cummins *et al.*, 1988). Ces modifications, qui se

déroulent de manière associée à la maturation de la fonction digestive, peuvent être mises en relation avec la colonisation de la muqueuse par une nouvelle flore bactérienne.

Facteurs impliqués dans la régulation de la maturation intestinale

La régulation de la maturation intestinale est un phénomène très complexe faisant intervenir différents systèmes de contrôle. Plusieurs paramètres impliqués dans le processus ont pu être mis en évidence, chacun d'entre eux apparaissant nécessaire mais non suffisant pour induire une maturation complète de l'organe.

Certaines des modifications, observées au moment du sevrage, sont dépendantes, en partie au moins, du statut hormonal de la mère allaitante et, par conséquent, de la composition du lait. En effet, le lait de rate contient un grand nombre d'hormones et de facteurs de croissance comme la thyroxine, la TSH (*thyroid-stimulating hormone*), l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), l'IGF (*insulin-like growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*). Ces substances peuvent induire certains paramètres de la maturation de l'intestin grêle chez les murins (Jumawan & Koldovsky, 1978). Ainsi, des rats connaissent un sevrage plus rapide que les animaux de contrôle lorsque, âgés de 6 jours, ils sont nourris à l'aide de lait récolté d'une rate à 13 jours *post-partum*. Cependant, le moment d'apparition de l'activité de la sucrase n'est pas modifié par ce régime (Henning *et al.*, 1982). D'autres observations confirment l'influence de l'alimentation sur la maturation intestinale. En effet, l'introduction précoce d'aliments solides dans le régime alimentaire de rats nouveaux-nés déclenche la maturation de l'intestin (Goldstein *et al.*, 1971 ; Raul *et al.*, 1978). Cependant, le prolongement de l'allaitement retarde, mais n'empêche pas, l'apparition de cette maturation (Lebenthal *et al.*, 1973).

Outre les hormones contenues dans le lait maternel, les hormones endogènes semblent jouer un rôle important dans l'établissement de la maturation. L'injection de glucocorticoïdes (Jumawan *et al.*, 1972 ; Moog et Yeh, 1979 ; McDonald & Henning, 1992 ; Biol-N'Baragba *et al.*, 2003), de thyroxine (Partridge *et al.*, 1975 ; Moog & Yeh, 1979), d'insuline (Menard & Malo, 1979 ; Menard *et al.*, 1981 ; Buts *et al.*, 1988 ; Shulman, 1990 ; Harada & Syuto, 1991) ou d'EGF (Feldman *et al.*, 1978 ; Malo & Menard, 1982 ; O'Loughlin *et al.*, 1985 ; James *et al.*, 1987) déclenche, au moins partiellement, une maturation intestinale précoce.

Un traitement à la cortisone provoque, chez le rat non sevré, les modifications des activités spécifiques de la sialyltransférase et de la fucosyltransférase observées normalement au moment du sevrage (Chu & Walker, 1986). La dexaméthasone induit une augmentation de l'activité spécifique de la sucrase et de la glucoamylase. Injectée seule, la thyroxine ne provoque aucune modification des activités enzymatiques intestinales. Cependant, l'injection combinée de dexaméthasone et de thyroxine provoque une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline dans le jéjunum et une diminution de celle de la β -galactosidase acide dans l'iléon. L'injection sous-cutanée d'EGF augmente l'activité de la sucrase et de la maltase dans l'iléon (James *et al.*, 1987). En administration intrapéritonéale, chez le lapin, l'EGF accroît la sécrétion d'amylase pancréatique mais n'a pas d'effet sur les activités enzymatiques de la bordure en brosse. Par contre, l'administration par voie orale d'EGF modifie l'activité de dissaccharidases intestinales sans modifier l'activité de l'amylase pancréatique (O'Loughlin *et al.*, 1985). Le traitement de porcs nouveau-nés (Shulman, 1990) à l'hydrocortisone provoque une augmentation des poids relatifs du foie, du pancréas et de l'intestin grêle ainsi que de l'activité spécifique de l'amylase pancréatique. La diminution de l'activité spécifique de la lactase est également plus rapide chez les animaux traités à l'hydrocortisone (Chapple *et al.*, 1989).

Le système endocrinien joue donc un rôle évident au niveau des modifications des activités disaccharidasiques qui surviennent lors du sevrage. Cependant, ces modifications ne sont pas totalement abolies après une hypophysectomie, une thyroïdectomie et/ou une surrénalectomie bilatérale chez le rat (Yeh & Moog, 1974 ; Martin & Henning, 1984).

Afin d'expliquer ces résultats, les chercheurs ont proposé l'existence d'une horloge biologique associée aux entérocytes qui serait à l'origine des modifications morphologiques et fonctionnelles observées lors de la maturation intestinale postnatale. Les résultats obtenus par Yeh et Holt (1986) suggèrent fortement l'existence d'une horloge biologique interne régulant de manière locale l'expression du gène de la sucrase dans l'intestin. Ces auteurs ont transplanté un fragment d'intestin de rat nouveau-né (0 jours) sous la peau d'un rat du même âge. On voit alors apparaître simultanément, au jour 18, l'activité de la sucrase à la fois dans le greffon et dans l'intestin de l'animal greffé. La même expérience, réalisée à partir d'un donneur âgé de 5 jours, montre l'apparition de l'activité de la sucrase dans le greffon lorsque l'animal receveur est âgé de 13 jours. A ce moment, le greffon est âgé de 18 jours et l'intestin de l'hôte ne contient pas encore cette enzyme dont l'activité apparaît 5 jours plus tard, lorsque

l'hôte a 18 jours. Dans le greffon, la synthèse de la sucrase n'est induite ni par le contenu luminal de l'intestin grêle de l'hôte, ni par son système endocrinien. En effet, les hormones auraient dans ce cas induit l'apparition de l'enzyme à la fois chez l'hôte et dans le greffon. Par contre, dans le cas de la lactase, alors que son activité diminue normalement à partir du jour 18 dans l'intestin de l'hôte, aucune modification n'est observée dans le greffon avant que celui-ci n'ait atteint 28 jours. La modification du contenu luminal, subie par l'intestin de l'hôte mais pas par le greffon, semble donc jouer un rôle important dans le déclin de l'activité de cette enzyme. Par ailleurs, le sevrage précoce des rats accélère la disparition de l'activité lactasique (Goldstein *et al.*, 1971 ; Raul *et al.*, 1978) tandis qu'elle est retardée dans le cas d'un court-circuit de l'intestin (Tsuboi *et al.*, 1981).

Au moment du sevrage, le nombre d'antigènes, d'origine alimentaire ou bactérienne, augmente considérablement. La stimulation du système immunitaire semble être impliquée dans le processus de maturation intestinale. En effet, des immunosuppresseurs, comme la cyclosporine A, sont capables de retarder la maturation intestinale qui accompagne le sevrage (Cummins *et al.*, 1989). Par ailleurs, la muqueuse intestinale de rats axéniques est caractérisée par un retard dans l'apparition de la maturation intestinale (Reddy & Wostmann, 1966). Cette stimulation du système immunitaire comprend, entre autres, l'augmentation de la proportion de lymphocytes exprimant le récepteur à l'interleukine 2, CD25. Le blocage de ce récepteur au moyen d'un anticorps réduit l'augmentation de la surface villositaire, de la profondeur des cryptes et du nombre de lymphocytes intraépithéliaux normalement estimé lors du sevrage (Thompson *et al.*, 1996). Dans les plaques de Peyer, l'expression du gène codant pour l'interleukine 1- β est augmentée au moment du sevrage (Mengheri *et al.*, 1996). Par ailleurs, des cytokines pro-inflammatoires peuvent réguler l'expression de la sucrase. En effet, l'interleukine 6 et l'interféron γ réduisent, de manière dose-dépendante, la quantité de pro-sucrasedisomaltase présente dans les cellules Caco-2. Cette réduction n'est pas observée en présence d'interleukine 1- β . A l'inverse, le TNF- α induit, de manière dose-dépendante également, une légère augmentation de la synthèse de la sucrasedisomaltase. Par contre, ces cytokines ne modulent ni la synthèse de la lactase, ni celle de la phosphatase alcaline (Ziambaras *et al.*, 1996).

2. LES POLYAMINES

Les polyamines sont des amines aliphatiques, de faible poids moléculaire, chargées positivement aux pH rencontrés dans la majorité des milieux biologiques. La famille des polyamines naturelles comprend plusieurs membres qui se différencient par le nombre de groupements aminés portés. Ainsi, la putrescine (1,4-diaminobutane) est une diamine, la spermidine (N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) est une tri-amine tandis que la spermine (N,N'-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) possède quatre groupements aminés.

La découverte des polyamines date de 1678 lorsque Antonius van Leeuwenhoek observa des cristaux dans le liquide séminal humain. En 1878, Schreiner a montré que ces cristaux sont composés d'un sel de phosphate d'une base organique, la spermine. Ce n'est qu'entre 1924 et 1927 que la structure de la spermine, de même que celle de la spermidine, ont été élucidées par Rosenheim.

2.1 Distribution des polyamines

Les polyamines sont largement répandues dans la nature. De manière générale, les cellules procaryotes sont caractérisées par une grande concentration en putrescine et une absence de spermine tandis que les eucaryotes ont concentration plus faible en putrescine mais contiennent une grande quantité de spermine.

L'ubiquité des polyamines rend leur présence significative dans notre alimentation (Bardocz *et al.*, 1993 ; Okamoto *et al.*, 1997) et dans le système digestif. Dans le jéjunum de rat Wistar, la concentration luminale en putrescine est d'environ 0,3 mM, celle de spermidine de l'ordre de 0,1 mM et celle de spermine proche de 0,5 mM (Hinuma *et al.*, 1992). Chez l'enfant sain, le fluide duodéal contient environ 95 µM de spermidine et 46 µM de spermine (McEvoy & Hartley, 1975). Une étude plus récente indique que, chez l'adulte à jeun, de grandes quantités de polyamines transitent dans la lumière du jéjunum : 6,9 µmol/20 min de putrescine, 2 µmol/20 min de spermidine et 0,3 µmol/20 min de spermine (Benamouzig *et al.*, 1997).

Dans l'organisme, la concentration en polyamines est particulièrement élevée dans les tissus en prolifération et augmente rapidement lorsque la croissance et la prolifération cellulaires sont induites. L'ornithine décarboxylase (ODC ; E.C. 4.1.1.17), une enzyme-clé de la

biosynthèse des polyamines, possède une activité basale plus élevée dans certains organes, dont l'intestin grêle (Ball & Balis, 1976). Au cours de la gestation, la glande mammaire accumule les polyamines par une variation du métabolisme. Au moment de la parturition, la glande mammaire du rat contient jusqu'à 1500 nmol de spermidine et 130 nmol de spermine par gramme de poids frais. Ces concentrations augmentent encore pendant l'allaitement pour atteindre 5000 nmol de spermidine et 500 nmol de spermine par gramme de poids frais au 13^{ème} jour d'allaitement (Russel & McVicker, 1972). Le lait contient également de grandes quantités de polyamines, variables cependant selon l'espèce considérée (Sanquansermisri *et al.*, 1974 ; Pollack *et al.*, 1992 ; Romain *et al.*, 1992 ; Buts *et al.*, 1995).

2.2 Métabolisme des polyamines

La synthèse des polyamines est initiée à partir de l'ornithine, un acide aminé formé par l'intermédiaire de l'arginase dans le cycle de l'urée (figure I.2-1) ou à partir du glutamate. L'ornithine peut être décarboxylée en putrescine par l'ornithine décarboxylase (ODC ; E.C. 4.1.1.17). Cette réaction nécessite le pyridoxal-phosphate comme cofacteur. Les microorganismes et les plantes supérieures peuvent également produire de la putrescine à partir de l'agmatine provenant de la décarboxylation de l'arginine.

La putrescine peut être transformée en spermidine sous l'action de la synthétase de la spermidine (SpdS ; E.C. 2.5.1.16) qui lui transfère un groupement aminopropyl. A son tour, la spermidine peut être transformée en spermine par la synthétase de la spermine (SpmS ; E.C. 2.5.1.22) selon le même schéma réactionnel. Les groupements aminopropyls transférés proviennent de l'activité de la décarboxylase de la S-adénosylméthionine (SamDC ; E.C. 4.1.1.50). Cette enzyme catalyse la décarboxylation de la S-adénosylméthionine en S-désoxyadénosylméthionine qui est le donneur d'un groupement aminopropyl. Le second produit de cette réaction est du 5'-méthylthioadénosine qui, phosphorylé, produit de l'adénine et du 5'-méthylthioribose-1-phosphate.

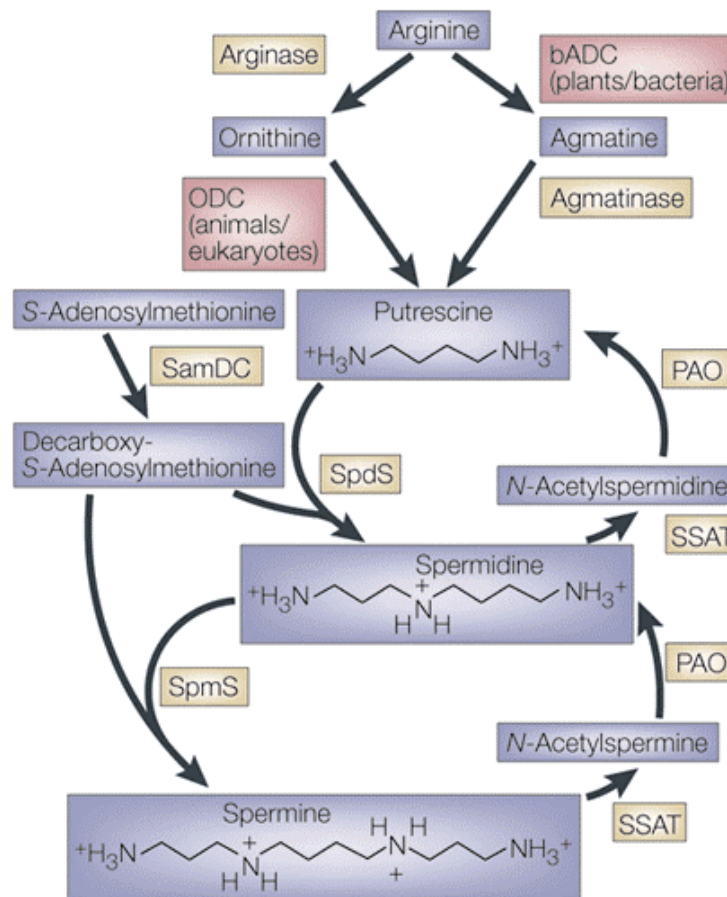


Figure I.2-1 : Métabolisme des polyamines. bADC : décarboxylase de l'arginine ; SamDC : décarboxylase de la S-adénosylméthionine ; SpdS : synthétase de la spermidine ; SpmS : synthétase de la spermine ; SSAT : acétyltransférase de la spermidine/spermine ; PAO : oxydase des polyamines. (D'après Coffino, 2001)

Les réactions catalysées par les synthétases de la spermine et de la spermidine sont considérées comme irréversibles dans les conditions physiologiques. Cependant, la reconversion de la spermine en spermidine et de la spermidine en putrescine est possible grâce à l'intervention de deux enzymes : la spermidine/spermine-acétyltransférase (SSAT ; E.C. 2.3.1.57) et la polyamine oxydase (PAO ; E.C. 1.5.3.11). Les dérivés acétylés de la spermidine et de la spermine, formés sous l'action de la SSAT, peuvent être excrétés par la cellule ou oxydés par la PAO, enzyme dépendant du FAD, reformant alors de la spermidine et de la putrescine. Les autres produits d'oxydation sont le 3-acétaminopropanal et le peroxyde d'hydrogène.

La putrescine peut être dégradée en succinate qui peut alors servir de source d'énergie, par exemple, dans les cellules du tube digestif. Une désamination des polyamines est également possible. Elle peut être catalysée par une aminosydase dépendant du Cu^{2+} . Les produits de cette réaction sont instables et toxiques. A leur tour, ils sont dégradés en urée, eau et CO_2 (Urdiales *et al.*, 2001).

Une autre classe d'enzymes peut utiliser les polyamines comme substrat : les transglutaminases (E.C. 2.3.2.13). Ces enzymes catalysent la liaison d'alkylamines, comme les polyamines, à des résidus glutamine de protéines.

Les variations des concentrations intracellulaires en polyamines interfèrent avec le processus de prolifération cellulaire (Basu *et al.*, 1989). Par ailleurs, un excès de ces substances peut se révéler cytotoxique (Davis, 1990). En conséquence, le pool intracellulaire en polyamines doit être maintenu dans des limites très étroites de concentration, ce qui est rendu possible par l'existence de mécanismes de régulation rapides et précis dans la cellule.

Les décarboxylations de l'ornithine et de la S-adénosylméthionine sont les étapes limitantes du processus de biosynthèse des polyamines. L'ODC est caractérisée par une demi-vie limitée à quelques minutes et qui n'excède pas une à deux heures. Ce *turn-over* rapide permet une régulation fine de la concentration de cette enzyme.

L'ODC est inhibée par les polyamines qui agissent sur la synthèse et la dégradation de l'enzyme. Cette régulation passe par l'intermédiaire d'une protéine particulière, l'antizyme. Celle-ci se lie à l'ODC et la dirige vers une dégradation par le protéasome 26S. Trois formes de l'antizyme ont été identifiées (Ivanov *et al.*, 2000 ; Coffino, 2000). L'antizyme possède également une action inhibitrice sur l'absorption des polyamines (Mitchell *et al.*, 1994 ; Suzuki *et al.*, 1994) et stimule leur excrétion. Enfin, l'activité de l'antizyme est elle-même contrôlée par un inhibiteur qui lui est propre.

La SamDC, seconde enzyme limitant la biosynthèse des polyamines, est une enzyme cytosolique synthétisée sous la forme d'une pro-enzyme qui est ensuite activée selon un processus autocatalytique. La dégradation de la SamDC ne dépend pas d'une association avec une molécule de type « antizyme » et son activité peut être régulée de différentes façons. La demi-vie de l'enzyme est de courte durée, d'autant plus courte que la concentration

intracellulaire en spermidine et en spermine est élevée. Ces deux polyamines répriment la traduction de la SamDC. A l'inverse, la putrescine induit une augmentation de l'activité de cette protéine, vraisemblablement en accélérant la vitesse de clivage de la pro-enzyme (Pegg, 1998). En réponse à des facteurs de croissance et à une diminution de la concentration en spermidine, on observe une augmentation du taux d'ARN messenger codant pour la SamDC.

2.3 Perméabilité cellulaire aux polyamines

En plus des mécanismes de régulation agissant au niveau du métabolisme, les cellules peuvent réguler leur concentration en polyamines en modifiant l'absorption de ces substances à partir du milieu extracellulaire et/ou l'excrétion de celles-ci dans le milieu extracellulaire.

Chez la levure *S. cerevisiae*, il existe un système de transport de haute affinité pour la spermidine et la spermine ainsi qu'un système de transport non saturable et de faible affinité pour les trois polyamines. Une étude réalisée à l'aide de spermidine, couplée à un fluorophore, a montré que le transport était initié par la liaison de la polyamine à la membrane, suivie de la séquestration de cette substance dans un compartiment vésiculaire acide (Soulet *et al.*, 2002 ; Soulet *et al.*, 2004).

Dans la plupart des cellules de mammifères, l'absorption des polyamines dépend de protéines transmembranaires ayant une affinité élevée pour ces polycations (Seiler *et al.*, 1996 ; Urdiales *et al.*, 2001). Ces protéines n'ont pas encore été identifiées. Cependant, on sait que leur activité dépend de l'ATP et est stimulée par le Na⁺ (Seiler & Dezeure, 1990 ; Seiler *et al.*, 1996 ; Urdiales *et al.*, 2001).

Dans le cas de cellules endothéliales humaines, l'absorption des polyamines semble impliquer deux protéines distinctes. La première assurerait le transport de la spermidine et de la spermine ; la deuxième permettrait le passage de la putrescine en plus de la spermidine et de la spermine (Morgan *et al.*, 1990). Cependant, Bardocz et ses collaborateurs (1990 ; 1996) ont suggéré que les polyamines entrent dans les entérocytes par diffusion simple.

Plusieurs arguments expérimentaux permettent de proposer que les polyamines libérées par la flore intestinale sont absorbées par les entérocytes (Milovic, 2001).

2.4 Fonctions des polyamines

Les polyamines interviennent dans un grand nombre de processus biologiques. La plupart de leurs fonctions peuvent être attribuées aux interactions électrostatiques qu'engagent ces polycations avec des sites anioniques présents au niveau des acides nucléiques, des protéines et des membranes cellulaires. Les polyamines ne sont pas associées à d'autres molécules, excepté comme substrat de transglutaminases ou comme la spermidine dans l'hyposine qui joue un rôle essentiel dans la transcription du facteur d'initiation eIF-5A (Park *et al.*, 1997 ; Park., 2006). Elles agissent donc, en général, en tant qu'entités métaboliques indépendantes.

D'une manière générale, les tissus absorbant intensément les polyamines sont caractérisés par un index mitotique élevé. L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des polyamines inhibe la prolifération cellulaire. La putrescine, la spermidine et la spermine interviennent dans la régénération de l'intestin grêle après une résection partielle du jéjunum (Luk & Baylin, 1983) ou après l'administration d'arabinosylcytosine (Luk *et al.*, 1980) alors que l' α -difluorométhylornithine (DFMO), un inhibiteur spécifique de l'ODC, retarde la régénération de l'intestin grêle après ces mêmes traitements.

Les polyamines sont également impliquées dans la différenciation des cellules. Par exemple, dans les chondrocytes et dans les kératinocytes, les polyamines agissent au cours de la différenciation en tant que donneurs d'amines et comme substrats pour des transglutaminases. Ces enzymes établissent des liaisons covalentes permettant le « *cross-linking* » entre les protéines du cytosquelette (Aeschlimann *et al.*, 1995 ; Piacentini *et al.*, 1990). A l'inverse, la différenciation de certains types cellulaires s'accompagne d'une diminution de la concentration intracellulaire en polyamines. Ainsi, traitées au DFMO et à la suramine – une drogue polyanionique affectant le métabolisme et le transport des polyamines –, des cellules B16 de mélanome arrêtent de proliférer et se différencient (Gritli-Linde *et al.*, 1998). Dans les cellules Caco-2, une déficience en polyamines inhibe à la fois la prolifération et la différenciation cellulaire (Herold *et al.*, 1993). L'ajout de spermine au milieu de culture accélère la différenciation des cellules Caco-2, objectivée par la mesure de l'activité spécifique de disaccharidases (Deloyer, communication personnelle). Plus récemment, Maeda et ses collaborateurs (2006) ont montré que les polyamines étaient indispensables à la prolifération et à la différenciation de la lignée érythrocytaire K562. En effet, en présence de DFMO, ces cellules cessent de proliférer mais ne se différencient pas pour autant. La

supplémentation du milieu de culture en putrescine ou en spermine permet de rétablir à la fois les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire. Ainsi, l'effet des polyamines sur la différenciation cellulaire dépend à la fois du type cellulaire considéré et de l'agent de différenciation impliqué.

En neutralisant les charges négatives, les polyamines diminuent la répulsion électrostatique existant entre les brins d'ADN (Pegg & McCann, 1982). La spermine et la spermidine peuvent ainsi condenser l'ADN et induire une transition de la conformation B-Z de certaines séquences (Thomas *et al.*, 1991). Ces interactions semblent être à la base de la régulation qu'exercent les polyamines sur la prolifération cellulaire. Les polyamines peuvent, en effet, stabiliser les complexes de réplication existant entre l'ADN et la matrice nucléaire lors de la division cellulaire et condenser en nucléosomes et en chromatine l'ADN nouvellement synthétisé (Matthews, 1993 ; Raspaud *et al.*, 1999). Par ailleurs, la spermine est capable de protéger les *cores* des nucléosomes de la dénaturation thermique (Morgan *et al.*, 1987).

Les polyamines peuvent également modifier la phosphorylation des protéines. Elles diminuent l'activité de certaines kinases (kinase de l'AMPc, kinases de protéines) mais augmentent l'activité de phosphokinases qui ne sont pas activées par des nucléotides cycliques ou par du Ca^{2+} (Ahmed *et al.*, 1986). Elles modulent aussi le fonctionnement de certains types de « canaux » ioniques de la membrane cellulaire. Ce serait le cas du récepteur au NMDA et de protéines permettant le transfert membranaire soit du K^+ dépendant du voltage, soit du Ca^{2+} (Williams, 1997).

Les polyamines sont, en outre, capables de réguler la signalisation par le Ca^{2+} et de moduler les réponses cellulaires aux hormones, aux neurotransmetteurs et aux *stimuli* extracellulaires dont les effets dépendent du Ca^{2+} (Koenig *et al.*, 1989).

2.5 Polyamines et développement de l'intestin grêle

Les polyamines sont impliquées dans le développement spontané de l'intestin grêle mais sont également capables d'induire ce processus.

Polyamines et maturation intestinale spontanée

La maturation intestinale qui accompagne le sevrage est caractérisée par une augmentation transitoire de l'activité de l'ODC et de la SamDC entraînant une élévation de la concentration intracellulaire en polyamines (Luk *et al.*, 1980). L'administration d' α -difluorométhylornithine (DFMO), un inhibiteur spécifique de l'ODC, retarde l'apparition de la maturation intestinale spontanée.

Lors du sevrage, les animaux ingèrent de la nourriture solide dont la concentration en polyamines est plus élevée que celle du lait maternel (Romain *et al.*, 1992). Puisque l'introduction précoce de cette nourriture dans le régime alimentaire de rats nouveaux-nés déclenche la maturation de l'intestin (Goldstein *et al.*, 1971 ; Raul *et al.*, 1978) et que le prolongement de l'allaitement en retarde l'apparition (Lebenthal *et al.*, 1973), il n'est pas étonnant que les polyamines alimentaires puissent jouer un rôle dans le processus de déclenchement de la maturation intestinale.

L'administration d'insuline (Maudsley *et al.*, 1976) ou d'EGF (Feldmann *et al.*, 1978) induit certains paramètres de la maturation intestinale. Or, ces substances provoquent également une augmentation de l'activité de l'ODC dans l'intestin grêle, suggérant à nouveau une relation entre la maturation de l'intestin et le métabolisme des polyamines.

Induction de la maturation intestinale par ingestion de spermine

En 1988, Dufour et ses collaborateurs ont montré que l'ingestion de spermine par des rats non sevrés induit une modification de l'activité spécifique de la lactase, de la maltase et de la sucrase dans la muqueuse intestinale comparable à celle observée lors de la maturation naturelle de l'intestin grêle. Depuis lors, ces résultats ont été reproduits à de nombreuses reprises par différentes équipes (Buts *et al.*, 1993 ; Shimizu *et al.*, 1993 ; Wild *et al.*, 1993 ; Capano *et al.*, 1994 ; Harada *et al.*, 1994 ; Dorhout *et al.*, 1997 ; ter Steege *et al.*, 1997). En plus de son activité sur les disaccharidases, la spermine induit une diminution de l'activité de la N-acétylglucosaminidase et une augmentation de la Na⁺, K⁺-ATPase (Wild *et al.*, 1993), une diminution de la perméabilité intestinale aux macromolécules (Clarke & Hardy, 1969 ; Harada *et al.*, 1994), une disparition de la vacuole supranucléaire des entérocytes (Dufour *et al.*, 1988) et une augmentation de l'index mitotique au sein des cryptes (Harada *et al.*, 1994).

Plusieurs paramètres trophiques sont également modifiés. En effet, on observe une augmentation de la hauteur des villosités et de la profondeur des cryptes (Dorhout *et al.*, 1997) ainsi qu'un accroissement du poids frais de l'intestin grêle (Buts *et al.*, 1993). L'administration de spermine a des souris non sevrées induit des modifications au niveau du système immunitaire de ces animaux : le pourcentage de lymphocytes intraépithéliaux exprimant le TCR- $\alpha\beta$ et les antigènes CD4, CD5 et CD54 augmente (ter Steege *et al.*, 1997).

L'action de la spermine ne se limite pas à l'intestin mais s'étend au foie (Wéry *et al.*, 1996b), au pancréas (Romain *et al.*, 1998) et à la rate (Peulen *et al.*, 2001b ; Jolois *et al.*, 2002).

Huit heures après son ingestion, la spermine provoque une augmentation de la concentration plasmatique en IL1- β , IL2, IL6 et TNF- α (Kaouass *et al.*, 1997b ; Peulen & Dandrifosse, 2004). Au même moment, on observe une diminution de la concentration en putrescine et en spermidine dans la muqueuse intestinale tandis que celle de la spermine est augmentée (Wéry & Dandrifosse, 1993 ; Wéry *et al.*, 1996a).

L'ingestion de spermine provoque également une altération transitoire de la structure de la muqueuse (Kaouass *et al.*, 1996). On observe alors une importante perte de cellules épithéliales qui s'accompagne d'une apoptose (Peulen *et al.*, 1998b ; Peulen *et al.*, 1999 ; Peulen *et al.* 2001a) et de l'activation de métallo-protéases (Peulen *et al.*, 2001a).

La poursuite du traitement montre, trois jours après l'ingestion de spermine, une résorption complète de la perte cellulaire observée au cours des premières heures. La régénération de l'épithélium intestinal s'accompagne d'une modification de nombreux paramètres. Une comparaison de la maturation intestinale induite par la spermine à la maturation intestinale naturelle montre que ces deux phénomènes sont identiques d'un point de vue histologique, biochimique, immunologique et fonctionnel (Peulen *et al.* 1998c).

Actuellement, le mécanisme moléculaire d'action de la spermine n'est pas complètement connu. Il pourrait s'agir d'une action directe de la polyamine (Kaouass *et al.*, 1994a) ou indirecte (Kaouass *et al.*, 1997a ; Dandrifosse *et al.*, 2000), faisant intervenir plusieurs facteurs provenant, notamment, des systèmes immunitaire et endocrinien.

L'hypothèse selon laquelle la spermine n'agit pas directement sur les entérocytes est supportée par plusieurs observations. En effet, l'injection de la polyamine directement dans la lumière du côlon, séparé de l'intestin grêle par la valvule iléo-cæcale, induit l'activité spécifique de la maltase et de la sucrase dans l'intestin grêle (Kaouass *et al.*, 1994a). Par ailleurs, la mise en contact *in vitro* d'explants intestinaux provenant d'animaux non-sevrés et de spermine n'induit pas de modifications d'activités enzymatiques (Kaouass *et al.*, 1994b). Cette opinion est contestée par différentes observations. Par exemple, des injections intraveineuses, intrapéritonéales ou sous-cutanées de spermine ne modifient pas l'activité de ces enzymes. De plus, une surrénalectomie bilatérale, réalisée préalablement à l'ingestion de spermine, réduit fortement certains paramètres induit lors de la maturation provoquée par cette polyamine (Kaouass *et al.*, 1994b).

Par ailleurs, l'ingestion de spermine par le rat non sevré déclenche rapidement une augmentation de la concentration plasmatique en corticostérone, en ACTH (Kaouass *et al.*, 1992 ; Kaouass *et al.*, 1994b) et en cytokines (Kaouass *et al.*, 1997b ; Peulen & Dandrifosse, 2004). La concentration intestinale en bombésine est également modifiée (Kaouass *et al.*, 1997a). L'ensemble de ces observations met en évidence le rôle de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien dans l'induction de la maturation par la spermine.

Certaines cytokines (IL1- β , IL6 et TNF- α), dont la concentration plasmatique augmente quelques heures après l'ingestion de spermine, sont impliquées dans l'activation de cet axe (Roh *et al.*, 1987 ; Cambronerio *et al.*, 1992 ; van der Meer *et al.*, 1996).

L'injection de LPS induit rapidement une augmentation de la concentration plasmatique en IL1- β , IL6 et TNF- α et provoque une maturation partielle de l'intestin grêle de l'animal non sevré (Peulen & Dandrifosse, 2004). Injectées individuellement, ces cytokines provoquent l'augmentation de l'activité spécifique de disaccharidases intestinales (Kaouass *et al.*, 1997b). Cependant, la neutralisation individuelle de leur activité biologique, à l'aide d'anticorps, n'empêche pas l'induction de la maturation par l'ingestion de spermine (Peulen & Dandrifosse, 2004). Si les productions d'IL1- β et de TNF- α sont neutralisées simultanément, l'augmentation de l'activité spécifique de la sucrase suite à l'ingestion de spermine est inhibée. Lorsque de l'IL2 est administrée en injection intrapéritonéale, on observe une diminution de l'activité spécifique de la lactase chez l'animal non sevré. Ces résultats suggèrent que les cytokines sont effectivement de bonnes candidates pour relier l'intestin grêle à l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. Cependant, leur action sur les disaccharidases intestinales diffère dans certains cas de celle de la spermine. L'injection

d'IL1- β , par exemple, augmente l'activité spécifique de la lactase alors qu'elle diminue lors de la maturation induite par l'ingestion spermine, tout comme dans le cas de la maturation spontanée.

3. OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'administration de spermine, dans des conditions expérimentales précises à des rats non sevrés est considérée comme un modèle permettant de déclencher à un moment donné la maturation de l'intestin grêle. Ce déclenchement à la demande permet l'étude des mécanismes moléculaires menant à la maturation intestinale naturelle. Cependant, dans les heures qui suivent l'ingestion de spermine par le rat non-sevré, l'épithélium intestinal subit une perte cellulaire importante (Kaouass *et al.*, 1996; Peulen *et al.*, 2001a). Les analyses histologiques réalisées après la perte de cellules sont comparables à celles réalisées après une ischémie intestinale (Kummerlen *et al.*, 1994) ou lors d'épisodes de la maladie cœliaque (Sollid, 2002).

La compréhension des mécanismes menant à la perte des cellules et à la maturation est importante afin de mieux appréhender l'étiologie de certaines pathologies. La spermine pourrait être utilisée comme agent préventif de pathologies dont l'étiologie réside dans une carence de cette maturation. En effet, certaines entéropathies infantiles semblent avoir pour cause une déficience en polyamines, maintenant l'immaturation de l'intestin grêle (Kanof *et al.*, 1987).

Afin de mieux comprendre les effets de l'ingestion de spermine, à court et à long terme, nous proposons d'analyser les modifications qui surviennent au niveau de paramètres caractérisant des protéines contenues dans les entérocytes du rat non sevré après l'ingestion de la polyamine. Les entérocytes constituent en effet la population cellulaire majeure de l'intestin grêle et sont directement impliqués dans la fonction digestive de l'organe.

La spermine semble agir à différents niveaux dans l'organisme et posséder ainsi plusieurs cibles d'action sur les cellules, de manière directe dans la lumière intestinale ou indirecte par l'intermédiaire d'hormones. Le criblage des protéines qui subissent une modification dans les entérocytes, après administration de spermine, devrait permettre de détecter et d'identifier des protéines impliquées dans la maturation de ces cellules. La technologie de choix pour accomplir cette tâche est l'analyse différentielle de la distribution des protéines cellulaires

ayant migré par électrophorèse et l'identification par spectrométrie de masse des protéines dont des paramètres, telle la concentration, varient en fonction du traitement.

L'analyse des variations survenant au sein du protéome cellulaire, trois jours après l'ingestion de spermine, devrait permettre la mise en évidence de protéines particulières, impliquées dans le processus de maturation de l'intestin grêle ou caractéristiques d'un phénotype cellulaire spécifique. La même étude, réalisée quelques heures après l'ingestion de la polyamine, devrait permettre de caractériser la phase de desquamation initialement observée.

II. MATERIEL ET METHODES

Tout au long de notre travail, les mêmes techniques d'investigations ont été utilisées. Pour cette raison, nous avons choisi de rassembler l'ensemble des méthodes employées au sein de ce chapitre.

1. ANIMAUX

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats Wistar (*Rattus norvegicus*) provenant de l'élevage du laboratoire de Biochimie et de Physiologie générale. Ils sont élevés dans un environnement contrôlé à 23°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux sont nourris avec une alimentation standard pour élevage (Carfill) et ont de l'eau *ad libitum*. Le jour de la naissance est considéré comme étant le jour 0. Dans nos expériences, aucune distinction n'est faite entre les sexes : il n'y a pas de différence en ce qui concerne le poids corporel des mâles et des femelles à l'âge auquel les animaux sont employés. Puisqu'il est connu que les valeurs expérimentales varient d'une portée à l'autre, les comparaisons sont réalisées au sein d'une même portée. Les comités d'éthique animale de l'Université de Liège et du FRSM ont approuvé les expériences réalisées.

Les animaux d'une même portée sont répartis aléatoirement dans les différents groupes expérimentaux. Du tétrahydrochlorure de spermine (0,4 $\mu\text{mol/g}$ de poids corporel), dissous dans 50 μl d'eau, est administré oralement aux rats appartenant à l'un des groupes à l'aide d'une pipette automatique munie d'un embout souple. Les animaux appartenant au groupe « témoin » sont traités de façon identique mais reçoivent uniquement le véhicule de la spermine. Dans le cadre du traitement à long terme, la spermine est administrée une fois par jour pendant 3 jours (jours 11, 12 et 13). Une seule administration de spermine (0,4 $\mu\text{mol/g}$ de poids corporel dans 50 μl d'eau) est effectuée lors de l'étude des effets à court terme du traitement. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale au jour 14 pour l'étude à long terme ou 2, 4, 6 et 18 heures après l'ingestion de spermine dans le cadre de l'étude à court terme. Après le gavage, les animaux sont immédiatement replacés auprès de leur mère.

Un traitement particulier est appliqué dans le cadre de l'étude concernant l'implication éventuelle de la phospholipase C (PLC) dans le mécanisme d'action de la spermine. Dans ce cas, les rats de 11 jours reçoivent, par injection intraveineuse, un inhibiteur synthétique de la PLC (U73122 ; Alexis Biochemicals ; 2 mM) dilué dans du NaCl (0,9% ; p:v), 15 minutes avant l'ingestion orale de spermine. Les rats du groupe témoin reçoivent uniquement le véhicule. Les animaux sont sacrifiés au 14^{ème} jour, sans que la prise orale de spermine ne soit répétée aux 12^{ème} et 13^{ème} jours.

2. DISSECTION

L'intestin grêle est prélevé immédiatement après le sacrifice des animaux et lavé dans une solution de NaCl (0,9%) à 0°C. Le duodénum est éliminé jusqu'à l'anse de Treitz. L'intestin grêle est divisé en deux fragments de longueurs égales, dénommés respectivement jéjunum et iléon. Ces deux organes subissent alors différents traitements en fonction de l'analyse envisagée. Une portion (environ 1 cm) de chacun des organes est homogénéisée dans de l'eau distillée (4,15 ml/g de poids frais) grâce à un homogénéisateur (Ultra-Turrax T8, Ika). Les homogénats sont maintenus à -20°C. Ils pourront servir à l'analyse d'activités enzymatiques. Une autre portion de chacun des organes est homogénéisée directement dans une solution de lyse (kit RNAgent, Promega) et conservée à -70°C pour l'extraction ultérieure d'ARN total. Enfin, le reste de chacun des organes est utilisé pour l'isolement des cellules épithéliales.

3. ISOLEMENT DES CELLULES INTESTINALES

L'isolement des entérocytes est réalisé selon une méthode voisine de celle décrite précédemment par Weiser (1973). Le jéjunum et l'iléon, après lavage, sont incubés dans une solution contenant de l'EDTA. La chélation du calcium provoque un affaiblissement des jonctions qui solidarisent les cellules. L'agitation permet de détacher les entérocytes du chorion.

Matériel

L'isolement des entérocytes par la technique décrite par Weiser (1973) requiert la préparation de plusieurs solutions :

- Solution de lavage : NaCl (0,15 mM), DTT (1 mM), PMSF (0,004 %; p:v).
- Solution A : NaCl (96 mM), Citrate de sodium (27 mM), KCl (1,5 mM), KH₂PO₄ (8 mM), Na₂HPO₄ (5,6 mM), PMSF (0,004 %; p:v). Amener le pH de la solution à 7,4.
- Solution B : NaCl (109 mM), KCl (2,4 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), NaH₂PO₄ (4,3 mM), EDTA (1,5 mM), DTT (0,5 mM), PMSF (0,004 %; p:v). Amener le pH de la solution à 7,4.
- PBS: NaCl (154 mM), Na₂HPO₄ (3 mM), KH₂PO₄ (1 mM). Amener le pH de la solution à 7,2.

Méthode

Après la dissection, l'intestin grêle est rincé au moyen de la solution de lavage. Les organes, jéjunum et iléon, sont ouverts sur leur longueur. Ils sont placés séparément dans la solution A, à 37°C, sous agitation pendant 15 minutes. Après ce délai, les organes sont déposés dans la solution B pendant des durées variables. Cette incubation permet aux cellules de se détacher du chorion. Différentes durées d'incubation sont appliquées afin de récupérer des fractions cellulaires situées de plus en plus profondément dans l'épithélium intestinal. Six incubations successives de 10 minutes à 37°C et sous agitation sont ainsi réalisées.

Les fractions cellulaires récoltées dans la solution B sont centrifugées à température ambiante pendant 10 minutes à 500 g. Le culot est lavé dans 1 ml de PBS et centrifugé 5 minutes à 500 g. Cette manipulation est répétée 3 fois. Le culot est récupéré et conservé à -20°C.

4. DOSAGES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES

4.1 Dosage des activités disaccharidasiques

Les activités de disaccharidases [lactase (EC 3.2.1.23), sucrase (EC 3.2.1.48) et maltase (EC 3.2.1.20)], contenues dans les homogénats d'intestin, sont dosées selon la méthode décrite par Dahlqvist (1964). Cette technique a fait l'objet d'une validation au sein de notre laboratoire.

Pendant 60 minutes, les homogénats d'intestin sont incubés à 37°C en présence des substrats des enzymes (lactose, saccharose et maltose). La première étape de l'analyse consiste en l'hydrolyse des substrats en monosaccharides dont l'un au moins est du glucose. La quantité

de glucose produite durant cette incubation est mesurée après inhibition de l'activité des disaccharidases par une solution de TRIS (pH 7). La mesure de la quantité de glucose libérée repose sur une série de réactions enzymatiques couplées par des intermédiaires communs. Ainsi, l'oxydation du glucose, catalysée par l'oxydase du glucose, fournit du peroxyde d'hydrogène. La peroxydase catalyse la réaction de transformation de l' H_2O_2 en H_2O et en radical O° . Ce radical O° oxyde l'ortho-dianisidine réduite incolore en ortho-dianisidine oxydée de couleur orange. Une mesure spectrophotométrique à la longueur d'onde de 420 nm permet de déterminer la quantité d'ortho-dianisidine oxydée, suite à la série de réactions, et ainsi de déduire la quantité de substrat hydrolysée par les disaccharidases en utilisant comme référence une courbe étalon réalisée à l'aide de solutions de glucose.

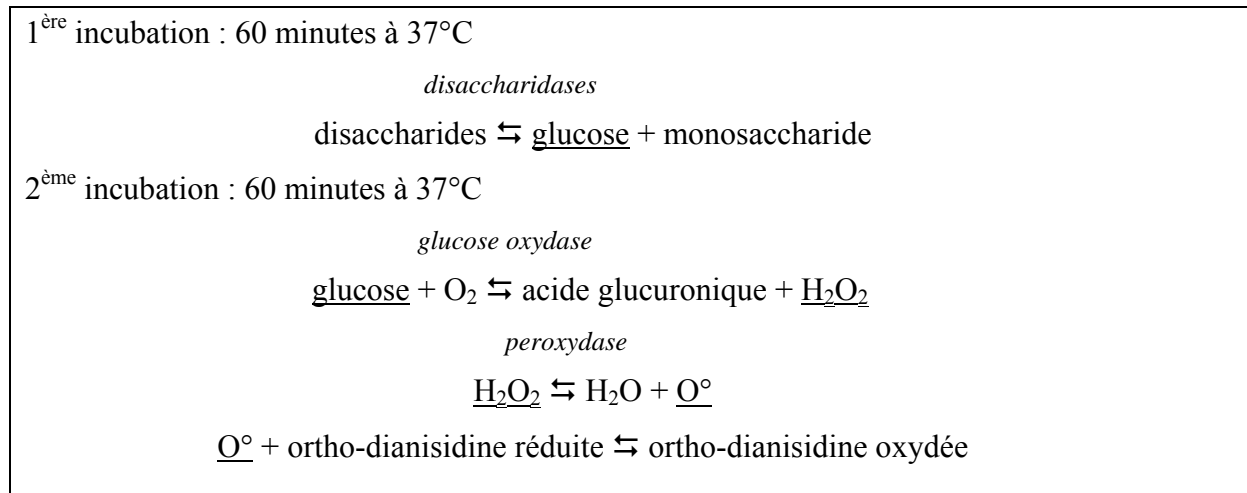


Figure II-1 : Principe du dosage de l'activité des disaccharidases intestinales.

Matériel

Le dosage de l'activité de disaccharidases intestinales nécessite la préparation de plusieurs solutions :

Solution de TRIS-Glucose Oxydase (TGO)

La solution de TRIS-Glucose Oxydase (TGO) est préparée comme suit : 2 mg de glucose oxydase sont mis en solution dans 60 ml de TRIS-HCl (0,5 M ; pH 7). On y ajoute 500 μl de solution d'ortho-dianisidine (10 mg/ml, préparée extemporanément lors de la réalisation du TGO), 500 μl de solution de peroxydase (1 mg/ml) ainsi que 1 ml de Triton X-100 (0,25 g/g d'éthanol). Le volume est amené à 100 ml avec du tampon TRIS-HCl (0,5 M ; pH 7). Le réactif TGO est conservé à l'abri de la lumière, à 4°C, pendant une semaine maximum.

Tampon maléate

Le tampon maléate est une solution d'acide maléique (0,1 M) dont le pH est amené à la valeur de 6 grâce à une solution de NaOH (1 M).

Substrat-maléate

Les solutions de substrat-maléate (lactose-maléate, saccharose-maléate ou maltose-maléate) sont des solutions de lactose, de saccharose ou de maltose (0,056 M) dissous dans du tampon maléate (0,1 M ; pH 6).

Substrat-eau

Les solutions de substrat-eau (lactose-eau, saccharose-eau ou maltose-eau) sont des solutions de lactose, de saccharose ou de maltose (0,056 M) dissous dans de l'eau ultrapure.

Solution stock de glucose

La solution stock de glucose est une solution de glucose monohydraté (2,5 mM) dissous dans de l'eau ultrapure.

Méthode

Cent µl d'homogénat d'intestin grêle sont dégelés et deux dilutions sont réalisées. Cinquante µl d'homogénats sont dilués 40 fois. Ils servent à mesurer les activités de la lactase et de la sucrase. L'autre partie de l'homogénat est diluée 200 fois. Elle est utilisée pour mesurer l'activité de la maltase.

Les tubes destinés à la mesure de l'activité de la lactase ou de la sucrase reçoivent 50 µl des homogénats dilués 40 fois. Les tubes destinés à la mesure de l'activité de la maltase reçoivent 50 µl des homogénats dilués 200 fois. Les tubes destinés à tenir compte de l'éventuelle contamination des homogénats et des différentes solutions par du glucose sont appelés « blanc lactase » (BL), « blanc sucrase » (BS) et « blanc maltase » (BM). Ces tubes reçoivent 50 µl d'homogénat dilués 40 fois (BL, BS) ou 50 µl d'homogénat dilués 200 fois (BM).

Au temps « 0 minute », on ajoute 50 µl d'une solution de substrat-maléate aux 50 µl d'homogénat dilué. Les tubes BL, BS et BM reçoivent, à la place des solutions de substrat-maléate, 50 µl de tampon maléate (0,1 M ; pH 6). Tous les tubes sont vigoureusement agités puis placés dans un bain-marie réglé à la température de 37°C agitant à raison de 70 oscillations par minute. Cette incubation dure 60 minutes et permet l'hydrolyse des substrats en monosaccharides.

Durant cette incubation, une droite étalon de glucose est préparée en diluant la solution stock de glucose avec de l'eau ultrapure afin d'obtenir des concentrations de glucose variant de 0 à 2,5 mM.

Après 60 minutes d'incubation, tous les tubes reçoivent 1,5 ml du réactif « TGO » de manière à stopper l'hydrolyse des substrats dans les tubes destinés à mesurer l'activité des disaccharidases et afin d'initier la mesure de la quantité de glucose libérée par cette hydrolyse ou contaminant les différentes solutions. De façon à tenir compte de toutes les solutions lors de la mesure du glucose contaminant et afin d'obtenir des volumes identiques dans tous les tubes, 50 µl d'eau, 50 µl de solution de substrat-eau et 50 µl de tampon maléate sont ajoutés respectivement aux tubes destinés à mesurer l'activité des disaccharidases, aux tubes «blancs» et aux tubes de la courbe étalon. Après une agitation vigoureuse, les tubes sont incubés pendant 60 minutes à 37°C.

Après cette 2^{ème} incubation, tous les tubes sont centrifugés à 1 000 g pendant 3 minutes afin de précipiter d'éventuels débris cellulaires.

L'absorbance des surnageants est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre (Uvikon XS ; Biotech) réglé à la longueur d'onde d'émission de 420 nm.

Les activités spécifiques des disaccharidases sont exprimées en µmol de substrat hydrolysé par minute et par g de protéines.

4.2 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1), contenue dans les homogénats d'intestin, est dosée par la méthode décrite par Millington et Tovell (1969). Cette technique repose sur l'hydrolyse du phosphate de paranitrophényl. Cette hydrolyse libère du paranitrophénol de couleur jaune. Une mesure spectrophotométrique, effectuée à la longueur d'onde de 410 nm, permet de déterminer la quantité de paranitrophénol libéré par l'activité de la phosphatase alcaline par référence à une droite étalon.

Matériel

Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline nécessite la préparation de plusieurs solutions :

Tampon Ethyl-Amino Ethanol (TEAE)

Le tampon « Ethyl-Amino Ethanol » (TEAE) est composé de $MgSO_4$ (1 mM) et d'éthyl-amino-2-éthanol (2,175 mM). Le pH de la solution est ajusté à 9,3 à l'aide d'HCl (1 M).

Solution de substrat

La solution de substrat est une solution de phosphate de paranitrophényl disodique (1,5 mM) dissous dans du TEAE.

Méthode

Dix μ l d'homogénat d'intestin grêle sont dégelés puis dilués 4 000 fois à l'aide d'eau distillée. Cinq cents μ l de la suspension obtenue sont combinés à un même volume de TEAE. Le mélange est préincubé à 37°C pendant 10 minutes. Au temps « 0 minute », les échantillons reçoivent 500 μ l de la solution de substrat et sont incubés à 37°C pendant 20 minutes sous une agitation de 70 oscillations par minute. Les échantillons nommés « blancs » ne reçoivent pas le substrat mais du TEAE. Au temps « 20 minutes », la réaction est arrêtée par l'ajout de 500 μ l de NaOH (1 M).

Durant cette incubation, une droite étalon est préparée en diluant une solution de paranitrophénol (1 M) avec de l'eau ultrapure, afin d'obtenir des concentrations variant de 0 à 28 μ g/ml (0 à 0,2 mM).

L'absorbance des solutions est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre (Uvikon XS ; Biotech) réglé à la longueur d'onde d'émission de 410 nm.

L'activité spécifique de la phosphatase alcaline est exprimée en μ mol de substrat hydrolysé par minute et par g de protéines.

4.3 Dosage de l'activité de la cathepsine D

Dosage d'activité basé sur l'hydrolyse de l'hémoglobine

La méthode de dosage de l'activité spécifique de la cathepsine D utilisée dans cette étude est adaptée des méthodes décrites par Cunningham (1975) et Reville (1976). Le principe du dosage se base sur la capacité que possède la cathepsine D d'hydrolyser l'hémoglobine en milieu acide. Après une incubation des échantillons dans une solution contenant de l'hémoglobine, les protéines sont précipitées par de l'acide trichloracétique. Une étape de filtration des échantillons permet de récupérer les peptides libérés par l'activité de la cathepsine D. L'absorbance de ces peptides est déterminée au moyen d'un spectrophotomètre

(Uvikon XS ; Biotech) réglé à la longueur d'onde de 280 nm. Un contrôle est réalisé en mélangeant un échantillon à doser avec la solution d'hémoglobine juste avant l'étape de précipitation.

Matériel

Le dosage de l'activité de la cathepsine D nécessite la préparation d'une solution de formiate de sodium (0,5 M ; pH ajusté à 3,2 avec HCl 1 M), d'une solution d'hémoglobine bovine (5 % ; v:v) et d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA ; 3 % ; v:v).

Méthode

Cinq cent µg de protéines sont incubés pendant 60 minutes, à 37°C, dans un mélange composé de 200 µl de la solution d'hémoglobine et de 200 µl de formiate de sodium. Deux ml et demi de TCA sont ajoutés au mélange. On procède à une deuxième incubation de 60 minutes, à 4°C. L'étape de filtration est réalisée sur filtre Wathman n°1. L'absorbance de la solution obtenue est lue au moyen d'un spectrophotomètre (Uvikon XS ; Biotech) réglé à la longueur d'onde d'émission de 280 nm.

Dosage d'activité basé sur l'hydrolyse d'un substrat spécifique

L'activité de la cathepsine D peut également être mesurée par l'hydrolyse d'un substrat spécifique de cette enzyme, le BOC-Phe-Ala-Ala-pNitro-Phe-Phe-Val-Leu-4 hydroxyméthylpyridine ester (Agarwal & Rich, 1983). Un des produits de cette hydrolyse absorbe la lumière à la longueur d'onde de 310 nm. La variation de l'absorbance du milieu réactionnel en fonction de la durée d'hydrolyse du substrat permet de calculer la vitesse initiale de l'enzyme.

Matériel

Le dosage de l'activité de la cathepsine D nécessite la préparation d'une solution de formiate de sodium (0,01 M ; pH 3,5) et d'une solution stock de BOC-Phe-Ala-Ala-pNitro-Phe-Phe-Val-Leu-4 hydroxyméthylpyridine ester (Sigma) dilué dans du DMSO (1 mM).

Méthode

400 µl d'homogénat sont centrifugés à 5000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et dilué 100x avec de l'eau ultrapure. Cent µl de ce surnageant sont mélangés à 890 µl de la solution de formiate de sodium. Dix µl de la solution de substrat sont ensuite ajoutés à la

solution obtenue, juste avant de procéder au dosage. Les variations d'absorbance de cette dernière sont enregistrées pendant au moins 10 minutes au moyen d'un spectrophotomètre (Uvikon XS ; Biotech) réglé à la longueur d'onde d'émission de 310 nm.

5. EXTRACTION DES PROTEINES

Les protéines intestinales sont isolées après avoir mélangé les homogénats d'intestin grêle avec une solution de lyse. Les détergents contenus dans cette solution mettent en solution les protéines contenues dans l'échantillon.

Matériel

La solution de lyse contient du TRIS-HCl (50 mM, pH 7,4), du NaCl (150 mM), de l'Igepal (1 %, v:v), du désoxycholate de sodium (1 %, p:v), de l'iodoacétamide (5 mM), du Triton X-100 (1 %, v:v) et du PMSF (2 mM).

Méthode

Deux cent µl d'homogénat intestinal sont mélangés à 200 µl de la solution de lyse. Le tout est placé sur glace pendant 15 minutes. La solution est ensuite clarifiée par centrifugation à 22 000 g pendant 60 minutes à 4°C. Après la centrifugation, les protéines sont récupérées dans le surnageant. Celui-ci peut être conservé à -20°C.

6. DOSAGE DES PROTEINES

La concentration en protéines contenues dans les homogénats de jéjunum et d'iléon est estimée par la méthode de Bradford (1976). Celle-ci est basée sur un changement de coloration de l'échantillon analysé, dû au bleu de Coomassie qui réagit avec les groupements aminés libres des protéines. L'absorbance des solutions, mesurée à la longueur d'onde de 595 nm, est proportionnelle à la concentration des protéines présentes dans les échantillons.

Matériel

Le dosage des protéines intestinales nécessite la préparation de plusieurs solutions.

Réactif de Bradford

Le réactif de Bradford est une solution contenant du Bleu de Coomassie (0,005 % ; p:v), du méthanol (5 % ; v:v) et de l'acide phosphorique (8,5 % ; v:v). Cette solution est filtrée sur Büschner au travers d'un filtre Whatman n°12 puis conservée à température ambiante dans l'obscurité.

Solution stock d'albumine de sérum de bœuf (BSA)

Une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA ; 500 µg/ml) est préparée. Elle est répartie en fractions de 1 ml dans des tubes en polystyrène. Les fractions sont conservés à -20°C.

Méthode

Les homogénats intestinaux sont dilués 800 fois à l'aide d'eau distillée, de manière à ce que leur concentration en protéines soit comprise entre les points extrêmes de la courbe étalon. Deux ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 50 µl des échantillons dilués. Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance des échantillons est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre (Uvikon XS ; Biotech) réglé à la longueur d'onde d'émission de 595 nm.

Une droite étalon est réalisée à partir de la solution stock de BSA. Des dilutions sont réalisées afin d'obtenir des concentrations en BSA variant de 0 à 50 µg/ml.

7. ELECTROPHORESE EN UNE DIMENSION

Les protéines extraites des homogénats intestinaux sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivant la technique décrite par Laemmli (1970). Dans le système de Laemmli, les protéines sont dénaturées par chauffage dans un tampon contenant du β-mercaptoéthanol et du dodécyl-sulfate de sodium (SDS). Les peptides résultant de cette dénaturation prennent alors une forme « rod-like » et ont un rapport charge/masse proportionnel à leur poids moléculaire. Les protéines sont séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire.

Matériel

La migration électrophorétique des protéines nécessite la préparation de plusieurs solutions.

Acrylamide/Bis [30% T, 2,67% C]

Dans un jaugé de 100 ml, 29,2 g d'acrylamide et 0,8 g de N'N'-bis-méthylène-acrylamide sont mis en solution avec de l'eau ultra pure. La solution est ensuite filtrée sur papier Whatman n°1.

Tampon de gel de résolution

Le tampon de gel de résolution est une solution contenant 1,5M de TRIS-HCl (pH 8,8).

Tampon de gel de concentration

Le tampon de gel de concentration est une solution contenant 0,5M de TRIS-HCl (pH 6,8).

Tampon d'échantillon

Le tampon d'échantillon contient

- 1,25 ml de tampon de gel de concentration
- 2,5 ml de glycérol
- 2 ml de SDS 10 % (p:v)
- 200 µl de bleu de bromophénol (0,5 %; p:v)

Tampon de migration

Le tampon de migration concentré 10x est préparé par dissolution de TRIS (0,25 M), de glycine 51,92 M) et de SDS (1 %) dans de l'eau ultrapure.

Méthode

Préparation du gel de résolution (10% en acrylamide)

La séparation des protéines est réalisée dans un gel dit « de résolution » contenant 10% d'acrylamide. L'épaisseur du gel est de 0,75 mm. La solution de monomères est préparée en mélangeant :

| | |
|-----------------------------------|---------|
| H ₂ O | 4,1 ml |
| Acrylamide/bis [30 % T, 2,67 % C] | 10 % |
| Tampon de résolution | 0,375 M |
| SDS (10 %) | 1 % |

La solution est dégazée pendant 15 minutes. Cinquante µl de persulfate d'ammonium (APS ; 10%) et 5 µl de N,N,N,N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) sont ajoutés à la solution juste avant de couler le gel. Le sommet du gel est ensuite recouvert d'isobutanol saturé en eau. Lorsque le gel est polymérisé, la surface de celui-ci est rincée avec de l'eau puis séchée à l'aide d'un papier filtre.

Préparation du gel de concentration (4% en acrylamide)

Le chargement des protéines se fait dans un gel dit « de concentration » contenant 4% d'acrylamide. L'épaisseur du gel est de 0,75 mm. La solution de monomères est préparée en mélangeant :

| | |
|-----------------------------------|---------|
| H ₂ O | 3,05 ml |
| Acrylamide/bis [30 % T, 2,67 % C] | 4 % |
| Tampon de concentration | 0,125 M |
| SDS (10 %) | 1 % |

La solution est dégazée pendant 15 minutes. Juste avant de couler le gel, 50 µl d'APS (10%) et 5 µl de TEMED sont ajoutés au mélange de monomères. On insère ensuite le peigne, qui servira à la formation des puits pendant la polymérisation, dans la partie supérieure du gel.

Préparation des échantillons et chargement des puits

Les échantillons sont dilués de façon à séparer 30 µg de protéines par puit. Un tampon de chargement est réalisé extemporanément en ajoutant 50 µl de β-mercaptoéthanol à 950 µl de tampon d'échantillon. Dix µl du tampon de chargement sont ajoutés à 10 µl d'échantillon contenant 30 µg de protéines. Le mélange est chauffé à 95°C pendant 4 minutes, puis conservé sur glace jusqu'au moment du chargement sur le gel d'électrophorèse.

La cuve d'électrophorèse est remplie au moyen du tampon de migration. L'électrophorèse est réalisée en appliquant un courant continu constant de 200 volts pendant environ 50 minutes. La migration des protéines s'effectue vers la borne positive.

8. ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

L'électrophorèse bidimensionnelle, introduite par O'Farrell et Klose (1975), permet la séparation de protéines d'un échantillon selon deux propriétés distinctes, en deux étapes successives. La première étape consiste en une focalisation isoélectrique (IEF) qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique (pI). La deuxième étape est une électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui permet la séparation des protéines selon leurs poids moléculaires, tel que décrit par Laemmli (1970). Dans ce travail, les protéines sont ensuite mises en évidence sur le gel de deuxième dimension par une coloration à l'argent, compatible avec la spectrométrie de masse (figure II.2)

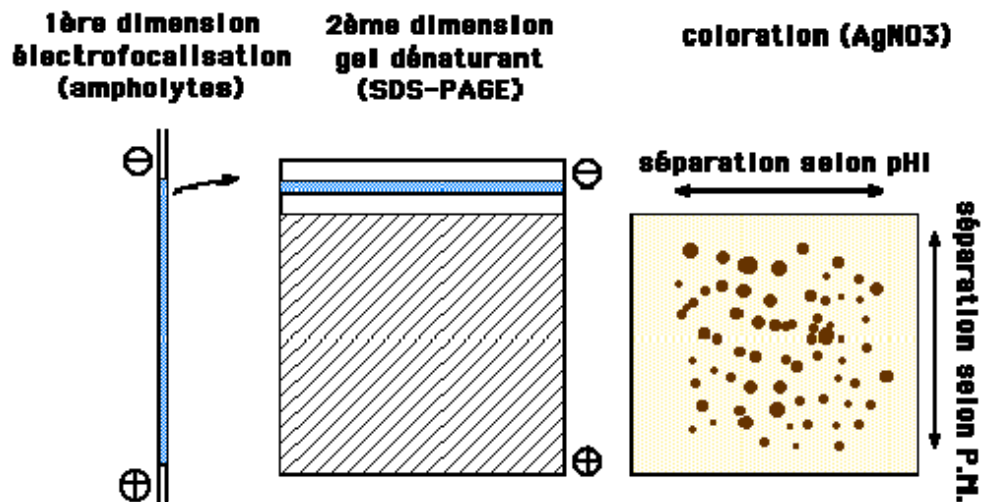


Figure II.2 : Séparation des protéines par électrophorèse en deux dimensions. A : Séparation des protéines selon leur point isoélectrique sur gradient de pH immobilisé ; B : Transfert des protéines sur le gel de deuxième dimension et séparation selon leur masse moléculaire ; C : Révélation des protéines sur le gel de deuxième dimension par une coloration à l'argent.

Préparation de l'échantillon

Les cellules isolées sont lysées dans un tampon contenant du SDS (0,1 %; p:v) et du TRIS (10 mM), amené à pH 8,8 au moyen d'HCl (1 M). L'utilisation d'un kit de précipitation des protéines permet d'optimiser la pureté de l'échantillon ainsi que le rendement d'extraction. Les protéines sont précipitées par l'utilisation du *PlusOne 2D Clean-Up kit* (Amersham Biosciences). Le culot de protéines est remis en solution dans un tampon contenant de l'urée (7 M), du 3-[(3-Cholamidopropyl)-Diméthylammonio]-1-Propane Sulfonate (CHAPS ; 4 % ; p:v), du dithiothréitol (DTT ; 0,2 % ; p:v) et des ampholytes (*IPG Buffer*, Amersham Biosciences ; 2 %). L'échantillon est ensuite désalé sur colonne chromatographique d'exclusion de taille.

Première dimension de l'électrophorèse : focalisation isoélectrique

A un pH donné, les protéines ont une charge nette et précise reflétant le mélange d'acides aminés dont elles sont formées. Un champ électrique appliqué à une solution contenant des protéines fera migrer celles-ci à une vitesse dépendant de leur charge nette, de leur taille et de leur forme. Lors de la focalisation isoélectrique, l'échantillon est dissous dans une solution

contenant un détergent non ionique et un agent dénaturant. Cette solution solubilise, dénature et dissocie toutes les chaînes polypeptidiques sans modifier leur charge intrinsèque.

La migration des protéines s'opère dans un gel de polyacrylamide étroit au sein duquel est établi un gradient de pH. Ce gradient est réalisé grâce à l'incorporation, au sein du gel, de molécules (Immobilines) dont le groupement acide ou basique se lie à un monomère d'acrylamide. Sous l'effet d'un champ électrique, chaque protéine migre vers la position du gradient de pH correspondant à son point isoélectrique et s'y immobilise.

Les gels de première dimension ou *strips* sont commercialisés prêts à l'emploi, sous forme déshydratée, avec un gradient de pH établi. Ils sont disponibles en différentes longueurs, comprenant des gradients de pH plus ou moins étroits, linéaires ou non. Dans ce travail, nous utilisons des gels de première dimension de 24 cm de longueur, permettant de séparer les protéines sur un intervalle de pH compris entre 4 et 7.

Matériel

Cuve de migration *Protean IEF cell* (Biorad, figure III.3.A)

Immobilines *DryStrips* (Amersham Biosciences)

Tampon de réhydratation : urée (7 M), CHAPS (4 %, p:v), DTT (0,2 %, p:v), ampholytes (*IPG Buffer* Amersham Biosciences, 2 %, v:v).

Huile minérale

Méthode

Les gels utilisés pour la première dimension (Immobilines *drystrips*) doivent, au préalable, être réhydratés afin de permettre la migration des protéines. Ils sont déposés directement dans le portoir de la cuve de migration en présence de l'échantillon (figure III.3.B). Ce portoir est constitué de rainures dans lesquelles sont déposés les gels et 400 µl de tampon de réhydratation contenant 150 µg de protéines à séparer. Le tout est recouvert par 2 ml d'huile minérale.

L'hydratation des *strips* peut être passive ou active. La réhydratation passive dure 12 heures. La réhydratation active dure 9 heures et est obtenue en appliquant une différence de potentiel de 50 V entre les extrémités du *strip* ce qui « force » les protéines de l'échantillon à pénétrer dans le gel.

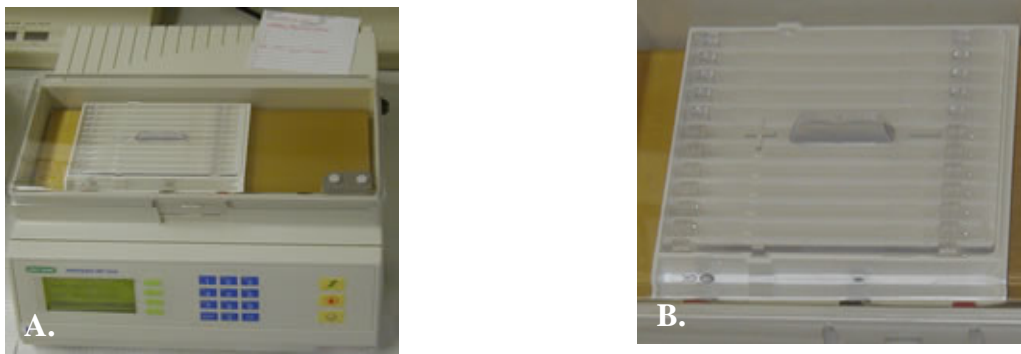


Figure II.3 : A. Cuve de migration Protean IEF Cell (Biorad) ; B. Portoir de la cuve de migration sur lequel sont déposés les gels de première dimension.

La focalisation électrique se déroule en trois étapes. Les différents paramètres de la focalisation vont varier en fonction des *strips* utilisés, c'est-à-dire selon leur gradient de pH et leur taille. Néanmoins, la stratégie classique suivie pour la migration dans la cuve d'électrophorèse est la suivante : durant la première étape, dite de conditionnement, les excès de sels sont éliminés du tampon contenant les protéines à séparer en appliquant une tension faible de 200 V pendant une heure. La deuxième étape de la focalisation électrique est une montée graduelle de la tension électrique, qui comprend un passage de 200 à 1 000 V en une heure, puis un passage de 1 000 à 10 000 V en six heures. La troisième étape, dite de focalisation finale, est variable selon la gamme de pH. Dans notre cas, il s'agit d'atteindre un total de 72 000 Vhs pour les gels dont l'intervalle de pH se situe entre 4 et 7.

Equilibration des gels de première dimension

Entre les deux étapes de l'électrophorèse, il est nécessaire de changer le tampon qui imprègne les gels de première dimension dans lesquels les protéines ont été séparées selon leur point isoélectrique. En effet, le SDS est essentiel lors de la deuxième dimension. Il permet d'ioniser les protéines et leur donne une densité de charge identique. Divers constituants sont éliminés du tampon contenant les protéines à séparer tels que l'urée, les ampholytes et les détergents.

L'équilibration se déroule en deux étapes au cours desquels les gels de première dimension sont plongés successivement dans deux tampons différents. Le premier contient du DTT qui préserve l'état réduit des protéines en réagissant avec les ponts disulfures tandis que

l'iodoacétamide présent dans le deuxième tampon alkyle les groupements thiols générés afin de prévenir leur réoxydation au cours de l'électrophorèse.

Matériel

Solution aqueuse d'équilibration I : urée (6 M), glycérol (50 %, v:v), SDS (10 %, p:v), DTT (1 %, p:v).

Solution aqueuse d'équilibration II : urée (6 M), glycérol (50 %, v:v), SDS (10 %, p:v), iodoacétamide (2,5 %, p:v).

Méthode

Les gels sont placés pendant 12 minutes, sous agitation, dans la solution de rééquilibration I puis, pendant 12 minutes, sous agitation, dans la solution de rééquilibration II. Après l'équilibration, les gels sont rincés dans le tampon d'électrophorèse de deuxième dimension puis déposés sur un papier non pelucheux. Il est prudent de ne pas excéder le temps d'incubation prévu pour chacune des étapes. En effet, il existe un risque non négligeable de diffusion des échantillons dans les solutions de rééquilibration.

Deuxième dimension de l'électrophorèse: SDS-PAGE

La deuxième étape de l'électrophorèse consiste à faire migrer les protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le SDS est un agent anionique qui se fixe sur les protéines et masque leur charge propre. Il rompt les ponts hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes et déplie partiellement les protéines. La taille des gels de polyacrylamide utilisés conditionne le niveau de résolution de la séparation des protéines. Dans ce travail, des gels de 26 x 20 cm sont utilisés.

Matériel

- Cuve de migration *Ettan Dalt Six* (Amersham Biosciences) (figure II.5)
- Tampon de migration: TRIS (25 mM), Glycine (192 mM), SDS (0,1 % ; p:v). Le pH est ajusté à 8,3 à l'aide de HCl (1 M).
- Solution d'agarose : TRIS (25 mM), glycine (192 mM), SDS (0,1 % ; p:v), agarose (0,5 % (p:v))
- Bleu de bromophénol
- Gel de résolution : acrylamide (12,5%, p:v)

Méthode

Le gel de polyacrylamide est coulé entre deux plaques de verre entre lesquelles est glissé le *strip* jusqu'à ce que sa tranche soit intimement jointe au gel (figure II.4). La solution d'agarose est coulée entre les plaques et assure le contact entre les gels tandis que le bleu de bromophénol qu'elle contient marque le front de migration.

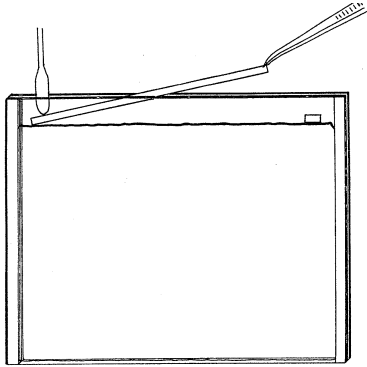


Figure II.4 : Positionnement des strips de première dimension (focalisation isoélectrique) au sommet des gels de seconde dimension (SDS-PAGE).

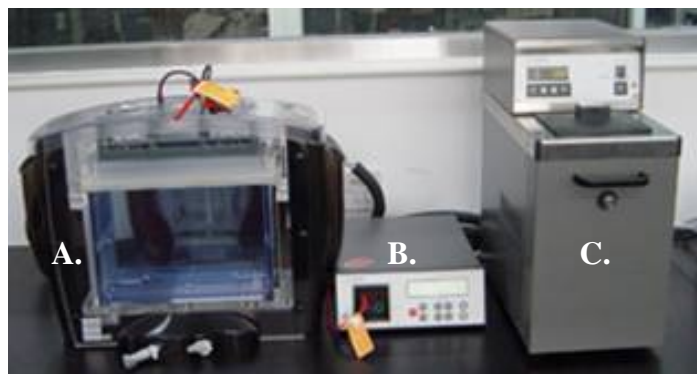


Figure II.5 : Système de migration Ettan Dalt Six (Amersham Biosciences) A : Cuve de migration ; B : Générateur ; C : Système de refroidissement.

La migration débute par un faible ampérage fixe de 10 mA/gel durant 20 minutes : ceci laisse le temps au SDS d'éluier les protéines à partir du gel de première dimension et de les faire pénétrer dans le gel de deuxième dimension. Après mise en place du système de refroidissement qui maintient durant toute l'électrophorèse une température de 15°C, la migration se poursuit à un ampérage de 20 mA/gel pendant environ 5 heures. Lorsque le front de migration atteint le bord inférieur de la plaque, le courant est coupé. Les gels peuvent alors être démoulés pour réaliser l'étape de coloration.

9. COLORATION A L'ARGENT

Les protéines sont révélées par une méthode de coloration à l'argent compatible avec l'analyse des peptides en spectrométrie de masse (Shevchenko *et al.*, 1996). La coloration des protéines au nitrate d'argent possède l'avantage d'être d'une sensibilité très élevée, permettant de mettre en évidence des protéines présentes en très faibles quantités sur les gels.

Dans un premier temps, les protéines sont fixées dans le gel par une solution contenant de l'acide acétique et du méthanol. Les protéines sont rendues insolubles et leur diffusion à l'intérieur du gel devient nulle. Ce traitement permet également l'élimination de substances résiduelles comme le SDS, le TRIS, la glycine et les ampholytes.

L'étape suivante consiste à sensibiliser les protéines, c'est-à-dire à les rendre plus réactives à la coloration. Les gels sont incubés en présence de méthanol, de thiosulfate de sodium et d'acétate de sodium. Cette dernière substance fixe le pH de la solution, ce qui permet de contrôler le pouvoir réducteur du thiosulfate qui se trouve augmenté dans des conditions de légère acidité.

Les gels sont ensuite plongés dans la solution de coloration contenant le nitrate d'argent. Les ions Ag^+ imprègnent les gels. Le formaldéhyde présent dans la solution de nitrate d'argent ne provoque pas encore la réduction des ions Ag^+ qui ne peut avoir lieu qu'en milieu alcalin. Sa présence à cette étape a pour but d'assurer sa diffusion dans toute l'épaisseur du gel. La réduction des ions Ag^+ s'opère lors de l'étape suivante, dite « de développement », lorsqu'une solution de carbonate de sodium amène le pH du milieu à 12 environ. Quand la coloration semble suffisante, l'ajout de glycine stoppe la réaction. Les gels ainsi colorés peuvent ensuite être conservés dans une solution d'acide acétique à 5 %.

Matériel

- Solution de fixation : méthanol (40 %; v:v), acide acétique (10 %; v:v)
- Solution de sensibilisation : méthanol (30 %; v:v), acétate de sodium (6,8 %; p:v), thiosulfate de sodium (0,02 %; p:v)
- Solution d'argent : nitrate d'argent (0,1 %; p:v), formaldéhyde (0,04 %; v:v)

- Solution de développement : carbonate de sodium (2 %; p:v), formaldéhyde (0,04 %; v:v)
- Solution d'arrêt : glycine (5 %; p:v)

Méthode

Après la migration en SDS-PAGE, les gels d'électrophorèse sont incubés dans la solution de fixation pendant 30 minutes au minimum. Ils sont ensuite lavés deux fois pendant 10 minutes dans une solution de lavage contenant du méthanol (50 % ; v:v) puis lavés deux fois pendant 10 minutes dans de l'eau ultrapure. Les gels sont plongés dans la solution de sensibilisation pendant 1 minute puis subissent deux lavages successifs à l'eau, pendant 1 minute chacun, avant d'être incubés pendant 20 minutes, à 4°C, dans la solution contenant le nitrate d'argent. Après cette étape, les gels sont à nouveau lavés deux fois pendant 1 minute avec de l'eau. Vient ensuite le développement de durée variable (environ 8 minutes). Lorsque la coloration souhaitée est obtenue, le gel est placé dans la solution d'arrêt. Il peut ensuite être conservé dans une solution d'acide acétique (5 %).

10. IDENTIFICATION DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Les bandes protéiques, devant être microséquencées, sont excisées du gel d'électrophorèse à l'aide d'un scalpel. Les fragments de gel sont placés dans des tubes en polypropylène siliconés et y sont décolorés à l'aide de 100 µl d'un mélange de NH_4HCO_3 (50 mM) et d'acétonitrile (50 %). La décoloration a lieu sous agitation pendant 30 à 45 minutes. Elle est répétée 3 fois. Les fragments de gel sont ensuite déshydratés plusieurs fois à l'aide de 100 µl d'acétonitrile pur puis lyophilisés. Les morceaux de gel sont réhydratés avec 100 µl d'un mélange de DTT (10 mM) et de NH_4HCO_3 (25 mM). Les tubes contenant les suspensions obtenues sont placés pendant 45 minutes dans un bain-marie réglé à 56°C.

Les protéines présentes dans les fragments de gel sont alkylées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à l'aide de 100 µl d'un mélange d'iodoacétamide (55 mM) et de NH_4HCO_3 (25 mM). Après 3 lavages successifs à l'aide de 100 µl d'une solution de NH_4HCO_3 (50 mM) et d'acétonitrile (50 %), les fragments de gel sont déshydratés à l'aide de 100 µl d'acétonitrile. L'étape de déshydratation est répétée jusqu'à l'obtention d'une coloration blanche opaque. Les fragments de gel sont ensuite lyophilisés.

Les protéines présentes dans les fragments de gel sont hydrolysées à l'aide de 3 µl d'une solution contenant du NH_4HCO_3 (25 mM) et de la trypsine (12 ng/µl). Cette opération dure 30 minutes et a lieu dans un bain-marie réglé à 37°C. Passé ce délai, 5 µl de solution de NH_4HCO_3 (25 mM) sont ajoutés à l'hydrolysate et les fragments de gel sont incubés à 37°C toute la nuit. Les fragments de gel sont placés dans un sonicateur (Julabo USR05) pendant 10 minutes. La solution dans laquelle se trouvent les fragments de gel est prélevée, conservée et remplacée par 10 µl d'une solution d'acétonitrile (50 %) et d'acide formique (1 %). Après une nouvelle sonication, les 10 µl de solution sont prélevés et conservés. Cette étape de lavage est répétée 3 à 4 fois. Les différentes solutions sont combinées et lyophilisées. L'identité des peptides en solution est déterminée par spectrométrie de masse en tandem.

11. WESTERN-BLOTTING

Le *Western-blotting* permet de détecter, à l'aide d'anticorps, les protéines transférées sur une membrane de difluorure de polyvinilidène (PVDF). Dans un premier temps, les protéines sont séparées par électrophorèse en une dimension, sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS. Elles sont ensuite transférées, par l'application d'un champ électrique, sur une membrane de PVDF. Lors de l'électro-transfert, les protéines s'adsorbent sur la membrane, selon leur position préétablie par l'électrophorèse. Les protéines se fixent à la membrane grâce à des interactions hydrophobes et ioniques. Cette membrane sert de support à l'immunomarquage des protéines.

Matériel

Système de transfert *Mini Trans-blot Cell* comprenant :

- une cuve de migration
- des papiers filtres
- des éponges (*Fiber Pads*)
- deux cassettes pour les gels et membranes de PVDF

L'électro-transfert des protéines et le *western-blotting* nécessitent la préparation des solutions suivantes :

Tampon de transfert

Le tampon de transfert est une solution contenant du TRIS (50 mM), de la glycine (0,192 M), et du méthanol (20 %).

Tampon de lavage dit tTBS

Le tampon de lavage contient du TRIS (0,125 %, p:v), du NaCl (10 %, p:v), et du Tween-20 (0,5 %, v:v). Le pH est ajusté à 7,6 à l'aide de HCl (1 M).

Tampon de blocage

Le tampon de blocage contient 5% de lait écrémé en poudre dissous dans du tampon tTBS.

Solution de développement DAB/H₂O₂

Cette solution se compose de diaminobenzidine (DAB; 0,06 %, p:v), de NiCl₂.6H₂O (0,03 %, p:v) et de H₂O₂ (0,03%, v:v) dissous dans un tampon TRIS-HCl (0,1 M; pH 7,4).

Anticorps

L'immunomarquage des protéines adsorbées sur la membrane de PVDF se déroule en deux étapes. Un premier anticorps, spécifique de la protéine à détecter, est utilisé dans un premier temps. Cet anticorps primaire est lui-même détecté par un second anticorps qui lui est spécifique. Celui-ci est couplé à une enzyme, la peroxydase, dont la diaminobenzidine est un substrat chromogène.

| Cibles | Dilution | Conjugaison |
|---|----------|-------------|
| Synthétase de l'argininosuccinate (<i>BD Biosciences</i>) | 1/2500 | - |
| Cathepsine D (<i>Biogenex</i>) | 1/500 | - |
| <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA, <i>BD Biosciences</i>) | 1/5000 | - |
| IgG1 de souris (<i>BD Biosciences</i>) | 1/2000 | peroxydase |
| IgG (H+L) de lapin (<i>Promega</i>) | 1/1000 | peroxydase |

Tableau II.1 : Caractéristiques des anticorps utilisés en western-blotting.

Méthode

Une membrane de PVDF est découpée à la taille du gel d'électrophorèse ayant permis la séparation des protéines selon leur masse moléculaire puis incubée dans du méthanol pendant 15 minutes au minimum. Ensuite, le gel, la membrane, les papiers filtres et les *Fiber Pads* sont équilibrés dans du tampon de transfert pendant 15 à 60 minutes. Le transfert est réalisé par l'application d'un courant continu constant de 100 volts pendant environ 60 minutes. Le transfert des protéines s'effectue vers la borne positive (figure II.6).

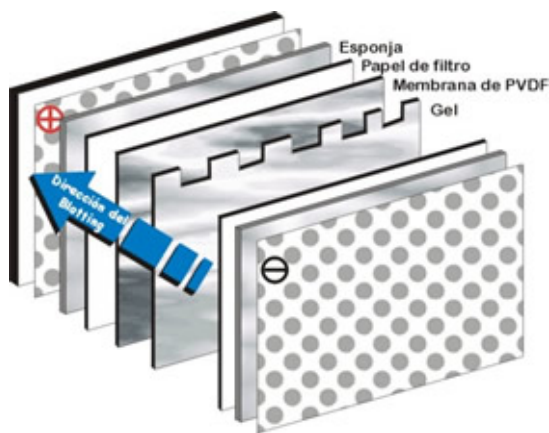


Figure II.6 : Electro-transfert des protéines. Le gel de polyacrylamide et la membrane de PVDF sont intimement accolés. De chaque côté, une éponge et un papier filtre assurent l'humidification du système. Le champ électrique appliqué provoque le déplacement des protéines vers la membrane sur laquelle celles-ci s'adsorbent.

Après le transfert, la membrane de PVDF est placée dans un récipient de taille adéquate. La membrane est rincée 3 fois pendant 5 minutes avec agitation dans 10 ml de tampon tTBS, puis est incubée dans du tampon de blocage, pendant une nuit, à 4°C.

Le tampon de blocage est éliminé et la membrane est incubée sous agitation pendant 60 minutes à 37°C dans 20 ml de tampon de blocage contenant le volume adéquat d'anticorps primaire. Après quatre rinçages de 10 minutes dans du tampon tTBS, sous agitation, la membrane est incubée pendant 60 minutes, à 37°C, dans une solution de tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire. La membrane est alors rincée avec du tampon tTBS, sous agitation, un minimum de 4 fois pendant 5 minutes.

La solution de DAB/H₂O₂ est versée sur la membrane de PVDF. La membrane est retirée lorsque la coloration souhaitée est obtenue (5 à 10 minutes). Après deux rinçages dans de l'eau ultra-pure, la membrane est séchée puis stockée à l'abri de la lumière.

12. ZYMOGRAPHIE

Les protéines contenues dans le surnageant sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (8 ou 12 %) suivant la technique décrite par Laemmli (1970) à l'exception de la dénaturation thermique des protéines. Après la séparation des protéines, le gel est placé dans une solution contenant le substrat chromogénique de l'enzyme. Le clivage de ce substrat laisse apparaître des bandes sur le gel, là où l'enzyme est présent et actif. Une analyse densitométrique des bandes est réalisée grâce au logiciel *Quantity One* (Bio-Rad).

Matériel

La solution de substrat est préparée par la mise en solution d'une tablette de FastTM BCIP/NBT contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (0,04 % ; p:v) et du *nitroblue tetrazolium* (Sigma).

Méthode

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (8 ou 12 %) suivant la technique décrite par Laemmli (1970). Après la migration des protéines, le gel est incubé à température ambiante, pendant une nuit, dans la solution contenant le tampon renfermant le substrat de l'enzyme testée.

13. EXTRACTION D'ARN

L'ARN du jéjunum et de l'iléon est extrait au moyen du kit RNeasy (Qiagen) en suivant les instructions fournies par le fabricant. L'ADN complémentaire (ADNc) simple brin est synthétisé à partir de 1 µg d'ARN isolé. Cet ARN est solubilisé dans 20 µl de tampon TRIS-HCl (10 mM, pH 9) contenant du KCl (50 mM), du Triton X-100 (0,1 % ; v:v), du MgCl₂ (5 mM), de la transcriptase inverse (15 U) du virus du myéloblastome aviaire (AMV), du dNTP (1 mM), de l'inhibiteur recombinant de ribonucléases (1 U/µl) et d'oligo(dT)₁₅ (0,025 µg/µl). La transcription inverse est réalisée à 42°C pendant 15 minutes avant d'inactiver l'enzyme thermiquement (95°C) pendant 5 minutes. L'inactivation est immédiatement suivie par une incubation à 4°C pendant 5 minutes afin d'éviter la formation de complexes enzyme-ADNc.

14. RT-PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée à partir de 3 µl de solution d'ADNc à l'aide d'un thermocycleur Ampliçon II (Thermolyne). Elle est catalysée par la polymérase de l'ADN (1 U) de *Thermus aquaticus* (Taq polymérase, Promega) mise en présence de dNTP (200 µM) et de MgCl₂ (1,5 mM) dissous dans 100 µl de tampon TRIS-HCl (10 mM, pH 9) contenant du KCl (50 mM) et du Triton X-100 (0,1 % ; v:v). Les oligonucléotides décrits dans le tableau II.2 sont utilisés comme séquences amorces. Ils ont été dessinés à l'aide du logiciel Primer3 sur la base des séquences obtenues au NCBI (Rozen & Skaletsky, 2000). Les amorces ont été choisies dans des exons adjacents. La PCR consiste en une étape de dénaturation (95°C, 5 minutes) suivie par 20 à 40 cycles d'amplification (95°C pendant 1 minute, 55-60°C pendant 1 minute, 72°C pendant 1 minute). Une élongation terminale est réalisée pendant 5 minutes à 72°C. Des échantillons sont prélevés après 20, 30 et 40 cycles et soumis à une séparation par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (1 %, p:v) sous un champ électrique de 80 V. Une analyse densitométrique des bandes d'électrophorèse est réalisée dans la zone linéaire d'amplification grâce au logiciel *Quantity One* (Bio-Rad).

| | Séquences | T _m (°C) | T° hybridation (°C) | Taille des amplimères (pdb) |
|-------------------------|---|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| IAP-1 (Rat) | 5'-TGCCAGAGATGACAGAGGTG-3' 5'-GGTGGTTGGTCTGTTCTCGT-3' | 62 62 | 58 | 599 |
| IAP-2 (Rat) | 5'-TGCATGTGCTAAGCAGGAAC-3' 5'-CTGCTGGTACGATGGGTCAT-3' | 60 62 | 55 | 369 |
| CPS-I (Rat) | 5'-ATACAACGGCACGTGATGAA-3' 5'-GCTTAACTAGCAGGCCGGATG-3' | 58 62 | 55 | 389 |
| OTC (Rat) | 5'-CCAAAGGGTTATGAGCCAGA-3' 5'-TGTCAGCAGGGATACCATGA-3' | 60 60 | 55 | 397 |
| ASS (Rat) | 5'-CCAGGAAGAAGGCACTGAAG-3' 5'-CTCAAGGACATCTGGGGTGT-3' | 62 62 | 58 | 532 |
| ASL (Rat) | 5'-CAGCTGTCCTCCAAGTAGCC-3' 5'-CAAGGCTGTGTACTGCTCCA-3' | 64 62 | 58 | 678 |
| Arginase (Rat) | 5'-ATTGCCAACCAGGAAGTGC-3' 5'-ACTGGCTGCCCATGGATATT-3' | 60 60 | 55 | 246 |
| Cathepsine (Rat) | 5'-AGGCTCTGTGGAAGACCTGA-3' 5'-CCCAAGATGCCATCAAACCTT-3' | 62 58 | 55 | 464 |
| Cathepsine (Humain) | 5'-GCGAGTACATGATCCCCTGT-3' 5'-GAGGGGAAAACCACAGAACA-3' | 62 60 | 58 | 447 |
| Beta-actine (Humain) | 5'-CACGGCATTGTAACCAACTG-3' 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3' | 60 62 | 58 | 584 |
| GAPDH (Rat) | 5'-CACTCAGAAGACTTGGATG-3' 5'-GTCATTGAGAGCAATGCCAG-3' | 60 60 | 55 | 367 |
| GAPDH (Humain) | 5'-ATGGGAAGCTGGTCATCAAC-3' 5'-GTGGTTCACACCCATCACAA-3' | 60 60 | 55 | 221 |
| CK19 (Rat) | 5'-GACCTGGAGATGCAGATAGA-3' 5'-GTCCATGAGCTGCTGATACT-3' | 60 60 | 55 | 510 |
| SWI3 (Rat) | 5'-GCCTTGGCCTATATCATGGA-3' 5'-TTGCTGTTCTCTCGTGCAAT-3' | 60 58 | 55 | 422 |

Tableau II.2 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR. T_m = température de fusion, pdb = paire de bases. IAP = phosphatase alcaline intestinale ; CPS = synthétase du carbamyl-phosphate ; OTC = transcarbamylase de l'ornithine ; ASS = synthétase de l'argininosuccinate ; ASL = lyase de l'argininosuccinate ; GAPDH = déshydrogénase du glycéraldéhyde 3-phosphate ; CK19 = cytokératine 19 ; SWI3 = switching defective, membre 3.

15. CULTURE CELLULAIRE

Les cellules de la lignée cellulaire MCF-7 utilisées dans cette étude ont été fournies par le Dr. Ch. Lambert (Université de Liège). Ces cellules sont cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant du glucose (4,15 mg/l), de l'HEPES (25 mM), du sérum de cheval (5 %) et des antibiotiques [1 % : pénicilline (1 U/ml), streptomycine (1 µg/ml), amphotéricine (2.5 ng/ml)]. Le sérum de cheval est employé à la place du sérum de bœuf afin d'éviter la production d'aldéhydes par les oxydases d'amines contenues dans le sérum de bœuf.

Les cellules sont mises en culture à raison de 4×10^4 cellules/cm² dans des flacons de plastique (Labortechnik). Elles sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ (incubateur de Heraeus EK). Le milieu de culture est changé tous les trois jours. Dès la confluence, les cellules sont cultivées pendant 3 jours en présence de tétrahydrochloride de spermine dilué dans le milieu de culture à une concentration déterminée (0 ; 0.01 ; 0.1 ou 1 mM). Les cellules et le milieu de culture sont ensuite récupérés et conservés à -70°C jusqu'au moment des analyses.

16. TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE

Afin de déterminer si les cellules survivent en présence de spermine dans le milieu de culture, leur viabilité est évaluée en présence d'un mélange de bromure d'éthyldium (10 mg/ml) et d'acridine orange (5 mg/ml) dissous dans du PBS. Ce mélange est ajouté à la culture de cellules laquelle est immédiatement observée à l'aide d'un microscope à fluorescence (éclipse TE 200, Nikon). L'acridine orange pénètre dans toutes les cellules et colore leur cytoplasme en vert tandis que le bromure d'éthyldium s'intercale dans l'ADN des cellules mortes dont le noyau apparaît en rouge (Foglieni *et al.*, 2001).

La viabilité des cellules MCF-7 est également évaluée au moyen d'un kit (*Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega) composé de tétrazolium (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium ; MTS) et de phénazine méthosulfate (PMS). Le MTS est réduit par les cellules en formazan qui est soluble dans le milieu de culture. L'absorbance du formazan à 540 nm peut être directement mesurée dans une plaque de 96 puits. La conversion du MTS en formazan soluble

est réalisée par des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produit est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Méthode

Les cellules sont cultivées en plaque de 96 puits dans un volume de 100 µl par puit. Le réactif est préparé en mélangeant 100 µl de la solution de PMS à 2 ml de la solution de MTS. Vingt µl de ce mélange sont ajoutés directement dans chaque puit de culture. La plaque est placée pendant 1 heure à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. L'absorbance du formazan est déterminée au moyen d'un spectrophotomètre (Packard SpectraCount) réglé à la longueur d'onde de 540 nm.

17. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm l'écart type ou de la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les résultats sont comparés grâce au test *t* de Student ou à une analyse de la variance (ANOVA). Lorsque l'hétéroscédasticité est suspectée (test de Levene) une comparaison grâce à un test non paramétrique [test *U* de Mann-Whitney, de Kruskal-Wallis ou de Nemenyi (Tukey-type)] est réalisée. Les comparaisons multiples par paires sont réalisées grâce au test de Student-Newman-Keuls.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

La première partie de notre travail a consisté à obtenir un échantillon de départ adéquat en vue de réaliser les investigations envisagées. L'échantillon recherché doit, en effet, être compatible avec l'analyse protéomique dont nous présenterons les résultats par la suite. Ultérieurement, chacune des protéines identifiées en spectrométrie de masse sera brièvement discutée. Certaines d'entre elles nous ont amené à effectuer des investigations plus approfondies. Elles feront, dès lors, l'objet d'un sous-chapitre particulier.

1. CARACTERISATION DES CELLULES ISOLEES

L'étude des modifications induites par l'ingestion de spermine au niveau des protéines présentes dans les entérocytes nécessite l'obtention d'une population cellulaire aussi homogène que possible afin d'accroître la reproductibilité de l'analyse différentielle et d'optimiser la pertinence des modifications mises en évidence par l'analyse protéomique.

Les entérocytes, constituant la population cellulaire visée, sont récoltés selon une méthode voisine de celle décrite précédemment par Weiser (1973). Le jéjunum et l'iléon, après lavage, sont incubés dans une solution contenant de l'EDTA. La chélation du calcium provoque un affaiblissement des jonctions qui solidarisent les cellules. L'agitation permet ensuite de les détacher du chorion. Les cellules isolées sont caractérisées sur la base de trois paramètres : l'activité de la phosphatase alcaline, l'activité de disaccharidases et la présence du *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA).

1.1 Activité de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est synthétisée de manière ubiquitaire dans l'organisme. Au sein de la muqueuse intestinale, sa présence est limitée aux entérocytes. Cette enzyme a donc été utilisée dans le but de caractériser les cellules isolées. La mise en présence de ces cellules avec un substrat chromogène de la phosphatase alcaline révèle que plus de 95% des cellules contiennent cette enzyme (figure III.1-1). De plus, la localisation majeure de la phosphatase

alcaline au niveau apical des cellules permet d'y distinguer la bordure en brosse caractérisant les entérocytes.

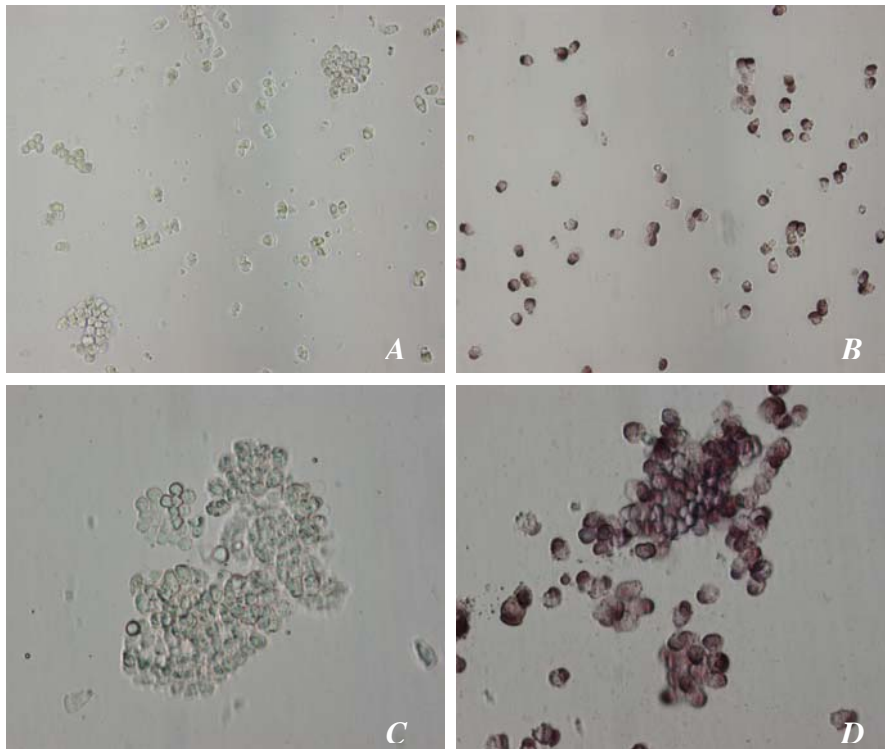


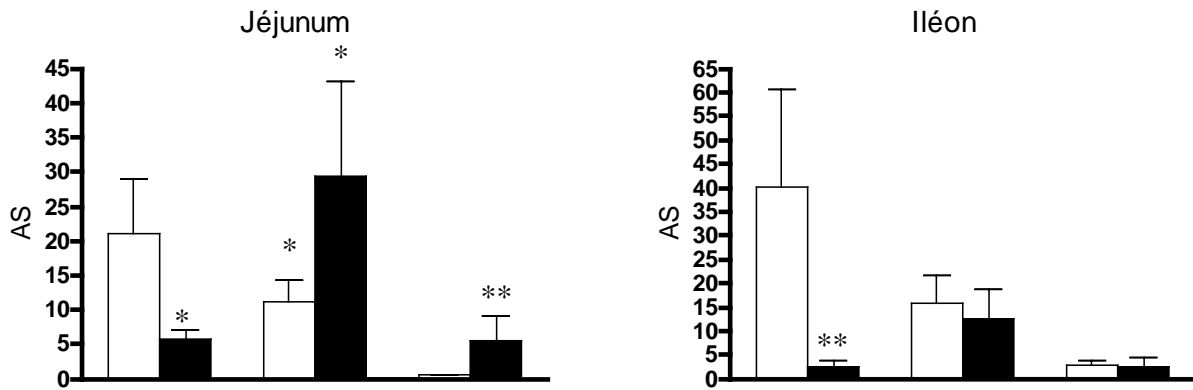
Figure III.1-1 : Observation en microscopie optique de cellules isolées de la muqueuse intestinale (A : objectif 20 x ; C : objectif 40 x). L'activité de la phosphatase alcaline est mise en évidence au moyen de Fast Red Tablets (B : objectif 20 x ; D : objectif 40 x).

1.2 Activité de disaccharidases

Les cellules isolées contiennent de la lactase, de la maltase et de la sucrase (figure III.1-2). Dans l'intestin grêle, ces enzymes sont spécifiques des entérocytes. Le traitement des animaux à la spermine modifie l'activité spécifique de ces enzymes de manière significative.

Dans le cas du jéjunum, on observe une diminution de l'activité spécifique de la lactase et une augmentation de celles de la maltase et de la sucrase (figure III.1-2). Ces modifications sont en accord avec des études précédentes (Dufour *et al.*, 1988).

Dans l'iléon, l'activité spécifique de la lactase est significativement réduite. Par contre, celles de la maltase et de la sucrase n'apparaissent pas significativement affectées (figure III.1-2).



*Figure III.1-2 : Effets de l'administration orale de spermine à des rats non sevrés (0,40 $\mu\text{mol/g}$ de poids corporel), une fois par jour pendant trois jours, aux jours 11, 12 et 13 (histogrammes noirs) sur l'activité spécifique (AS : μmol de substrat hydrolysé par minute et par g de protéines) de disaccharidases de cellules épithéliales intestinales isolées. Les rats ont été sacrifiés au jour 14. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type ($n=6$). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ par comparaison aux résultats obtenus à partir des rats témoins (histogrammes blancs).*

L'absence d'effet de l'ingestion de spermine sur les activités spécifiques de ces enzymes est en désaccord avec ce qui a été précédemment observé par Dufour *et al.* (1988) dans le cas d'homogénats intestinaux. Etant donné que nos analyses ont été réalisées à partir de cellules isolées de l'épithélium intestinal, cette différence peut être expliquée par la localisation des disaccharidases le long de l'axe crypto-villositaire. En effet, tandis que la lactase est située au sommet des villosités, la maltase et la sucrase sont présentes dans la partie inférieure de celles-ci (Traber, 1990). Il est donc probable que l'isolement des cellules que nous avons réalisé n'a été que superficiel et que la récupération de toutes les cellules contenant la maltase et la sucrase nécessite un temps d'incubation plus long dans la solution d'EDTA, comme l'a montré Weiser (1973). On peut alors s'étonner de ne pas observer ce comportement dans le cas des cellules isolées du jéjunum. Cependant, de nombreux résultats montrent que le jéjunum et l'iléon se comportent comme deux organes distincts et, de plus, on ne peut exclure que l'étendue des cellules isolées portant les différentes enzymes, considérées au cours de notre étude, soit différente le long de l'axe crypto-villositaire dans le cas de ces deux parties d'intestin..

1.3 Présence du *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

La protéine dénommée *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) est contenue, comme son nom l'indique, dans les cellules en prolifération. Dans l'épithélium intestinal, sa présence est limitée aux cellules souches des cryptes. L'immunodétection de cette protéine uniquement dans les cellules récoltées dans les derniers prélèvements de la solution contenant de l'EDTA, c'est-à-dire après 60 minutes d'incubation des organes dans cette solution (figure III.1-3), confirme que la durée d'incubation détermine le type cellulaire qui est récolté. La population cellulaire récoltée après 60 minutes correspond probablement aux cellules souches présentes au fond des cryptes.

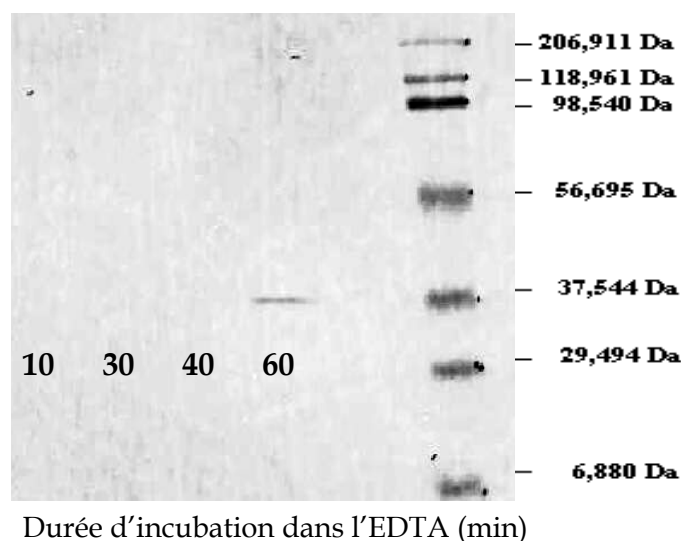


Figure III.1-3 : Mise en évidence de la protéine PCNA au sein des populations cellulaires isolées successivement de l'épithélium intestinal à la suite de différentes durées d'incubation dans la solution d'isolement.

En conclusion, la méthode d'isolement des cellules de l'épithélium intestinal, que nous avons utilisée, fournit une population homogène d'entérocytes (>95%), identifiés sur base de la présence d'enzymes spécifiques telles que des disaccharidases et la phosphatase alcaline. Elle permet de disposer d'un matériel de départ optimal pour l'analyse des modifications survenant au niveau des protéines entérocytaires au cours de la maturation induite par l'ingestion de spermine. Elle permet également de cibler des populations cellulaires de l'axe crypto-villositaire en choisissant les durées d'incubation des fragments de muqueuse intestinale dans la solution permettant le détachement des cellules épithéliales. Dans la suite de ce travail, nous avons considéré l'analyse des modifications survenant au niveau des entérocytes différenciés, situés dans la partie supérieure des villosités.

2. EFFETS A LONG TERME DU TRAITEMENT

Le présent chapitre est consacré aux analyses réalisées dans le cadre des effets « à long terme » du traitement à la spermine, c'est-à-dire lorsque la polyamine est administrée aux rats, une fois par jour pendant trois jours, et induit ainsi la maturation précoce de l'intestin. Nous aborderons plus loin les effets dits « à court terme » du traitement à la spermine, c'est-à-dire lorsque la polyamine déclenche, dans les premières heures qui suivent son ingestion, une desquamation de l'épithélium intestinal ainsi que la sécrétion de glucocorticoïdes et de cytokines.

2.1. Modification concernant la phosphatase alcaline

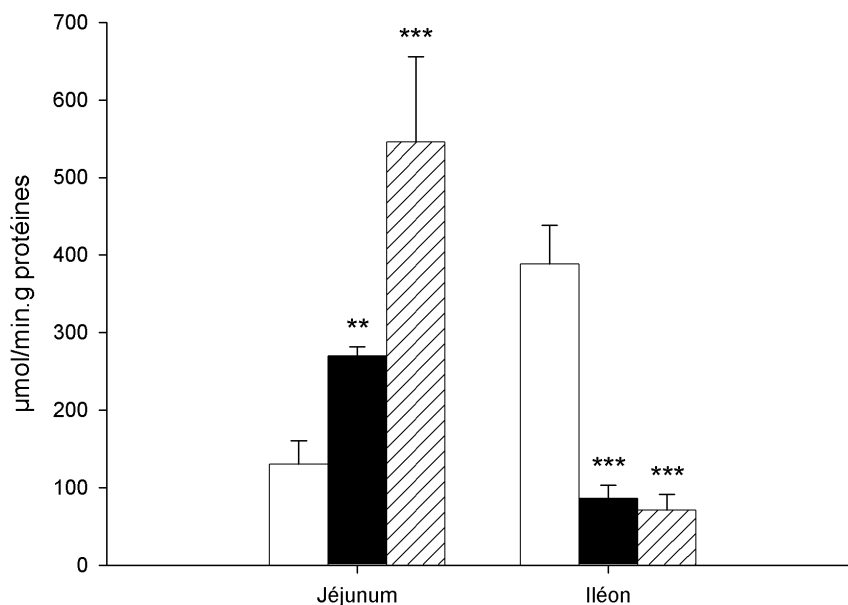
Dans l'épithélium de l'intestin adulte, la phosphatase alcaline (E.C 3.1.3.1) est localisée dans la bordure en brosse des entérocytes. Sa signification biologique n'est pas encore clairement définie. L'enzyme catalyse l'hydrolyse d'un monoester de phosphate en alcool et en phosphate inorganique (McComb *et al.*, 1979). Lors du sevrage, l'activité de la phosphatase alcaline est modifiée dans l'ensemble de l'intestin grêle (Moog, 1951). Avant le sevrage, cette activité est localisée principalement dans la bordure en brosse et dans le système tubulo-vésiculaire apical des entérocytes. Pendant le sevrage, ce système disparaît et la phosphatase alcaline n'est pratiquement plus localisée qu'au niveau de la bordure en brosse des cellules du duodénum et du jéjunum. Dans l'iléon, les entérocytes perdent l'activité de la phosphatase alcaline (Ono, 1975). Chez le rat, deux formes intestinales de la phosphatase alcaline, codées par deux gènes différents (*Intestinal Alkaline Phosphatase : IAP-1 et IAP-2*), ont été mises en évidence (Xie & Alpers, 2000).

La caractérisation des entérocytes isolés en vue de l'analyse protéomique met en évidence une première modification induite dans les cellules par l'ingestion de spermine. En effet, l'activité de la phosphatase alcaline apparaît, après le traitement, soit augmentée soit diminuée, en fonction du segment intestinal considéré. Dans ce chapitre, nous étudions quelles sont les modifications induites par l'ingestion de spermine dans les entérocytes au niveau de l'activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'au niveau de l'expression des gènes codant pour cette enzyme.

Résultats

L'activité spécifique de disaccharidases intestinales est analysée (Dahlqvist, 1964) dans les homogénats intestinaux, après l'ingestion de spermine, afin d'objectiver l'efficacité du traitement. L'ingestion de cette polyamine, une fois par jour pendant trois jours, provoque des modifications de l'activité spécifique de la lactase, de la maltase et de la sucrase. L'activité spécifique de la lactase est significativement réduite ($137,93 \pm 19,54$ vs $86,28 \pm 24,77$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ protéines ; $p < 0,05$; $N=4$), alors que celles de la maltase ($88,45 \pm 20,14$ vs $316,35 \pm 61,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ protéines ; $p < 0,01$; $N=4$) et de la sucrase ($3,20 \pm 0,74$ vs $59,91 \pm 14,11$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ protéines ; $p < 0,01$; $N=4$) sont significativement augmentées. Ces modifications des activités enzymatiques sont le reflet de la maturation intestinale postnatale.

L'ingestion de spermine induit une modification de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline qui apparaît différente entre le jéjunum et l'iléon. Dans le jéjunum, l'activité spécifique de la phosphatase alcaline augmente significativement (facteur 2) tandis qu'elle diminue significativement (facteur 5) dans l'iléon (figure III.2.1-1).



*Figure III.2.1-1 : Activité spécifique de la phosphatase alcaline jéjunale et iléale avant et après la maturation intestinale spontanée ou induite par la spermine. Histogrammes blancs = rats témoins âgés de 14 jours, histogrammes noirs = rats âgés de 14 jours traités à la spermine, histogrammes hachurés = rats témoins âgés de 31 jours. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type ; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($N=4$).*

L'analyse *in situ* de l'activité de la phosphatase alcaline indique que, chez les animaux témoins âgés de 14 jours, l'enzyme est présente dans la bordure en brosse des entérocytes principalement au niveau de la moitié inférieure des villosités du jéjunum (figure III.2.1-2.A). Par contre, dans l'iléon, l'enzyme est distribuée sur toute la longueur des villosités (figure III.2.1-2.C). L'administration de spermine pendant trois jours provoque une expansion de la localisation de l'enzyme dans le jéjunum puisque son activité est détectée sur toute la hauteur des villosités (figure III.2.1.2.B). Dans l'iléon, l'activité de la phosphatase alcaline devient faible après l'ingestion de spermine (figure III.2.1-2.D).

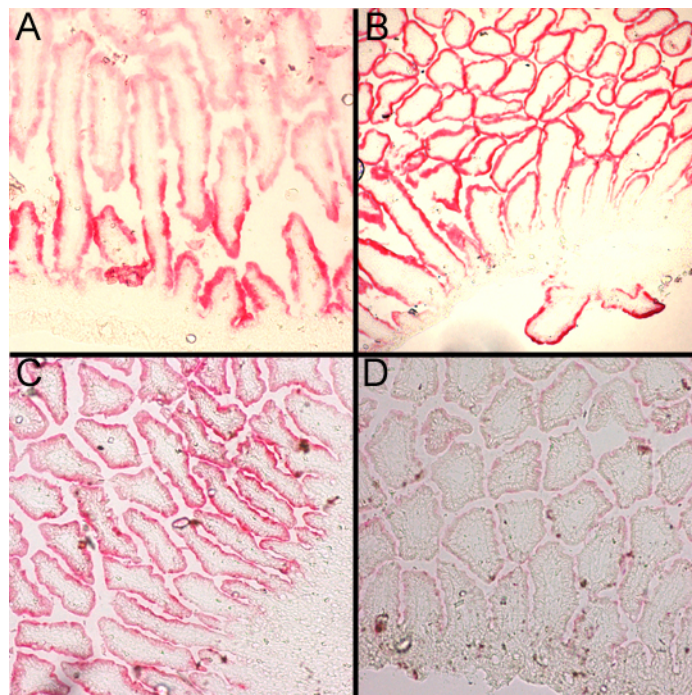


Figure III.2.1-2 : Localisation in situ de l'activité de la phosphatase alcaline jéjunale (A et B) et iléale (C et D) chez le rat non sevré âgé de 14 jours (A et C) ayant été traité (B et D) ou non à la spermine (A et C). Les flèches indiquent l'activité de la phosphatase alcaline. Grossissement 200 x.

La zymographie en conditions non réductrices sur gel de polyacrylamide (12 %) permet la détection de l'activité de la phosphatase alcaline (figure III.2.1-3). Dans le jéjunum et dans l'iléon des rats témoins âgés de 14 jours, une bande d'activité de la phosphatase alcaline est observée avec une masse moléculaire relative de 108 kDa. Après l'administration de spermine, un déplacement de cette bande vers le haut (146 kDa) est observé dans les deux organes. Les densités des bandes d'activité de la phosphatase alcaline sont augmentées dans le jéjunum et diminuées dans l'iléon suite au traitement à la spermine (tableau III.2.1-1).

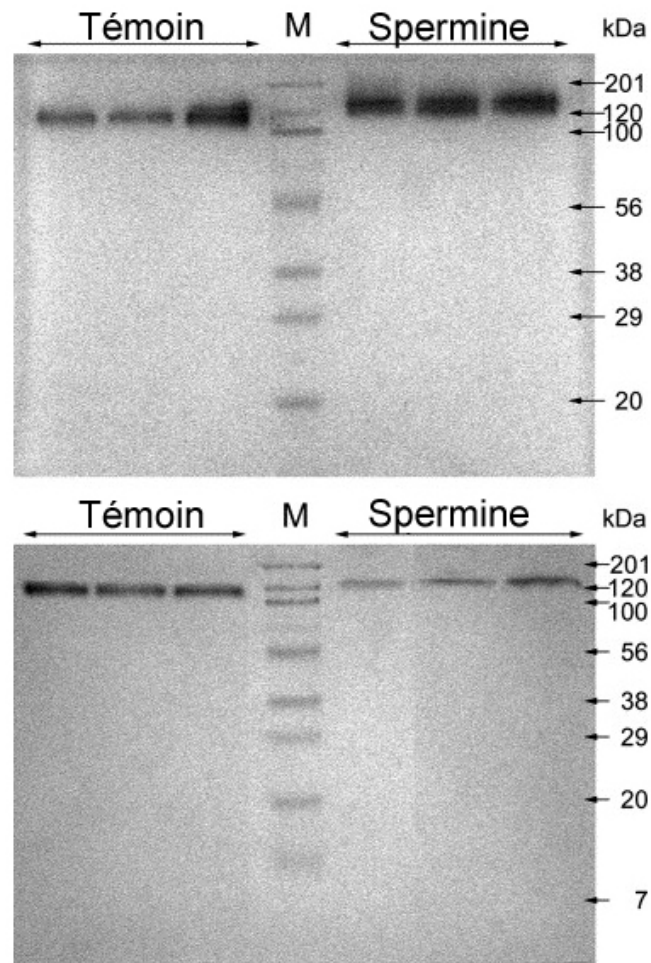


Figure III.2.1-3 : Zymographie (12%) non réductrice de l'activité phosphatase alcaline jéjunale (zymogramme supérieur) et iléale (zymogramme inférieur) chez le rat non sevré âgé de 14 jours traité (spermine) ou non (témoin) à la spermine. Les masses moléculaires relatives (kDa) du standard (M) sont présentées à droite.

| | Densité des bandes d'activité de la phosphatase alcaline (intensité × surface) | |
|----------|---|---------------|
| | Jéjunum | Iléon |
| Témoin | 13,61 ± 4,19 | 19,43 ± 4,16 |
| Spermine | 19,72 ± 1,13* | 11,33 ± 4,94* |

*Tableau III.2.1-1 : Densité des bandes d'activité de la phosphatase alcaline contenue dans le jéjunum et dans l'iléon de rats non sevrés âgés de 14 jours traités ou non à la spermine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type ; *p<0,05 (N=3).*

La zymographie réalisée sur gel de polyacrylamide (8 %) montre la présence de trois bandes (116, 138 et 166 kDa) d'activité de la phosphatase alcaline dans le jéjunum des animaux, traités ou non à la spermine (figure III.2.1-4). Dans l'iléon des rats témoins, deux bandes proches sont visibles entre les masses moléculaires relatives égales à 110 et 120 kDa. Après l'ingestion de spermine, trois faibles bandes d'activité de la phosphatase alcaline sont détectées aux mêmes masses moléculaires relatives que dans le jéjunum. La densité des bandes d'activité de la phosphatase alcaline, estimée sur les gels de polyacrylamide à 8%, n'est pas réalisable en raison de la longue incubation des gels dans la solution de substrat. Cette incubation prolongée, nécessaire pour observer les bandes les plus faibles, entraîne l'accroissement de l'intensité du bruit de fond et réduit la linéarité de la réponse intensité-activité.

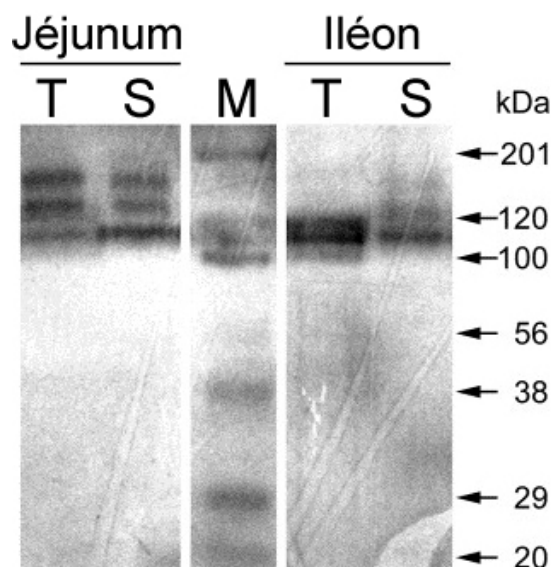


Figure III.2.1-4 : Zymographie (8%) non réductrice de l'activité de la phosphatase alcaline jéjunale et iléale chez le rat non sevré âgé de 14 jours traité (S) ou non (T) à la spermine. Les masses moléculaires relatives (kDa) du standard (M) sont présentées à droite.

L'analyse de l'expression des gènes IAP-1 et IAP-2 a été réalisée par RT-PCR (figure III.2.1-5). Le gène IAP-1 est exprimé dans le jéjunum et dans l'iléon des animaux témoins. Il en est de même dans le cas de ces organes provenant de rats ayant été traités à la spermine. Le gène IAP-2 n'est exprimé ni dans le jéjunum ni dans l'iléon quelle que soit la condition expérimentale. La densité relative des bandes correspondant aux amplimères IAP par rapport à celles correspondant aux amplimères d'un gène d'entretien, celui de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), ne révèle pas de différence significative entre les groupes d'animaux (tableau III.2.1-2). L'hybridation de ARNm marqué sur un *cDNA array*

montre la présence, dans le jéjunum et dans l'iléon, d'ARNm codant pour la phosphatase alcaline tissu-aspécifique. Le niveau d'expression de ce gène n'est pas modifié par l'ingestion de spermine (résultats non présentés).

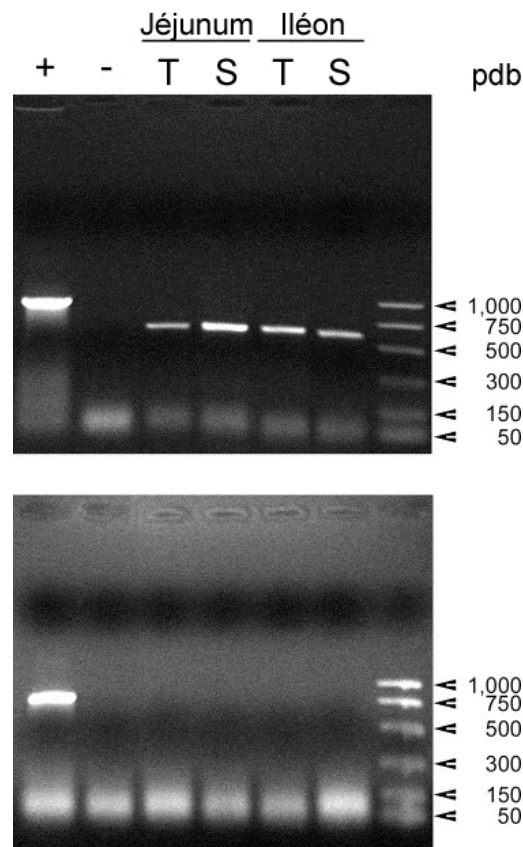


Figure III.2.1-5 : Amplification (RT-PCR) des transcrits des gènes IAP-1 (panneau supérieur) et IAP-2 (panneau inférieur) chez le rat non sevré âgé de 14 jours traité (S) ou non (T) à la spermine. Les tailles moléculaires en paires de bases (pdb) du standard sont présentées à droite.

| Rapport de la densité des bandes d'amplification des transcrits des gènes IAP-1 et GAPDH | | |
|--|-------------|-------------|
| | Jéjunum | Iléon |
| Témoin | 1,58 ± 0,10 | 1,27 ± 0,42 |
| Spermine | 2,66 ± 1,69 | 1,25 ± 0,15 |

Tableau III.2.1-2 : Rapport des densités des bandes d'amplification des transcrits des gènes IAP-1 et GAPDH présents dans le jéjunum et dans l'iléon de rats non sevrés âgés de 14 jours traités ou non à la spermine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type (N=3).

Discussion

La compréhension du rôle de la phosphatase alcaline intestinale est très limitée. Deux loci : IAP-1 et IAP-2, codent pour la phosphatase alcaline chez le rat (Xie & Alpers, 2000). La forme codée par le locus IAP-1 est associée à la membrane apicale des cellules épithéliales et est probablement la source principale de l'activité de la phosphatase alcaline luminale (Miura *et al.*, 1990). Par contre, la forme codée par le locus IAP-2 est associée à des particules enrichies en phospholipides appelées *surfactant-like particles*. Lors du sevrage, l'activité de la phosphatase alcaline est modifiée dans l'ensemble de l'intestin grêle (Moog, 1951). Avant le sevrage, l'activité de la phosphatase alcaline est principalement localisée dans la bordure en brosse et dans le système tubulo-vésiculaire apical des entérocytes. Pendant le sevrage, ce système disparaît et la phosphatase alcaline n'est presque plus détectée qu'au niveau de la bordure en brosse des cellules du duodénum et du jéjunum. Dans l'iléon, les entérocytes perdent l'activité de la phosphatase alcaline (Ono, 1975).

Dans ce chapitre, nous montrons que l'ingestion de spermine par des rats non sevrés conduit à une modification de l'activité de la phosphatase alcaline, de la localisation et de la masse moléculaire relative de l'enzyme. Ces modifications sont spécifiques de la partie intestinale considérée : jéjunum ou iléon. Les changements observés sont explicables par les sécrétions hormonales induites par l'ingestion de spermine dont, entre autres, la sécrétion de corticostérone (Kaouass *et al.*, 1992 ; Kaouass *et al.*, 1994b). Dans le duodénum, les modifications postnatales de l'activité de la phosphatase alcaline sont sous la dépendance d'hormones (Uezato *et al.*, 1983 ; Yeh *et al.*, 1994). La cortisone et la thyroxine, injectées simultanément, induisent une augmentation de la transcription du gène et de l'activité de la phosphatase alcaline duodénale. Dans le jéjunum, l'injection de cortisone et de thyroxine ne modifie pas la transcription du gène bien qu'une diminution légère mais significative de l'activité enzymatique soit observée. Il est néanmoins probable que dans le jéjunum et l'iléon, la transcription du gène soit sous le contrôle de la corticostérone (Yeh *et al.*, 1989).

L'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline observée dans le jéjunum des rats traités à la spermine est en opposition avec les résultats obtenus par Yeh et son équipe (1994) qui montrent une diminution de l'activité de l'enzyme dans le jéjunum durant la maturation spontanée. Dans notre cas, l'augmentation peut être expliquée de différentes façons : (1) l'ingestion de spermine induit la maturation du duodénum, augmentant alors l'activité de la

phosphatase alcaline dans cet organe comme lors de la maturation spontanée. Une contamination du jéjunum avec un fragment du duodénum peut, dès lors, expliquer l'augmentation de l'activité phosphatase alcaline, observée dans le jéjunum. Cependant, l'expression du gène IAP-2 est spécifique du duodénum et son expression n'a pas été détectée dans nos échantillons de jéjunum, suggérant l'absence de cette contamination ; (2) la maturation probable du duodénum induite par l'ingestion de spermine est caractérisée, comme lors du sevrage (Yeh *et al.*, 1994), par une augmentation de la libération de la phosphatase alcaline dans la lumière intestinale. Cette libération contaminerait le jéjunum en augmentant artificiellement l'activité de la phosphatase alcaline de cet organe. Cette possibilité ne peut être rejetée ; (3) l'expression d'un gène IAP, la traduction des ARNm ou l'activité de l'enzyme pourrait être augmentée dans le jéjunum par l'ingestion de spermine. L'analyse *in situ* montre une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline associée à la bordure en brosse des entérocytes du jéjunum.

La diminution de l'activité de la phosphatase alcaline dans l'iléon correspond avec les résultats obtenus *in situ* ou rapportés par d'autres auteurs (Ono, 1975).

Les masses moléculaires relatives (de 108 à 166 kDa) de la phosphatase alcaline présentées dans ce chapitre ne correspondent pas avec les observations rapportées dans d'autres études (47 à 90 kDa suivant l'isoforme) (Yedlin *et al.*, 1981 ; Sussman *et al.*, 1986 ; Yeh *et al.*, 1994). Ce désaccord provient de nos conditions d'électrophorèse qui, à la différence des autres équipes, ne sont pas réductrices. Des masses relatives (107 à 155 kDa) similaires aux nôtres ont déjà été mises en évidence pour la phosphatase alcaline en conditions non réductrices, suggérant l'existence de complexes protéiques (Yedlin *et al.*, 1981 ; Wada *et al.*, 2001). Yedlin et ses collaborateurs (1981) rapportent que la masse moléculaire relative estimée de la phosphatase alcaline est de 108 kDa pour la forme soluble et de 130 kDa pour la forme membranaire. Ceci suggère que l'ingestion de spermine induit une transition de la forme soluble vers la forme membranaire. Trois isoformes de la phosphatase alcaline sont détectées dans le jéjunum (125, 139 et 196 kDa) et dans l'iléon (107, 136 et 155 kDa) des rats adultes (Wada *et al.*, 2001). En se basant sur la séquence primaire, les protéines codées par les gènes IAP-1 et IAP-2 devraient avoir une masse moléculaire respectivement de 58,4 kDa et 59,8 kDa. Chez plusieurs mammifères, dont le rat, les différentes formes de phosphatase alcaline sont des glycoprotéines contenant différents résidus glycosidiques (Komoda & Sakagishi, 1978 ; Koyama *et al.*, 1986 ; Fujimori-Arai *et al.*, 1997). Des modifications de la

glycosylation de protéines des bordures en brosse intestinales ont déjà été montrées suite à l'ingestion de spermine par le rat non sevré (Greco *et al.*, 2000 ; Greco *et al.*, 2001 ; Biol-N'garagba *et al.*, 2002) et pourraient expliquer, au moins en partie, les variations de masses observées.

L'expression des gènes IAP-1, IAP-2 et de celui codant pour la phosphatase alcaline tissu-aspécifique a été analysée dans le jéjunum et dans l'iléon après ingestion de spermine. La phosphatase alcaline tissu-aspécifique est exprimée mais son niveau d'expression rapporté à celui du gène codant pour la GAPDH ne varie pas suite à l'administration de la polyamine. L'absence d'expression du gène IAP-2 est en accord avec la spécificité de l'expression de ce gène pour le duodénum (Calhau *et al.*, 2000). Le gène IAP-1 est exprimé dans le jéjunum et dans l'iléon, mais son expression rapportée à celle du gène codant pour la GAPDH n'est pas modifiée par le traitement à la spermine. Ce résultat suggère que les modifications d'activités enzymatiques, observées après l'ingestion de spermine et associées à une modification de la masse moléculaire de l'enzyme, résultent probablement de modulations post-transcriptionnelles.

En conclusion, ce chapitre montre que l'ingestion de spermine par des rats non sevrés modifie spécifiquement l'activité de la phosphatase alcaline codée par le gène IAP-1 et induit une transition dans les isoformes de l'enzyme suivant un processus post-transcriptionnel de même que lors de la maturation intestinale spontanée qui accompagne le sevrage.

2.2 Analyse protéomique

La maturation postnatale de l'intestin grêle, induite par ingestion de spermine, s'accompagne d'une modification des propriétés fonctionnelles des entérocytes. La comparaison du protéome de ces cellules avec celui des mêmes cellules, examiné en l'absence de ce traitement, permet d'identifier et d'associer des protéines spécifiques aux variations phénotypiques observées. La technologie de choix pour accomplir cette tâche est l'analyse différentielle de la distribution des protéines cellulaires, séparées par électrophorèse, et l'identification, par spectrométrie de masse, des protéines dont certaines propriétés varient en fonction du traitement.

Deux types de gels d'électrophorèse ont été réalisés afin de mettre en évidence les modifications survenant au niveau de propriétés des protéines présentes dans les entérocytes, suite à l'ingestion de spermine (figures III.2.2-1, III.2.2-2). Chaque type de gel possède des caractéristiques qui apportent une information particulière à l'analyse des protéines.

La première technique mise en œuvre dans ce travail est une électrophorèse de type bidimensionnelle, c'est-à-dire associant une focalisation isoélectrique des protéines suivie de la migration de ces macromolécules sur un gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE (figure III.2.2-1). Cette méthode permet une analyse fine des modifications survenant au niveau du protéome. Elle possède l'avantage de donner une image de celui-ci et de mettre en évidence des modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations ou des phosphorylations. Les différentes options existant quant à l'intervalle de pH utilisé pour la première dimension de l'électrophorèse ou concernant la concentration en acrylamide du gel employé pour la deuxième dimension de cette méthode permettent de cibler un type de protéines plutôt qu'un autre, selon les propriétés physico-chimiques de celles-ci. Cependant, cette technique présente certaines limites lorsqu'il s'agit de séparer des protéines aux points isoélectriques extrêmes et les protéines très hydrophobes, telles que celles localisées dans les membranes. En effet, ces protéines ont fortement tendance à précipiter lors de la focalisation isoélectrique et, dès lors, sont difficilement analysables par électrophorèse en deux dimensions (Adessi *et al.*, 1997; Wilkins *et al.*, 1998).

Les informations apportées par l'électrophorèse en deux dimensions sont complétées par celles que peut fournir la séparation des protéines en une seule dimension sur gel de

polyacrylamide de type SDS-PAGE. Les gels réalisés sont d'une hauteur particulièrement élevée (20 cm), ce qui permet d'optimiser la résolution entre les bandes de protéines (figure III.2.2-2). Cette méthode sépare les protéines de manière plus « grossière » que l'électrophorèse bidimensionnelle et ne permet pas de déterminer *de visu* le type de modification post-traductionnelle affectant les protéines. Elle possède, néanmoins, l'avantage de séparer la majorité des protéines contenues dans la cellule. De plus, elle permet la migration simultanée de plusieurs échantillons au sein d'un même gel, limitant ainsi les variations pouvant être dues à des biais de migration au cours de l'électrophorèse. Enfin, la relative rapidité de la technique, par rapport à l'électrophorèse en deux dimensions, ainsi que le nombre restreint de manipulations nécessitées, limite la contamination des échantillons ou des gels par des protéines environnementales qui risquent de perturber l'identification des protéines en spectrométrie de masse.

Résultats et discussion

a. Electrophorèse des protéines

La figure III.2.2-1 présente un exemple de gels obtenus suite à l'électrophorèse en deux dimensions de protéines extraites des entérocytes de jéjunum de rats traités ou non à la spermine. La comparaison de la distribution des spots de protéines sur ces gels révèle un nombre important de différences. Certains spots présentent une modification d'intensité de leur coloration suite au traitement à la spermine et nombreux sont ceux qui ne sont présents que sur l'un ou l'autre des gels, c'est-à-dire soit dans l'échantillon de protéines provenant d'animaux témoins, soit dans celui provenant d'animaux ayant ingéré la spermine. De manière systématique, un plus grand nombre de spots de protéines est détecté dans le cas des échantillons témoins que dans le cas des échantillons provenant d'animaux traités à la spermine. L'analyse et la superposition des deux protéomes au moyen du logiciel informatique d'analyse d'image *ImageMaster2D* (Amersham Biosciences) permet, dans l'exemple présenté à la figure III.2.2-1, de détecter 168 spots dans l'échantillon « contrôle » et 142 spots dans l'échantillon « traité ». Cent et cinq de ces spots sont communs aux deux échantillons.

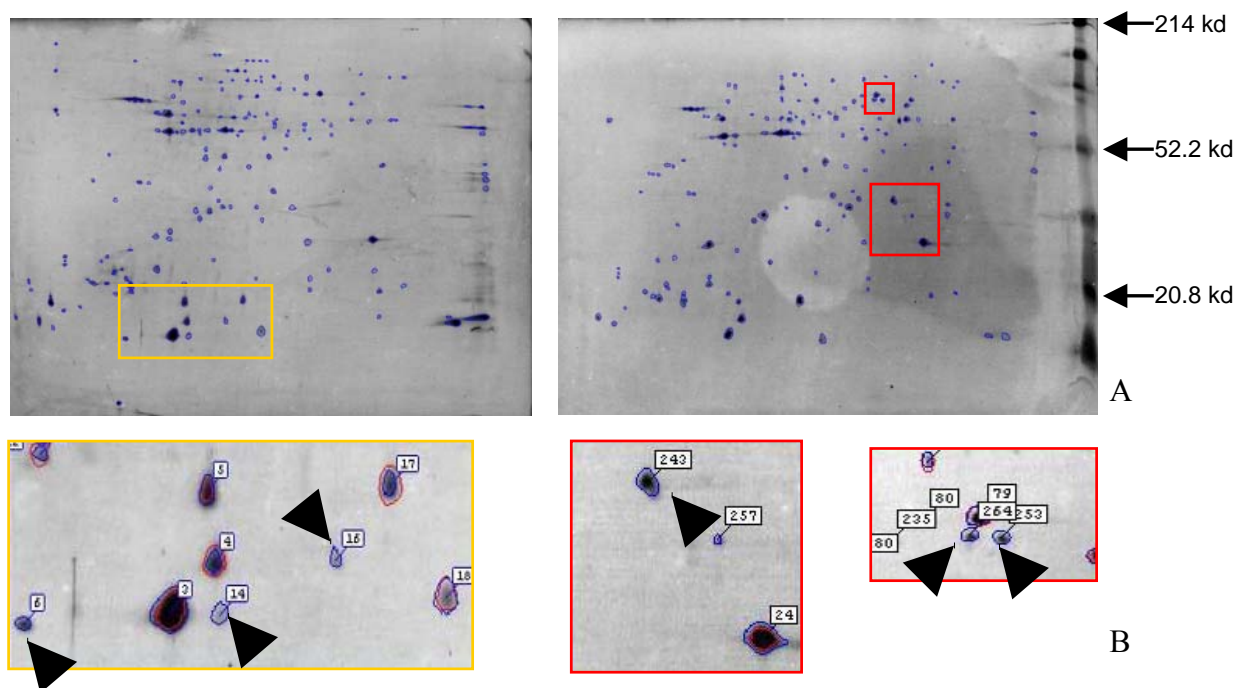


Figure III.2.2-1: (A) Gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus à partir des protéines d'entérocytes isolés du jéjunum de rats témoins (à gauche) ou traités à la spermine (à droite). Les protéines sont séparées selon un gradient de pH variant de 4 à 7 pour la première dimension, suivi d'une migration sur un gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE (12,5%). Les gels sont colorés à l'argent. (B) Agrandissement de portions des gels présentés en (A). Les flèches indiquent des spots uniquement présents sur l'un des deux gels dont les protéines ont été analysées par spectrométrie de masse.

L'analyse de la distribution des protéines diffère lorsque celles-ci sont uniquement séparées en une seule dimension, sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE. Elles se retrouvent groupées en bandes protéiques selon leur masse moléculaire. La sélection des bandes d'intérêt s'opère dans ce cas à partir d'une analyse densitométrique réalisée à l'aide du programme informatique *QuantityOne* (BioRad). Les bandes sélectionnées ne sont pas de type « on/off », c'est-à-dire présentes uniquement sur l'un des deux gels, mais présentent une différence d'intensité particulièrement élevée entre les échantillons témoins et traités. Cependant, la sélection des protéines d'intérêt, après l'identification par spectrométrie de masse, a été effectuée selon le principe du « tout ou rien » : seules les protéines présentes dans les bandes des échantillons provenant des animaux témoins et absentes des bandes correspondantes chez les animaux traités à la spermine, ou inversement, ont été prises en compte.

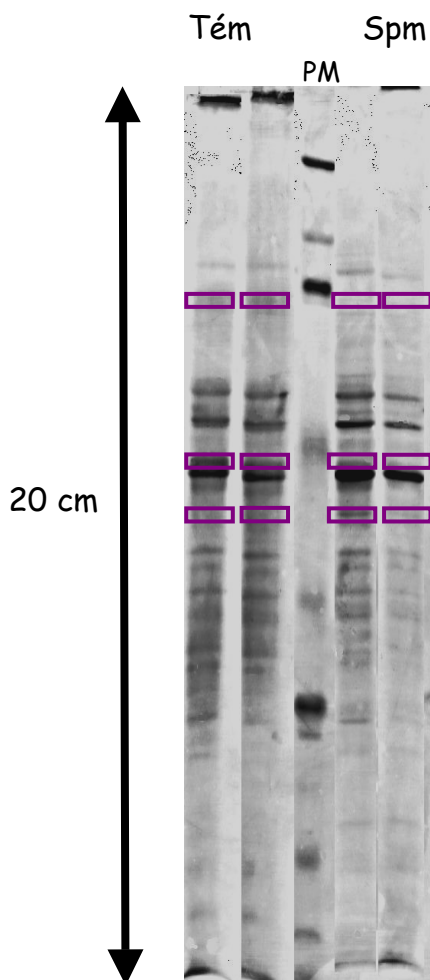


Figure III.2.2-2 : Gel d'électrophorèse 1D (SDS-PAGE 10%) obtenu à partir des protéines d'entérocytes isolés de l'iléon de rats témoins (Tém) ou traités à la spermine (Spm). Les gels sont colorés à l'argent. Les rectangles indiquent des bandes de protéines sélectionnées pour l'analyse par spectrométrie de masse. PM = standard de poids moléculaire.

b. Spectrométrie de masse et identification de protéines d'intérêt

L'identification des protéines est obtenue par la séparation en chromatographie liquide suivie de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (1D-nanoLC-MS/MS) des peptides issus d'une hydrolyse enzymatique des protéines. Un programme informatique, le logiciel *Mascot* (Matrix Sciences Inc.) permet de comparer les spectres de fragmentation obtenus, lors de l'analyse en spectrométrie de masse, avec ceux théoriquement obtenus pour une protéine donnée. Chaque identification est validée par la présence d'un témoin positif. Celui-ci consiste en l'identification d'une protéine contenue dans le standard de masse moléculaire dont la migration s'opère en même temps que les protéines contenues dans les échantillons

lorsque celles-ci sont séparées sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE. L'efficacité de l'identification est objectivée par le « *score de Mowse* » qui peut être défini comme étant l'inverse de la probabilité que l'identité attribuée à la protéine soit due au hasard. Le score de Mowse traduit donc la fidélité de l'identification. Seules les identifications caractérisées par un score de Mowse significatif ont été considérées.

Ainsi, à partir d'un spot de protéines du standard de masse moléculaire présenté dans la figure III.2.2-1, l'analyse en spectrométrie de masse identifie la bêta-galactosidase (124 000 Da), indiquant une protéine de 123 245 daltons, avec un score de Mowse de 880 (tableau III.2.2-1).

| | |
|--|---|
| Database: MSDB 20021127 (1019653 sequences; 321672149 residues) | |
| Significant hits: | CAA00972 59VAL-IGF-I FUSED WITH BETA GALACTOSIDASE PROTEIN.- synthetic construct. |
| | E90678 beta-D-galactosidase [imported] - Escherichia coli (strain O157:H7, substrain RIMD 0509952) |
| Match to: CAA00972 ; Score: 880* | |
| 59VAL-IGF-I FUSED WITH BETA GALACTOSIDASE PROTEIN.- synthetic construct. | |
| Nominal mass (M _r): 123245 ; Calculated pI value: 5.25 | |
| Matched peptides shown in Bold Red | |
| <p>1 TMITDSLAVV LQRDWNPG VTQLNRLAAH PPFASWRNSE EARTDRPSQQ 51 LRSLNGEWRF AWFPAPEAVP ESWLECDLPE ADTVVPSNW QMHGYDAPIY 101 TNVTYPITVN PPFVPTENPT GCYSLTFNVD ESWLQEGQTR IIFDGVNSAF 151 HLWCNWRWVG YGQDSRLPSE FDLSAFLRAG ENRLAVMVLR WSDGSYLEDO 201 DMWRMSGIFR DVSLHKPTT QISDFHVATR FNDDFSRAVL EAEVQMGEL 251 RDLRVTVSL WQGETQVASG TAPFGGEIID ERGGYADRVT LRLNVENPKL 301 WSAEIPNLYR AVVELHTADG TLIEAEACDV GFREVRIENG LLLNGKPLL 351 IRGVNRHEHH PLHGQVMDEQ TMVODILLMK ONNFNAVRC S HYPNHPLWYT 401 LCDRYGLYVV DEANIETHGM VPMNRLTDDP RWLPAMSERV TRMVQRDRNH 451 PSVIIWVSLGN ESGHGANHDA LYRWIKSVDP SRPVQYEGGG ADTTATDIIC 501 PMYARVDEDO PFPVAVPKWSI KKWLSLPGET RPLILCEYAH AMGNSLGGA 551 KYWQAFRQYP RLOGGFVWDW VDQSLIKYDE NGNPWSAYGG DFGDTPNDRO 601 FCMNGLVFAD RTPHPALTEA KHQQQFFQFR LSGTIEVTS EYLFRHSDNE 651 LLHWMVALDG KPLASGEVPL DVAPOGKQLI ELPELPQES AGQLWLTVRV 701 VQPNATAWSE AGHISAWQQW RLAENLSVTL PAASHAIPLH TTSEMDFCIE 751 LGNKRWFQNR QSGFLSQMWI GDKKQLLTP L RDOFTRAPLD NDIGVSEATR 801 IDPNAWVERW KAAGHYQAEA ALLQCTADTL ADAVLITTAH AWQHOGKTLF 851 ISRKTYRIDG SGQMAITVDV EVASDTPHPA RIGLNCQLAQ VAERVNWLGL 901 GPQENYPDR L TAACFDRWDL PLSDMYTPYV FPEENGLRCG TRELNYGPHQ 951 WRGDFQFNIS RYSQQLMET SHRHLLHAE GTWLNIDGFH MGIGGDSWS 1001 PSVSAEFMGP ETLCGAELVD ALQFVCGDRG FYFNKPTGYG SSSRRAPQTG 1051 IVDECCFRSC DLRRLEVYCA PLKPAKSA</p> | |

Tableau III.2.2-1: Analyse, par spectrométrie de masse, des fragments peptidiques résultant de l'hydrolyse de la bêta-galactosidase présente dans le standard de masse moléculaire appliqué sur le gel de polyacrylamide présenté à la figure III.2.2-1.

Les protéines d'intérêt, identifiées par spectrométrie de masse, sont présentées dans la prochaine section de ce chapitre (tableaux III.2.2-2 ; III.2.2-3 ; III.2.2-4 et III.2.2.5). La nomenclature utilisée est celle proposée par les bases de données Swiss-Prot/TrEMBL ou par l'« Enzyme Commission » dans le cas d'enzymes.

ENZYMES

| | Protéine | Nomenclature EC |
|---|---|------------------------|
| Mises en évidence chez l'animal témoin | Ubiquinol-cytochrome c reductase | E.C 1.10.2.2 |
| | Acyltransférase de l'acétyl-CoA | E.C 2.3.1.16 |
| | Phosphatase de phosphoprotéines | E.C 3.1.3.16 |
| | Phosphatase de la pyruvate kinase | E.C 3.1.3.49 |
| | Phosphodiesterase de l'AMPc | E.C 3.1.4.17 |
| | <i>Proprotein convertase subtilisine/kexin type 6 (PCSK6)</i> | E.C 3.4.21 |
| | Cathepsine D | E.C 3.4.23.5 |
| | Synthétase de l'HMG-CoA | E.C 4.1.3.5 |
| | N-acylglucosamine 2-epimérase | E.C 5.1.3.8 |
| | <i>E3 Ubiquitin-protein ligase Nedd4</i> | E.C 6.3.2 |
| | Synthétase du carbamoyl phosphate | E.C 6.3.4.16 |
| | Synthétase de l'argininosuccinate | E.C 6.3.4.5 |
| | Carboxylase de l'acétyl-CoA | E.C 6.4.1.2 |
| Mises en évidence chez l'animal traité | Déshydrogénase des acyl-CoA à longue chaîne | E.C 1.3.99.13 |
| | Déshydrogénase du formylTHF | E.C 1.5.1.6 |
| | Acyltransférase du dihydroxyacétone phosphate | E.C 2.3.1.42 |
| | Kinase de protéines | E.C 2.7.1.37 |
| | Kinase du diacylglycérol | E.C 2.7.1.107 |
| | Phospholipase B | E.C 3.1.1.5 |
| | Phosphoinositide-5-phosphatase | E.C 3.1.3.36 |
| | Inositol polyphosphate-5-phosphatase | E.C 3.1.3.56 |
| | Phospholipase C | E.C 3.1.4.11 |
| | Sucrase alpha-glucosidase | E.C 3.2.1.48 |
| | convertase du NRD2 | E.C 3.4.24.61 |
| | Ca ²⁺ ATPase | E.C 3.6.3.8 |
| | Adénylate cyclase | E.C 4.6.1.1 |
| | Ligase de l'ADN | E.C 6.5.1.1 |
| | Hélicase de l'ARN, famille DEAD Box | E.C 3.6.1.- |

Tableau IV.2.2-2 : Protéines identifiées par l'analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus par digestion enzymatique des protéines sélectionnées sur les gels d'électrophorèse.

L'analyse par spectrométrie de masse indique que de nombreuses enzymes apparaissent affectées par le traitement à la spermine. Plusieurs voies métaboliques, situées à différents niveaux dans la cellule, sont concernées par ces modifications.

La présence de la sucrase dans les échantillons provenant d'animaux traités à la spermine et l'absence de cette enzyme dans les échantillons provenant des animaux « contrôles », confirme, en plus de la mesure des activités spécifiques de l'enzyme dans les homogénats intestinaux, la maturation de l'intestin grêle des animaux, suite à l'ingestion de spermine. Cette observation souligne la pertinence des techniques utilisées au cours de ce travail.

La synthétase du carbamoyl-phosphate et la synthétase de l'argininosuccinate sont deux enzymes impliquées dans le cycle de l'urée, ou cycle de l'ornithine. L'activité de cette voie métabolique est effectivement modifiée dans l'intestin grêle au cours de la maturation de cet organe (Hurwitz & Kretchmer 1986 ; de Jonge *et al.*, 1998). De plus, le cycle possède un intermédiaire commun avec le métabolisme des polyamines, l'ornithine. Pour ces raisons, les modifications engendrées au niveau du cycle de l'urée, par l'ingestion de spermine, ont été approfondies et font l'objet du prochain chapitre de ce travail.

La spermine semble également avoir une action au niveau du métabolisme des acides gras. En effet, la déshydrogénase des acyl-CoA à longues chaînes (EC 1.3.99.13), une enzyme de la matrice mitochondriale qui catalyse l'oxydation, dépendant du FAD, des acyl-CoA dans le cycle de Lynen, apparaît dans le jéjunum des animaux traités à la spermine. Cette enzyme a été détectée dans le duodénum du rat adulte (Hainline *et al.*, 1993). A l'inverse, l'acyltransférase de l'acétyl-CoA (EC 2.3.1.16) et la carboxylase de l'acétyl-CoA (EC 6.4.1.2) ne sont pas mises en évidence dans les entérocytes provenant d'animaux traités. La première de ces enzymes est également impliquée dans la β -oxydation des acides gras dont elle catalyse la dernière étape tandis que la carboxylase de l'acétyl-CoA intervient dans la synthèse des acides gras.

La synthétase de l'hydroxylméthylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA, EC 4.1.3.5) n'est plus détectée suite au traitement des rats à la spermine, ni dans les entérocytes du jéjunum, ni dans ceux de l'iléon. Située dans le cytoplasme, elle intervient dans la synthèse du cholestérol en catalysant l'addition du radical acétyl provenant de l'acétyl-CoA sur la fonction cétone de l'acétoacétyl-CoA. L'analyse par RT-PCR de l'expression du gène codant pour cette enzyme

révèle une diminution significative de la quantité d'ARNm présent dans le jéjunum des animaux traités par ingestion de spermine ($p = 0,01$; résultats non présentés).

L'acyltransférase du dihydroxyacétone phosphate (DHAP-AT) intervient dans la synthèse des plasmalogènes (Liu *et al.*, 2005). Ces composés sont regroupés dans une classe de phospholipides dont la particularité réside dans le fait qu'ils possèdent une chaîne alkyl attachée au glycérol par une liaison de type vinyl-éther (Nagan & Zoeller, 2001).

L'intestin est un site important de métabolisation des lipides. Une synthèse de plasmalogènes a lieu à ce niveau (Das & Hajra, 1988).

Les plasmalogènes sont impliqués dans la libération d'acide arachidonique (Ford & Gross, 1989 ; Creer & McHowat, 1998), dans les phénomènes de fusion des membranes cellulaires (Glaser & Gross, 1994) et dans la protection de ces membranes contre les espèces réactives dérivées de l'oxygène (Engelmann *et al.*, 1994 ; Zoeller *et al.*, 1999).

La protéine PCSK6 (*Proprotein convertase subtilisine/kexin type 6*) est une endoprotéase clivant les motifs RX(K/R)R. Elle est impliquée dans les processus de sécrétion protéique en clivant des précurseurs de protéines, au niveau des liaisons Arg-Xaa-Yaa-Arg-|-Zaa où Yaa est un résidu d'arginine ou de lysine et où Xaa est n'importe quel acide aminé. L'enzyme PCSK6 est présente dans divers tissus (Kiefer *et al.*, 1991), particulièrement dans la tige pituitaire antérieure où elle joue un rôle important dans le clivage de pro-hormones (Johnson *et al.*, 1994).

Parmi les enzymes intervenant dans le métabolisme lipidique, la phospholipase B apparaît également affectée par le traitement à la spermine. Cette enzyme libère des acides gras à partir des phospholipides dont elle catalyse l'hydrolyse des liaisons esters.

Plusieurs protéines identifiées interviennent dans la signalisation cellulaire impliquant la voie de la phospholipase C (PLC) : la phosphoinositide-5-phosphatase (EC 3.1.3.36), l'inositol polyphosphate-5-phosphatase (EC 3.1.3.56) et la phospholipase C (EC 3.1.4.11). Une autre enzyme, indirectement liée à cette voie de signalisation, est la kinase du diacylglycérol (EC 2.7.1.107). Ces quatre enzymes sont détectées parmi les protéines extraites entérocytes

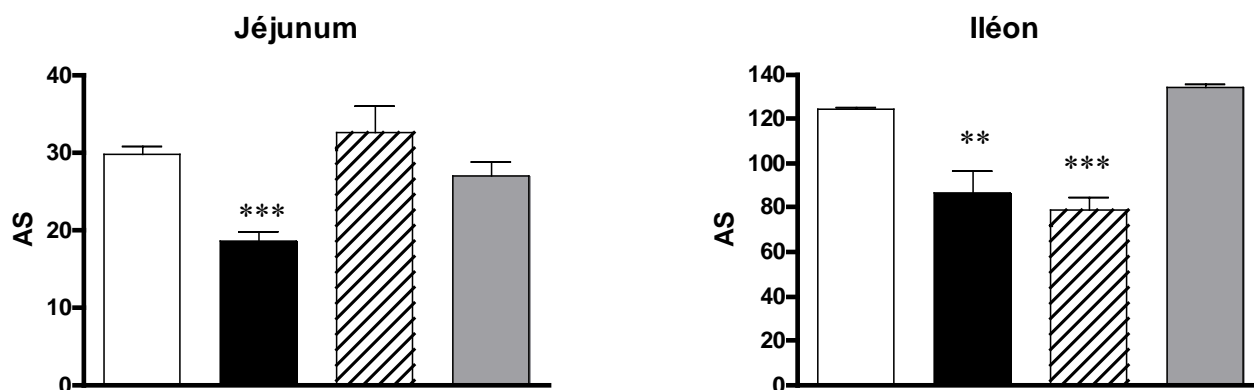
provenant d'animaux traités à la spermine, contrairement à ce qui est observé dans le cas de ces cellules provenant des animaux « contrôles ».

L'activation de la voie de la PLC produit, d'une part, de l'inositol triphosphate (IP3) qui provoque la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique et, d'autre part, du diacylglycérol qui active à son tour la séquence métabolique impliquant la phosphokinase C (PKC).

Plusieurs interactions entre la cascade métabolique faisant intervenir la PLC et les polyamines ont été mises en évidence dans la littérature. Par exemple, Echevarria-Machado et son équipe (2004) ont montré que le MGBG [*methylglyoxal bis(guanylhydrazone)*], un inhibiteur du métabolisme des polyamines, inhibe également l'activité de la PLC. De plus, dans une expérience d'immunoprécipitation, ces auteurs ont prouvé que la spermine peut se lier à l'isoforme delta de la PLC (Echevarria-Machado *et al.*, 2004). La spermine semble également capable d'activer les kinases du phosphatidyl-inositol (Coburn *et al.*, 2002 ; Echevarria-Machado *et al.*, 2005).

La voie de signalisation faisant intervenir la PLC éveille un intérêt particulier dans le contexte de notre étude. En effet, plusieurs cibles de cette voie peuvent être mises en relation avec la maturation intestinale, spontanée ou induite par l'ingestion de spermine. Nous avons bloqué la voie de signalisation induite par la PLC au moyen d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme (U73122, Alexis Biochemicals). Cette molécule a été administrée par voie intraveineuse, 15 minutes avant la prise orale de spermine ou de son véhicule (eau ultrapure), à des rats âgés de 11 jours. Cette administration n'a pas été répétée aux 12^{ème} et 13^{ème} jours. Les rats ont été sacrifiés à l'âge de 14 jours. Un groupe d'animaux témoins a été constitué par l'injection intraveineuse de NaCl (0,9%), 15 minutes avant la prise orale de spermine ou d'eau ultrapure.

Quelles qu'aient été les conditions expérimentales, les variations d'activités spécifiques de la sucrase, de la maltase et de la phosphatase alcaline, résultant de la prise orale de spermine, ne sont pas affectées par l'injection d'U73122. Comme attendu suite à la prise orale de spermine, les activités spécifiques de la maltase et de la sucrase sont effectivement augmentées et l'activité spécifique de la phosphatase alcaline est accrue dans le jéjunum mais diminuée dans l'iléon (résultats non présentés). Les observations diffèrent lorsqu'on considère les modifications survenant au niveau de l'activité spécifique de la lactase (figure III.2.2-3).



*Figure III.2.2-3 : Effet de l'injection d'un inhibiteur spécifique de la PLC (U73122) sur les modifications de l'activité spécifique de la lactase jéjunale et iléale, observées durant la maturation intestinale induite par l'ingestion de spermine au 11^{ème} jour après la naissance. Histogrammes blancs = rats témoins âgés de 14 jours : injection de NaCl (0,9%), prise orale d'eau; histogrammes noirs = rats traités âgés de 14 jours : injection de NaCl (0,9%), prise orale de spermine ; histogrammes hachurés = rats traités âgés de 14 jours : injection de U73122, prise orale de spermine ; histogrammes gris = rats témoins âgés de 14 jours : injection de U73122, prise orale d'eau. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type ; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ par comparaison aux animaux témoins ayant reçu une injection de NaCl (0,9%) et ayant ingéré le véhicule de la spermine (histogrammes blancs) ; (N=3).*

Dans ce cas, l'activité spécifique de l'enzyme n'est pas modifiée dans les homogénats jéjunaux des animaux ayant reçu l'injection de l'inhibiteur de la PLC, préalablement à la prise orale de spermine ou d'eau, alors qu'elle diminue dans les homogénats jéjunaux des animaux ayant reçu une injection de NaCl (0,9%) préalablement à la prise orale de cette polyamine. Dans l'iléon, l'activité spécifique de l'enzyme est diminuée suite à l'ingestion de la polyamine aussi bien dans les homogénats provenant d'animaux traités à la spermine ayant reçu une injection d'inhibiteur de la PLC que dans ceux provenant d'animaux traités à cette polyamine ayant reçu une injection de NaCl (0,9%).

La régulation de l'activité des dissaccharidases, de même que de l'expression des gènes codant pour ces enzymes, dépendent de facteurs différents selon l'enzyme considérée. A titre d'exemple, rappelons l'hypothèse de l'existence d'une horloge biologique interne aux entérocytes contrôlant l'apparition de l'activité de la sucrase dans ces cellules, à un âge

déterminé de l'individu, tandis que l'activité de la lactase dépend, entre autres, du contenu luminal de l'intestin (Yeh & Holt, 1986). Par ailleurs, ces enzymes sont situées à différents niveaux le long de l'axe crypto-villositaire (Traber, 1990). La lactase est principalement située au sommet des villosités alors que la maltase et la sucrase sont plutôt localisées au milieu et vers la base de cette structure. Ces enzymes sont donc exprimées dans des cellules différentes. Il est vraisemblable, en raison de cette différence de localisation et de l'existence de cette horloge biologique interne propre à la sucrase, que les modifications concernant l'activité spécifique de ces enzymes dépendent de voies de signalisation différentes. Cette différence de contrôle a déjà été démontrée. En effet, Peulen & Dandrifosse (2004) ont prouvé que la diminution de l'activité spécifique de la lactase, suite à l'ingestion de spermine, était corrélée à une augmentation de la concentration plasmatique en IL2 tandis que les augmentations des activités spécifiques de la sucrase et de la maltase dépendaient de l'IL1- β et du TNF- α . La PLC pourrait donc intervenir dans la voie de signalisation impliquée dans la régulation de l'activité de la lactase tandis que la régulation de l'activité des autres enzymes – sucrase, maltase et phosphatase alcaline- serait dépendante d'une ou de plusieurs autres cascades métaboliques.

Le lien existant entre l'IL2 et la signalisation par la PLC est souligné par des résultats obtenus suite à l'ajout d'IL2 au milieu de culture de cellules intestinales (Hirokawa *et al.*, 1997). Cette cytokine stimule la synthèse de l'ADN de ces mêmes cellules, lorsqu'elles sont soumises à des variations de pression de 40 à 120 mm Hg. Le traitement préalable de ces cellules par un inhibiteur de la PLC empêche l'IL2 d'exercer son effet stimulant sur la prolifération cellulaire.

L'ensemble des observations qui viennent d'être mentionnées permettent de proposer que l'augmentation de la concentration plasmatique en IL2, induite par l'ingestion de spermine, provoque la diminution de l'activité spécifique de la lactase dans les entérocytes du jéjunum, par l'intermédiaire d'une activation de la voie de signalisation faisant intervenir la PLC.

Cependant, l'injection de l'inhibiteur de la PLC n'empêche pas, dans l'iléon, la diminution de l'activité spécifique de la lactase induite par l'ingestion de spermine. Cette observation confirme, s'il en est besoin, la différence existant entre les entérocytes provenant du jéjunum et ceux provenant de l'iléon. La PLC pourrait ne pas être impliquée dans la régulation de l'activité de l'enzyme dans les cellules de la partie distale de l'intestin grêle.

Une autre hypothèse peut toutefois être envisagée pour expliquer ce phénomène. Elle est fondée sur le fait que la prise orale de spermine provoque dans l'iléon une importante perte de cellules. Cette desquamation n'est quasiment pas observée dans le jéjunum (Kaouass *et al.*, 1996).

La perte de cellules concerne essentiellement, en raison de leur localisation au sommet des villosités, les cellules contenant la lactase. La diminution de l'activité spécifique de la lactase est d'ailleurs utilisée comme un marqueur de la réduction de la hauteur des villosités intestinales (Peulen *et al.*, 2001a). Ce sont ces cellules quittant l'épithélium qui, en raison de leur abondance, ont été majoritairement au contact de l'inhibiteur de la PLC. Le changement de phénotype, observé trois jours après l'ingestion de spermine, concerne donc des cellules récemment arrivées des cryptes pour régénérer l'épithélium. Ces cellules n'ont donc pas, ou peu, été en contact avec l'inhibiteur de la PLC.

A l'inverse, dans le jéjunum, les cellules situées au sommet des villosités, trois jours après l'ingestion de spermine, sont les mêmes que celles présentes au bas des villosités au moment du traitement. Ces cellules ont migré le long de l'axe crypto-villositaire pendant les trois jours séparant le traitement des animaux et les différents dosages enzymatiques. Ces cellules ont donc rencontré l'inhibiteur de la PLC ce qui explique l'absence d'effets de la spermine sur l'activité de la lactase.

La N-acylglucosamine 2-épimérase (EC 5.1.3.8), qui catalyse l'interconversion de la N-acétylglucosamine en N-acétylmannosamine, disparaît des entérocytes de l'iléon après l'ingestion de spermine. Cette enzyme peut se lier à la rénine pour former un complexe protéique (rénine de haut poids moléculaire) et inhiber l'activité de la rénine.

La cathepsine D est une protéase lysosomiale impliquée dans la digestion de macromolécules contenues dans le lait, telle la caséine (Davies & Messer, 1984). Sa concentration et son activité diminuent lors de la maturation naturelle de l'intestin grêle. Pendant les deux premières semaines de vie du raton, l'activité de la cathepsine D est particulièrement élevée dans l'iléon et diminue brusquement au moment du sevrage pour atteindre les faibles valeurs de l'animal adulte. Dans le jéjunum par contre, l'activité de l'enzyme est faible de la naissance au sevrage et chez l'animal adulte (Ekström & Weström, 1991). La cathepsine D présente un intérêt particulier dans notre étude. En effet, elle apparaît essentielle au

développement étant donné que des souris *knock-out* pour cette enzyme se développent normalement jusqu'au sevrage puis dépérissent rapidement (Saftig *et al.*, 1995). Deux altérations majeures sont observées après le sevrage : une nécrose hémorragique dans l'intestin grêle et l'augmentation du nombre de cellules en apoptose dans le thymus. La confirmation d'une modification de l'activité de la cathepsine D et/ou de l'expression du gène codant pour cette enzyme, suite au traitement des animaux à la spermine, ainsi que des investigations approfondies, réalisées à partir de cultures cellulaires, font l'objet d'un chapitre présenté ultérieurement dans ce travail.

L'analyse par spectrométrie de masse identifie plusieurs enzymes qui sont des kinases ou phosphatases de protéines (EC 2.7.1.37 ; EC 3.1.3.49). L'interaction de la spermine avec ce type d'enzymes est établie depuis de nombreuses années (Amhed *et al.*, 1986). Plus récemment, Kutuzov et son équipe (2005) ont montré que la spermine régule l'activité de l'enzyme ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) par l'intermédiaire de la protéine phosphatase 5 (PP5). PP5 est une sérine/thréonine phosphatase qui s'associe avec ASK1 et l'inhibe, prévenant ainsi l'apoptose. Ces auteurs mettent en évidence une inhibition de la PP5 en présence de spermine, favorisant ainsi l'apoptose cellulaire induite par l'ASK1.

La déshydrogénase du N¹⁰-Formyl-tétrahydrofolate produit du tétrahydrofolate (THF) à partir du N¹⁰-Formyl-THF en présence de NADP⁺. Le tétrahydrofolate (THF) est un dérivé de l'acide folique (acide ptéroyl-glutamique ou vitamine B9). Sous sa forme formylée (HCHO-THF), le THF est nécessaire à la synthèse des purines, et, par là, à la synthèse des acides nucléiques.

Les polyamines régulent la signalisation intracellulaire effectuée par le Ca²⁺ et modulent les réponses cellulaires aux hormones, aux neurotransmetteurs et aux *stimuli* extracellulaires dont les effets dépendent du Ca²⁺ (Koenig *et al.*, 1989). L'identification d'ATPases sensibles au Ca²⁺ ainsi que d'une cyclase de l'acide adénylique dépendante du Ca²⁺ parmi les protéines modifiées suite à l'ingestion de spermine n'est donc pas surprenante.

Des modifications de l'activité enzymatique de la cyclase de l'acide adénylique par la spermine ont été déjà mises en évidence (Wright *et al.*, 1978). L'addition de spermine dans une préparation de membranes de fibroblastes empêche la stimulation de l'activité de la

cyclase de l'acide adénylique stimulée par du fluorure de sodium. L'activité basale de l'enzyme est également diminuée.

L'enzyme Nedd4 catalyse la troisième étape de l'ubiquitination des protéines. Elle est, notamment, impliquée dans le *turn-over* des « protéines-canaux » membranaires (Debonneville *et al.*, 2001 ; Snyder *et al.*, 2002 ; Verrey *et al.*, 2003). Parmi les « canaux » membranaires régulés par l'enzyme Nedd4, on trouve la protéine ENaC (*Epithelium Natrium Canal*) de l'épithélium intestinal. Dans le côlon, elle est régulée par les corticostéroïdes (Abriel *et al.*, 1999 ; Dinudom *et al.*, 1998 ; Goulet *et al.*, 1998). La stimulation du « canal EnaC » est suivie d'une phosphorylation de la protéine Nedd4 par la kinase SGK1 (*serum and glucocorticoid inducible kinase 1*) dont l'expression génique est activée par les minéralocorticoïdes, les gonadotrophines et certaines cytokines dont le TGF- β (Lang & Cohen, 2001). L'activité de cette kinase est augmentée en présence d'insuline et d'IGF-1 (*Insuline growth factor 1*). Dans l'intestin, SGK1 est présente au niveau apical des villosités entérocytaires (Waldegger *et al.*, 1999). Elle est impliquée dans le transport de phosphate à travers l'épithélium. Elle stimule ce mécanisme de perméabilité en inactivant la protéine Nedd4 par phosphorylation (Palmada *et al.*, 2004).

La convertase de NRD2 ou nardilysine est une métallo-endorpeptidase qui catalyse l'hydrolyse d'une liaison peptidique au niveau de l'arginine. Cette enzyme appartient à la famille des protéinases M16. Celles-ci sont impliquées dans la dégradation, par exemple, de l'insuline (Affholter *et al.*, 1988 ; Baumeister *et al.*, 1993) ou de diverses protéines présentes dans la matrice mitochondriale (Hawlitschek *et al.*, 1988 ; Braun & Schmitz, 1997).

Parmi les enzymes mitochondriales citées dans le tableau IV.2.2-2, on trouve l'ubiquinol-cytochrome c réductase. Cette protéine est le complexe III de la chaîne respiratoire. Elle intervient dans le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. L'existence d'un système de transport pour les polyamines dans la mitochondrie a été démontrée (Toninello *et al.*, 1988 ; Toninello *et al.*, 1992). Dans cet organite, les polyamines régulent la perméabilité au Ca^{2+} (Rustenbeck *et al.*, 1998), la synthèse d'ATP (Igarashi *et al.*, 1989), les échanges ADP/ATP (Kramer *et al.*, 1986) et la libération du cytochrome c (Stefanelli *et al.*, 2000).

Deux enzymes agissant au niveau des acides nucléiques, une hélicase de l'ARN et une ligase de l'ADN, ont également été identifiées. Nous constaterons dans la suite de cet exposé de nos

résultats que la spermine possède une action sur de nombreux facteurs de transcription ou de réplication des acides nucléiques.

INTERACTIONS AVEC LES ACIDES NUCLEIQUES

| | Protéine | SwissProt/TrEMBL |
|--|--|-------------------------|
| Mise en évidence chez l'animal témoin | Protéine à doigts de zinc <i>Roaz</i> | O08961 |
| | Protéine à doigts de zinc <i>MyT3</i> | P70588 |
| | <i>Glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1</i> (GRLF1) | P81128 |
| | Phosphoprotéine nucléaire p130 (NOLC1, Nopp140) | P41777 |
| | <i>Signal transducer et activator of transcription 5B</i> (STAT5B) | P52632 |
| | <i>Prolactin regulatory element-binding protein</i> (PREB) | Q9WTV0 |
| | <i>Angiotensine gene inducible enhancer binding protein1</i> (AGIE-BP) | Q00900 |
| Mise en évidence chez l'animal traité | Protéine à doigts de zinc <i>Hit10</i> | Q99PJ8 |
| | Protéine à doigts de zinc <i>Riz</i> | Q63755 |
| | <i>Nuclear receptor coactivator 2</i> (NCOA2) | Q9WUI9 |
| | <i>Nuclear pore complex protein Nup 153</i> (NUP153) | P49791 |

Tableau IV.2.2-3 : Protéines identifiées par l'analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus par digestion enzymatique des protéines sélectionnées sur les gels d'électrophorèse.

Parmi les protéines interagissant directement avec l'ADN, l'analyse par spectrométrie de masse identifie un certain nombre de protéines dites « à doigts de zinc ». Ce type de protéines comporte des éléments répétitifs ayant la forme de doigts de gant. Le motif « à doigts de zinc » comprend le domaine de liaison à l'ADN. Il a initialement été caractérisé dans le facteur TFIIA, qui est nécessaire à la transcription des gènes ARNr 5S par l'ARN polymérase III. Les protéines « à doigts de zinc » tirent leur nom de leur structure, dans laquelle un groupe d'acides aminés conservés lie un ion de zinc. D'une manière générale, ces protéines interviennent au cours du développement embryonnaire ainsi que dans la régulation des processus de prolifération et de différenciation cellulaires.

L'ARNm codant pour la protéine Roaz (*Rat O/E-1-associated zinc finger protein*) est présent dans le cerveau, les yeux, la rate, le cœur et au niveau du 1/3 inférieur de l'épithélium olfactif chez la souris adulte. Il a également été mis en évidence dans les cellules basales de cet épithélium, dans les précurseurs neuronaux, dans les neurones immatures mais pas dans les cellules matures. Ce *pattern* d'expression indique que la protéine peut jouer un rôle dans le contrôle du passage entre la prolifération et la différenciation cellulaires (Tsai & Reed 1997 ; Tsai & Reed., 1998).

La protéine Riz (*retinoblastoma protein-interacting zinc finger*) appartient à la superfamille des méthyltransférases. Le gène RIZ est à l'origine de deux protéines, Riz1 et Riz2. L'expression du gène codant pour la protéine Riz1 est fortement diminuée dans le cas de diverses tumeurs telles que le cancer du sein ou du côlon tandis que l'expression du gène codant pour la protéine Riz2 n'est pas modifiée (He *et al.*, 1998).

Gazzerro et son équipe (2006) ont montré une inhibition du nombre de transcrits codant pour Riz1 dans des cellules MCF-7 traitées à l'œstradiol. Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine, réalisée par les mêmes auteurs, révèle que Riz1 inhibe directement l'expression de C-MYC. L'inhibition des transcrits de la protéine Riz1 par l'utilisation de siRNA provoque une augmentation de la prolifération cellulaire liée à une activation de c-myc, comparable à ce qui est observé lors du traitement des cellules à l'œstradiol.

Hit10 et MyT3 sont des protéines nucléaires à doigts de zinc. MyT3 (*Myelin transcription factor 3*) appartient à une famille de facteurs neuronaux à doigts de zinc (NZF) impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant, d'une part, pour le récepteur de l'acide β -rétinoïque et, d'autre part, pour les protéines présentes dans la myéline. A l'inverse de MyT1 et MyT2, qui sont activateurs de la transcription, MyT3 est un suppresseur de l'expression génique (Yee & Yu, 1998).

D'autres protéines régulant la transcription sont des coactivateurs de récepteurs nucléaires, telle la protéine NCOA2 (*nuclear receptor coactivator 2*) ou GRIP1 (*glucocorticoid receptor interacting protein*) que nous avons uniquement identifiée dans les entérocytes provenant d'animaux traités à la spermine.

Ces protéines se lient, selon leur spécificité, aux récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes ou thyroïdiennes et de la vitamine A ou D. La liaison du ligand au récepteur produit un changement de conformation du complexe, lequel interagit alors avec une protéine régulatrice. Celle-ci peut agir en tant que corépresseur ou coactivateur de la transcription selon le récepteur considéré.

La protéine GRIP1 est le deuxième membre de la famille des coactivateurs « Srcs » (*steroid receptor coactivators*). Elle interagit avec les récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes (Hong *et al.*, 1996 ; Torchia *et al.*, 1997). La présence de GRIP 1 a été détectée dans les cellules épithéliales de nombreux organes dont, notamment, celles du tractus gastro-intestinal (Puustinen *et al.*, 2001).

Des expériences de *knock-out* du gène codant pour la protéine GRIP1 ont été réalisées (Gehin *et al.*, 2002 ; Picard *et al.*, 2002). Elles révèlent que les souris SRC-2^{-/-} connaissent une croissance somatique normale. Néanmoins, ces souris présentent des troubles de la fertilité, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Une accumulation de lipides est observée dans les cellules de Sertoli, ainsi qu'une apoptose des cellules germinales. Chez la femelle, le placenta est hypoplasie. On observe également une stimulation de la lipolyse dans le tissu adipeux (Picard *et al.*, 2002).

Maeda et ses collaborateurs (2002) ont montré que l'interaction entre des récepteurs nucléaires et les complexes coactivateurs de la transcription est modifiée en présence de spermine. Ces auteurs ont mis en évidence une stimulation de l'interaction entre le récepteur de la vitamine D (VDR) et son coactivateur, la *VDR-interacting protein 205* (DRIP205). L'interaction de DRIP205 avec le HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*) est également stimulée. Le HNF4 α est un facteur-clé de la régulation de la différenciation hépatique qui, à l'inverse des récepteurs nucléaires, ne nécessite pas la liaison d'un ligand pour être actif et constitue donc un activateur constitutif de la transcription. En présence de DFMO, la transcription médiée par ce facteur est réprimée.

La protéine GRIP1 peut également se fixer au récepteur nucléaire de la vitamine D de même qu'au facteur HNF4 α . Cette interaction est inhibée en présence de spermine.

Ainsi, la spermine semble favoriser la liaison de coactivateurs spécifiques aux complexes ligand-récepteur, au détriment d'autres facteurs telle la protéine GRIP1.

La protéine GRLF1 (*Glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1*) s'associe à la région promotrice du gène codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes et agit en tant que répresseur de la transcription. Elle est produite en réponse à une stimulation par les glucocorticoïdes.

La phosphoprotéine p130, ou Nopp140, n'est plus identifiée dans les entérocytes suite au traitement des rats à la spermine. Elle joue un rôle dans l'entretien de la structure fondamentale du nucléole. Elle possède des activités intrinsèques de GTPase et d'ATPase. A l'origine, Nopp140 a été définie comme étant une protéine faisant la navette entre le nucléole et le cytoplasme (Meier & Blobel, 1992). Par la suite, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que Nopp140 interagit avec des protéines ribonucléaires ainsi qu'avec la grande sous-unité de l'ARN polymérase I (Chen *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que Nopp140 est impliquée dans la nucléogénèse et dans la transcription des gènes de l'ARN ribosomal. Une surexpression du gène codant pour Nopp140 dans les cellules COS induit la formation d'une structure « *endoplasmic reticulum-like* ». Cette structure forme des citernes dont les membranes sont distinctes de l'enveloppe nucléaire (Isaac *et al.*, 2001). Des marquages par immunofluorescence suggèrent que Nopp140 redirige vers cette structure certaines protéines auxquelles elle est associée, telle la fibrillarine (Yang *et al.*, 2000).

Nopp140 peut interagir, *in vitro*, avec la kinase II de la caséine et être phosphorylée par celle-ci (Li *et al.*, 1997). Par ailleurs, lorsque des rats sont traités avec de l'isoprénaline dans le but de stimuler l'activité de la kinase de protéines A (PKA), Nopp140 subit une phosphorylation importante, suggérant qu'elle peut être impliquée dans la cascade de signalisation dépendant de l'AMPc (Hoffmann & Schwach, 1989).

Partant de cette hypothèse, Chiu et ses collaborateurs (2002) ont montré que Nopp140 régule l'expression du gène codant pour la glycoprotéine acide α_1 (AGP) selon un mécanisme dépendant effectivement de la PKA. AGP appartient à la famille des protéines de la phase aiguë (Baumann & Gauldie, 1994 ; Fournier *et al.*, 2000). L'expression du gène codant pour cette enzyme est augmentée entre autres, lors de traitement par l'IL6, l'IL1, les

glucocorticoïdes ou le lipopolysaccharide (Chang *et al.*, 1990 ; Akira & Kishimoto, 1992 ; Alam *et al.*, 1993).

La protéine STAT5B (*Signal transducer et activator of transcription 5B*) appartient à la famille des facteurs de transcription STAT. Ces facteurs sont présents, sous forme inactive, dans le cytoplasme des cellules. La dimérisation de récepteurs membranaires activés par diverses cytokines ou hormones stimule l'activité de la kinase JAK (*Janus kinase*). Celle-ci, phosphorylée, phosphoryle les facteurs de transcription STATs5. Les facteurs STATs5 sont présents sous deux formes, A ou B, codées par deux gènes différents (Azam *et al.*, 1995 ; Mui *et al.*, 1995). Lorsqu'ils sont activés, ils peuvent former des homo- ou des hétérodimères dans le cytoplasme. Ils sont alors transférés dans le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles en se liant à des séquences spécifiques d'ADN (Ihle, 1996; Bromberg & Darnell, 2000 ; Rane & Reddy, 2000).

Les protéines STAT5 modulent la signalisation induite par les cytokines impliquées dans l'hématopoïèse (Ihle *et al.*, 1995). Elles régulent notamment la différenciation des cellules de la lignée myéloïde (Buitenhuis *et al.*, 2000 ; Bunting *et al.*, 2002).

D'une manière plus générale, les facteurs STATs5 régulent la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, tels les gènes codant pour les cyclines D1 et D2, ainsi que ceux codant pour des protéines anti-apoptotiques tels Bcl-x1 et Bcl-2 (Rane & Reddy, 2000). Par ailleurs, alors que STAT5A et STAT5B sont tous les deux capables d'activer la transcription du gène codant pour le récepteur α aux œstrogènes, seul STAT5B interagit avec le gène codant pour le récepteur β aux oestrogènes (Park *et al.*, 2001).

Plusieurs hormones, telles la prolactine, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes stimulent la transcription de gènes par l'intermédiaire des protéines STATs5 (Gouilleux *et al.*, 1994 ; Dorshkind & Horseman, 2000).

Une lésion au niveau de l'intestin grêle entraîne la libération d'IL6 par les entérocytes et les macrophages de la muqueuse intestinale (Ogle *et al.*, 1996). Cette interleukine déclenche une activation de STAT5 qui stimule, à son tour, la transcription de prolactine et d'hormone de croissance. Le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes se lie aux protéines STATs5 et agit en tant qu'activateur de la signalisation médiée par ces protéines (Dorshkind & Horseman,

2000). A l'inverse, STAT5 possède une action inhibitrice sur le récepteur aux glucocorticoïdes, réduisant la capacité de celui-ci à activer la transcription de gènes par sa liaison à l'ADN (Stocklin *et al.*, 1996).

AGIE-BP (*angiotensine gene inducible enhancer binding protein1*) est également une protéine nucléaire « à doigts de zinc ». Elle est capable de lier des motifs *NFκB-like* au niveau de l'ADN (Ron *et al.*, 1991). Elle joue un rôle dans le développement des systèmes nerveux et neuroendocrine et stimule le promoteur du gène codant pour le récepteur II à la somatostatine dans le cerveau murin (Dorflinger *et al.*, 1999).

La protéine PREB (*prolactin regulatory element-binding protein*) agit au niveau du promoteur du gène codant pour la prolactine, au niveau duquel elle transmet la stimulation transcriptionnelle induite par la voie de signalisation faisant intervenir la protéine kinase A. Les transcrits de PREB ne sont pas uniquement présents dans la glande pituitaire mais ont été mis en évidence dans de nombreux autres organes, tels le foie, le pancréas, le cerveau ou encore le rein, au niveau desquels ils connaissent un épissage spécifique (Fliss *et al.*, 1999).

La protéine Nup153 intervient dans la formation de « pores » au niveau de la membrane nucléaire. Ceux-ci permettent le passage sélectif d'ARN et de protéines entre le nucléole et le cytoplasme. Ces « pores » sont formés d'une structure macromoléculaire, le *nuclear pore complex* (NCP). La protéine Nup153 intervient dans l'exportation de différentes classes d'ARN du noyau vers le cytoplasme (Bastos *et al.*, 1996 ; Ullman *et al.*, 1999). Elle inhibe également le transfert d'ARN dans le sens inverse (Shah & Forbes, 1998).

INTERACTIONS AVEC LE CYTOSQUELETTE

| | Protéine | SwissProt/TrEMBL |
|---|--|-------------------------|
| Mises en évidence chez l'animal témoin | Spectrine, chaîne alpha (SPTA2) | P16086 |
| | <i>Cytoplasmic linker associated protein2.</i> (CLAP2) | Q99JD4 |
| | <i>Postsynaptic density protein 95/synaptic associated protein 90</i> (PSD-95/SAP90) | O54777 |
| | <i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1 and 3</i> (SHANK1 et 3) | Q9JLU4 |
| Mises en évidence chez l'animal traité | Composant 7 du complexe exocytique (EXOC7, rEXO70) | O54922 |
| | <i>PAM interacting protein</i> (Kalirine) | P97924 |
| | <i>Membrane-associated guanylate kinase-interacting protein</i> , MAGUIN (CNKR2) | Q9Z1T4 |

Tableau IV.2.2-4 : Protéines identifiées par l'analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus par digestion enzymatique des protéines sélectionnées sur les gels d'électrophorèse.

La spectrine a été découverte au niveau de la membrane plasmique des érythrocytes. Elle est actuellement considérée comme un composant majeur du cytosquelette membranaire, formant un complexe avec l'actine sous la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique (Gascard & Mohandas, 2000 ; Bennet & Baines, 2001).

Dans les cellules non érythroïdes, la spectrine est localisée au niveau de l'appareil de Golgi, de vésicules cytoplasmiques (De Matteis & Morrow, 1998) et du noyau (Mc Mahon *et al.*, 1999).

Plusieurs fonctions physiologiques sont attribuées à la spectrine dont, notamment, la formation et la maintenance de domaines spécialisés dans la membrane plasmique des cellules épithéliales (Dubreuil *et al.*, 2000), des neurones (Berghs *et al.*, 2000) et des muscles striés squelettiques (Bloch & Morrow, 1989 ; Hammarlund *et al.*, 2000 ; Moorthy *et al.*, 2000). Certaines études ont mis en évidence le rôle joué par la spectrine dans l'endocytose (Kamal *et*

al., 1998), le trafic vésiculaire (Beck *et al.*, 1997) et la croissance des neurites (Sihag *et al.*, 1996 ; Hammarlund *et al.*, 2000 ; Takeda *et al.*, 2000).

La distribution dynamique de la spectrine au niveau des membranes est contrôlée par l'activité de caspases et par phosphorylation (Fowler & Adam, 1992). La spectrine contient plusieurs sites d'interactions, dont des domaines SH3 (*Src homology domain 3*) et PH (*pleckstrin homology domain*) ainsi que des domaines de liaison à l'ankyrine et à la calmoduline.

Les protéines CLAPs (*CLIP associated proteins*) s'associent aux protéines CLIPs (*cytoplasmic linker proteins*) dans le cytoplasme. Elles interviennent dans la distribution dynamique des microtubules.

Les microtubules sont des structures polarisées possédant une extrémité à croissance rapide, l'extrémité (+), dirigée vers la périphérie cellulaire. L'autre extrémité, l'extrémité (-), connaît une croissance lente et s'attache au centre organisateur des microtubules. Les protéines CLIPs sont localisées à l'extrémité (+) des microtubules dont elles suivent les mouvements de croissance (Perez *et al.*, 1999). Dans les fibroblastes, CLIP-170 est colocalisée avec la dynéine et la dynactine dans le cytoplasme, à l'extrémité distale des microtubules (Valetti *et al.*, 1999 ; Vaughan *et al.*, 1999).

Deux protéines CLAPs, CLAP1 et CLAP2 ont été identifiées dans les cellules de mammifères (Akhmanova *et al.*, 2001). Les protéines CLAPs peuvent s'associer à la fois aux protéines CLIPs et aux microtubules sur lesquels elles possèdent une action stabilisatrice. La distribution asymétrique des CLAPs sur les microtubules est régulée, entre autres, par l'activité de la kinase de l'IP3. Les CLAPs sont ainsi impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules.

rEXO70 est un composant de l'exocyste. L'exocyste est un complexe hautement régulé de protéines. Il intervient dans le trafic des membranaires intracellulaires, l'organisation membranaire et la sécrétion extracellulaire (Terbush *et al.*, 1996 ; Guo *et al.*, 1999 ; Lipschutz *et al.*, 2000). Ce complexe est localisé spécifiquement au site de fusion des vésicules membranaires (Terbush & Novick, 1995 ; Finger & Novick, 1997).

La reconnaissance et la fusion des membranes sont régulées suivant le type cellulaire considéré et l'état physiologique de la cellule. Par exemple, l'exocytose au niveau des terminaisons nerveuses est dépendante du Ca^{2+} (Katz, 1969). Dans le cas de cellules hautement polarisées, tels les neurones et les cellules épithéliales, la fusion des vésicules membranaires fait intervenir des protéines SNAREs particulières qui sont des composants de l'exocyste (TerBush & Novick, 1995).

Le composant 7, ou rEXO70, est impliqué dans l'adressage des vésicules d'exocytose sur les sites de fusion de la membrane plasmique. Dans les adipocytes, il joue un rôle important dans la compartimentalisation des vésicules contenant Glut4, un récepteur intracellulaire au glucose amené à la surface de la cellule en réponse à l'insuline (Ewart *et al.*, 2005 ; Inoue *et al.*, 2006).

La kalirine, ou *PAM interacting protein*, est une protéine cytoplasmique intervenant dans la formation de granules de sécrétion (Tooze, 1991 ; Barr *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1993 ; Ohashi & Huttner, 1994 ; Chen & Shields, 1996) ainsi que dans le trafic et l'adressage de protéines impliquées dans la synthèse de peptides telle la *peptidylglycine α -amidating monooxygénase* (PAM).

La kalirine appartient à la famille Dbl (*deleted in B-cell lymphoma*) qui comprend des facteurs d'échanges GDP/GTP pour les petites protéines de liaison du GTP de la famille Rho. Elle est largement distribuée dans le système nerveux central (Kjoller & Hall, 1999) et peut interagir avec la forme inductible de la synthétase du monoxyde d'azote (iNOS). Elle inactive cette enzyme en formant un hétérodimère avec celle-ci (Ratovitski *et al.*, 1999).

PAM est une enzyme impliquée dans la formation de peptides α -amidés après le clivage du groupement carboxy-terminal de la glycine de peptides (Bradbury & Smyth, 1991). Elle est située au niveau du réseau golgien (Tausk *et al.*, 1992 ; Milgram *et al.*, 1993). L'activité de la PAM a été mise en évidence dans l'épithélium intestinal où elle peut utiliser comme substrat des analogues du polypeptide intestinal vasoactif (VIP, *vasoactive intestinal polypeptide*) et semble intervenir ainsi dans la production d'hormones endocriniennes (Noguchi *et al.*, 1988). PAM est présente dans les cellules endocrines de l'estomac et du côlon. Dans l'estomac, elle est co-localisée avec la gastrine dans les cellules les plus matures, situées au bas des glandes

gastriques (Martinez *et al.*, 1993). L'activité de la PAM augmente dans l'estomac lors du sevrage (Marino *et al.*, 1988).

Les protéines SHANK (*SH3 and multiple ankyrin repeat domain protein*) et la protéine PSD95/SAP90 (*postsynaptic density protein 95/synaptic associated protein 90*) sont décrites ci-dessous, au sein d'une même section, car ces deux protéines interagissent et sont co-localisées dans la cellule.

La densité post-synaptique est une structure dense aux électrons associée à la face cytoplasmique de la membrane post-synaptique et caractéristique de synapses excitatrices médiées par le glutamate. A ce niveau, PSD95 se lie directement au récepteur de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Sheng, 1996 ; Kornau *et al.*, 1997 ; Ziff, 1997 ; Craven & Brecht, 1998).

La protéine PSD95 est impliquée dans l'adressage et l'attachement du récepteur NMDA à la membrane post-synaptique (Craven & Brecht, 1998). D'autres récepteurs au glutamate, les récepteurs métabotropes mGluR1 α et mGLUR5 interagissent avec une autre protéine de la région de haute densité post-synaptique, la protéine Homer (Brakeman *et al.*, 1997 ; Kato *et al.*, 1998 ; Tu *et al.*, 1998 ; Xiao *et al.*, 1998). Celle-ci assure le couplage des récepteurs mGluR au récepteur à l'IP3 (Tu *et al.*, 1998).

Une famille de protéines, dénommées GKAP (*guanylate kinase-associated protein*), peuvent se fixer au domaine *guanylate kinase* de la PSD95 (Kim *et al.*, 1997 ; Naisbitt *et al.*, 1997 ; Satoh *et al.*, 1997 ; Takeuchi *et al.*, 1997). C'est également le cas de la protéine membranaire MAGUIN (*Membrane-associated guanylate kinase-interacting protein*) que nous n'avons identifiée que dans les entérocytes provenant d'animaux ayant ingéré la spermine. En interagissant avec la protéine PSD95, MAGUIN joue un rôle dans l'assemblage des composants des jonctions synaptiques (Yao *et al.*, 1999).

Les protéines SHANK sont présentes au niveau de la région PSD des synapses excitatrices (Boeckers *et al.*, 1999a ; Lim *et al.*, 1999 ; Naisbitt *et al.*, 1999 ; Tu *et al.*, 1999 ; Zitzer *et al.*, 1999a). Elles possèdent de nombreux domaines d'interactions et peuvent lier la PSD95 (Naisbitt *et al.*, 1999), la protéine Homer, les GKAP (Boeckers *et al.*, 1999b ; Naisbitt *et al.*,

1999 ; Tu *et al.*, 1999 ; Yao *et al.*, 1999) ainsi que la cortactine, une protéine impliquée dans le *cross-linking* de l'actine corticale (Wu & Parsons, 1993 ; Huang *et al.*, 1997).

Etant donné leurs nombreuses interactions protéiques et leur localisation, les protéines SHANK semblent jouer un rôle d'intermédiaire entre différents récepteurs au glutamate et des complexes protéiques post-synaptiques. Elles constituent également une interface entre ces complexes de signalisation et la régulation du cytosquelette d'actine des épines dendritiques (Naisbitt *et al.*, 1999). Dans les neurones en développement, les protéines SHANK sont co-localisées avec la cortactine au niveau des cônes de croissance et seraient impliquées dans le développement des neurites (Du *et al.*, 1998 ; Naisbitt *et al.*, 1999). Dans les cellules non neuronales, il est vraisemblable que les protéines SHANK jouent un rôle similaire dans la régulation du cytosquelette et la migration cellulaire. Leurs interactions avec des récepteurs de surface pourraient faciliter la signalisation intracellulaire et contribuer à l'organisation macromoléculaire de domaines membranaires spécialisés (Sheng & Kim, 2000).

AUTRES TYPES DE PROTEINES

| | Protéine | SwissProt/TrEMBL |
|--|--|--|
| Mise en évidence chez l'animal témoin | Récepteurs à l'Ip3 1 et 3 (ITPR1 et 3) | P29994 |
| | <i>Guanine nucleotide releasing protein</i> (GNRP) | P28818 |
| | <i>CDK5 regulatory subunit associated protein1</i> (CK5P1) | Q9JLH6 |
| | Transporteur de dicarboxylates mitochondrial (DIC, Slc25a10) | O89035 |
| | Glycoprotéine de surface OX47 (Basigine, CD147) | P26453 |
| | Composants du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) : | O02953, O19445, O62933, P79599, P79602, Q31258, Q31267, Q31271, Q95567, Q95577 |
| Mise en évidence chez l'animal traité | Echangeur Na ⁺ /H ⁺ (SL9A2) | P48763 |
| | <i>Brain-derived immunoglobulin superfamily protein 1</i> (Big1) | Q62682 |
| | <i>Heat Shock protein 70</i> (hsp70) | Q07439 |
| | Neurexine 2-alpha | Q63374 |
| | Activateur du protéasome rPA28, sous-unité alpha | Q63797 |

Tableau III.2.2-5 : Protéines identifiées par l'analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus par digestion enzymatique des protéines sélectionnées sur les gels d'électrophorèse.

La protéine dénommée *guanine nucleotide releasing protein* ou p140 Ras-GRF (*guanine releasing factor*), assure la liaison du GTP à la protéine Ras ce qui entraîne l'activation de celle-ci (Shou *et al.*, 1992). Ras joue un rôle essentiel dans les processus de croissance cellulaire et de développement. La liaison de facteurs de croissance ou de cytokines sur leurs récepteurs entraîne l'activation de kinases de tyrosine ou d'autres kinases associées aux récepteurs ainsi que le recrutement membranaire de plusieurs facteurs dont la GNRP. Activée, la protéine Ras peut alors interagir avec la Ras-GAP, la neurofibromine et les Raf-kinases.

L'activation des Raf-kinases déclenche une cascade de signalisation intracellulaire faisant intervenir les protéines MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) MEK, ERK1 et ERK2. Celles-ci se déplacent dans le noyau (Gonzales *et al.*, 1993) où elle peuvent phosphoryler et

activer certains facteurs de transcription, tel Elk-1, entraînant ainsi une augmentation de la transcription de c-FOS (Gille *et al.*, 1995 ; Treisman, 1994). La plupart des oncogènes sont activés par cette voie de signalisation (Waskiewicz & Cooper, 1995). De plus, l'activation constitutive de MEK1, activée elle-même par Ras, en amont de la cascade de signalisation, déclenche la transformation cellulaire et l'augmentation de la synthèse d'ADN (Marshall, 1995 ; Waskiewicz & Cooper, 1995), mettant ainsi en évidence le rôle joué par la voie des MAPK dans le processus de prolifération cellulaire.

Ray et ses collaborateurs (1999) ont étudié les modifications survenant dans des cellules IEC-6 (*intestinal epithelial cell*) mises en présence de DFMO (un inhibiteur irréversible de la décarboxylase de l'ornithine) au niveau de la voie de signalisation comprenant les MAPK. Ces auteurs ont montré qu'un traitement à l'EGF, qui double le temps de doublement cellulaire, n'a plus aucun effet en présence de DFMO. Cette inhibition de la phosphorylation de l'EGF, suite au traitement des cellules IEC-6 mises en présence de DFMO, suggère une implication des polyamines dans la voie de signalisation (McCormack *et al.*, 1998). La déplétion en polyamines entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire en phase G1 du cycle cellulaire et une augmentation de la quantité de p53 ainsi que d'autres protéines inhibitrices du cycle telles p21^{Waf1/Cip1} et p27^{Kip1}. A l'inverse de ce qui peut être observé dans d'autres types cellulaires, l'augmentation de la concentration de p53 n'induit pas l'apoptose des cellules IEC-6. L'inhibition de la synthèse de polyamines provoque une diminution de l'expression du gène codant pour la protéine ERK2. Cependant, une augmentation de l'activité de cette protéine est observée. La quantité de ERK1 n'est pas modifiée par le traitement mais l'activité de l'enzyme est augmentée. De plus, la diminution de la concentration intracellulaire en polyamines induit, dans les premières heures suivant l'administration de DFMO, l'activation de SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase*) dont l'activité est augmentée de 150%.

JNK est activée dans les cellules lors de l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires (Hibi *et al.*, 1993 ; Kyriakis *et al.*, 1994 ; Sluss *et al.*, 1994 ; Gupta *et al.*, 1996), aux rayons ultraviolets (Derijard *et al.*, 1994), aux drogues endommageant l'ADN (Van Dam *et al.*, 1995 ; Yu *et al.*, 1996), aux inhibiteurs de synthèse protéique (Hibi *et al.*, 1993), aux céramides (Westwick *et al.*, 1995), au TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) et à l'IL1 (Kyriakis *et al.*, 1994 ; Raingeaud *et al.*, 1995). L'activité de JNK est également augmentée sous l'action

de signaux mitogéniques tels les facteurs de croissance (Minden *et al.*, 1994) et la protéine Ras (Derijard *et al.*, 1994).

Un des rôles potentiels de JNK semble être l'initiation de l'apoptose. Par ailleurs, la protéine p53 est un substrat de JNK *in vivo* (Milne *et al.*, 1995).

Ainsi, la déplétion en polyamines entraîne l'arrêt de la prolifération des cellules IEC-6 en phase G1, sans induire d'apoptose. Cette inhibition de croissance s'accompagne de l'augmentation de la concentration en protéines p53, p21 et p27 suite à l'activation de JNK. p21, à son tour, peut inhiber l'activité de CDK (*cyclin dependent kinase*) indispensable à la progression du cycle cellulaire (Ray *et al.*, 1999).

La protéine CK5P1 (*CDK5 regulatory subunit associated protein1*) régule négativement l'activité de l'enzyme CDK5 (*cyclin dependent kinase 5*) (Ching *et al.*, 2002).

Les kinases de protéines dépendant des cyclines (CDK) jouent un rôle essentiel dans la régulation de la division cellulaire (Morgan, 1997). Pour être fonctionnelles, elles doivent lier une cycline. De plus, leur activité enzymatique est fortement régulée par phosphorylation et par association à des inhibiteurs spécifiques.

Outre son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, l'enzyme CDK5 est impliquée dans le contrôle de la différenciation des neurones et de la dynamique du cytosquelette de ces cellules (Lew & Wang, 1995 ; Daran & Tsai, 2001 ; Grant *et al.*, 2001). Elle est activée, entre autres, par la liaison d'un agoniste sur un récepteur au glutamate de type métabotrope (mGLUR) (Liu *et al.*, 2001).

La protéine hsp70 (*Heat shock protein 70*) appartient à la famille hautement conservée des « protéines de stress ». Celles-ci exercent des fonctions essentielles à la vie et, plus encore, à la survie lors d'un stress d'origine chimique, physique ou métabolique. Certaines protéines hsps, comme hsp90, 70, 60 et 27 agissent comme des chaperons. Elles s'associent à des peptides et à des protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation. Elles conditionnent ainsi le repliement correct et la translocation de substances dans les compartiments subcellulaires appropriés (Gething & Sambrook, 1992). Elles sont aussi

capables de se lier à des protéines dénaturées afin de rétablir les propriétés de celles-ci (Parsell & Lindquist, 1993).

Parmi toutes les protéines de stress décrites, la famille hsp70 est la plus conservée. Certains membres de cette famille sont spécifiquement associés à des compartiments intracellulaires comme le cytoplasme (hsp70/hsc70) ou à des organites tels que la mitochondrie (hsp75) ou le réticulum endoplasmique (Grp78). Les protéines hsp70 associées aux organites jouent un rôle crucial dans la translocation et la bonne conformation des protéines (Martin & Hartl, 1994 ; Hartl & Martin, 1995). En revanche, le rôle des protéines de la famille hsp70 présentes dans le cytoplasme est moins bien compris, probablement en raison de la diversité de celles-ci. En effet, elles participent à la bonne conformation des protéines (Martin & Hartl, 1994 ; Hartl & Martin, 1995), à la suppression de l'agrégation des protéines, à la réactivation des protéines dénaturées (Gething & Sambrook, 1992), à la translocation nucléaire (Shi & Thomas, 1992), à l'élimination de la clathrine des vésicules (Ungewickell, 1985), à l'import mitochondrial (Terada *et al.*, 1995), au ciblage de polypeptides à dégrader vers les lysosomes (Chiang *et al.*, 1989 ; Terlecky *et al.*, 1992), à la dégradation d'ARNm (Laroia *et al.*, 1999) et à la régulation de la réponse cellulaire suite à un choc thermique (Lindquist, 1986).

Le rôle des membres de la famille hsp70, dans ces diverses régulations, est basé sur la capacité de ces protéines à interagir avec d'autres protéines ou des polypeptides (Georgopoulos & Welch, 1993). Il existe un grand nombre de partenaires protéiques des protéines hsp70 parmi lesquels les protéines p53 (Sturzbecher *et al.*, 1987 ; Fourie *et al.*, 1997), Rb (Inoue *et al.*, 1995), c-myc (Koskinen *et al.*, 1991) et d'autres hsps (Minami *et al.*, 1996).

Desiderio et ses collaborateurs (1996), ont étudié l'expression des gènes codant pour les protéines hsp70, c-fos, c-jun et l'oxydase hémique (Hox, une enzyme « marqueur » du stress oxydant), au sein de cellules d'hépatocarcinome exposées à un choc thermique. Les cellules avaient au préalable été traitées par du DFMO ou par un autre inhibiteur de synthèse de polyamines (MAP/AbeAdo). Ce dernier inhibe à la fois la décarboxylase de l'ornithine et la décarboxylase de la S-adénosylméthionine.

Le déficit intracellulaire en putrescine et en spermidine, obtenu par le traitement au DFMO, empêche l'induction de l'expression de gène HSP70 attendue suite au choc thermique. A

l'inverse, le déficit en spermidine et en spermine, obtenu par le traitement des cellules au MAP/AbeAdo, diminue l'intensité et la durée de l'accumulation intracellulaire d'ARNm codant pour les protéines hsp70 induite par le choc thermique. L'induction de l'expression des gènes codant pour les protéines Hox, c-jun et c-fos est également inhibée. Le traitement à l'aide de MAP/AbeAdo induit une accumulation de putrescine dans les cellules. Cette polyamine possède, en effet, une action stabilisatrice sur les ARNm codant pour les protéines hsp70 et c-jun. Ainsi, l'intégrité du pool intracellulaire en polyamines apparaît nécessaire pour permettre la réponse métabolique aux stress environnementaux (Desiderio *et al.*, 1996).

Les récepteurs à l'IP3, IPTR, sont exprimés dans les cellules épithéliales de l'intestin (Matovcik *et al.*, 1996 ; Nakanishi *et al.*, 1996) et au niveau des granules de sécrétion des cellules neuroendocrines dont ils contrôlent la libération de Ca^{2+} (Blondel *et al.*, 1995). Trois types de récepteurs à l'IP3 ont été identifiés, codés par différents gènes présentant un haut degré d'homologie. Ces récepteurs peuvent s'assembler et former des homo- ou hétérotétramères (Nucifora *et al.*, 1996). La distribution des types de récepteur à l'IP3 au niveau des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal présente une forte hétérogénéité et dépend de l'hormone sécrétée par la cellule. Par exemple, aucune cellule entéroendocrine ne synthétise le récepteur de type 2 à l'IP3 ; toutes les cellules produisant de la sérotonine et/ou de la chromogranine A contiennent les récepteurs des types 1 et 3 ; les cellules sécrétant la substance P ou la sécrétine synthétisent soit le récepteur de type 1 de l'IP3, soit le récepteur de type 3 de dernière substance (Wang *et al.*, 2004).

Le transporteur de dicarboxylates (DIC, Slc25a10) est un composant de la membrane mitochondriale interne. Il joue un rôle important, en particulier au niveau du foie, dans la gluconéogenèse, la synthèse d'urée et le métabolisme du soufre. Il échange des acides dicarboxyliques, tels le malate et le succinate, par des phosphates, des sulfates, des sulfites ou des thiosulfates (Chappel & Haarhoff, 1967 ; Palmieri *et al.*, 1971 ; Crompton *et al.*, 1974a ; Crompton *et al.*, 1974b). Ce transporteur est impliqué de façon prédominante dans la régulation de la concentration en glutathion au sein de la mitochondrie (Lash, 2006).

L'analyse de l'expression du gène codant pour le transporteur de dicarboxylates révèle la présence d'ARNm codant pour cette protéine non seulement dans le foie et le rein mais également dans le cœur et dans le cerveau. Ces données suggèrent que ce transporteur peut

intervenir dans la fourniture de substrat à d'autres voies métaboliques que la gluconéogenèse et l'uréogenèse (Fiermonte *et al.*, 1998).

La protéine basigine, ou CD147, a été détectée dans l'intestin (Kanekura *et al.*, 1991). Elle appartient à la superfamille des immunoglobulines (Fossum *et al.*, 1991). Elle disparaît des entérocytes de l'iléon après l'administration orale de spermine. En association avec MCT-1 (*monocarboxylate transporter-1*), la basigine serait impliquée dans le transport du butyrate par les cellules épithéliales. Cette protéine joue aussi un rôle dans la progression tumorale. En effet, elle est abondamment exprimée à la surface des cellules cancéreuses (Ellis *et al.*, 1989 ; Polette *et al.*, 1997) et elle stimule la production de métalloprotéinases matricielles par les cellules adjacentes (Ellis *et al.*, 1989 ; Kataoka *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2004).

L'échangeur Na^+/H^+ de la membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la stabilité du pH intracellulaire de la plupart des cellules animales. Il est également impliqué dans la régulation du volume cellulaire, dans le transport transépithélial d'électrolytes et dans l'élévation du pH intracellulaire qui accompagne la croissance et la différenciation cellulaires (Moolenaar, 1986 ; Grinstein *et al.*, 1989). Cet échangeur a d'abord été identifié dans le rein (Murer *et al.*, 1976). Par la suite, sa présence a été détectée au niveau de divers organes de mammifères (Pouyssegur, 1985). Dans l'intestin, deux types d'échangeurs Na^+/H^+ ont été mis en évidence au niveau apical ou basolatéral des entérocytes (Kikuchi *et al.*, 1988 ; Acra *et al.*, 1993). L'échangeur présent au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales du côlon possède des propriétés cinétiques particulières, différentes de celles des échangeurs présents dans les cellules épithéliales d'autres organes (Rajendran & Binder, 1990). Cette isoforme particulière, NHE2, est présente en grande quantité au niveau du tube digestif (estomac, jéjunum, iléon, foie, côlon). Elle a été mise en évidence en faible quantité dans les reins, les muscles squelettiques, le cerveau, l'utérus, le cœur, les testicules et les poumons (Collins *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1993).

La protéine Big1 (*Brain-derived immunoglobulin superfamily protein 1*), ou contactine 3, appartient à la superfamille des immunoglobulines. Elle est ancrée à la membrane plasmique par un résidu de glycoposphatidylinositol. Sa synthèse varie au cours du développement et est particulièrement élevée dans le cerveau adulte. La protéine Big1 stimule la croissance des neurites *in vitro* (Yoshihara *et al.*, 1994).

Dans l'intestin, une concentration élevée de contactine 4, également appelée Big2, a été mise en évidence. Cette protéine module la réponse de cellules de neuroblastomes à des agents de différenciation tel l'acide rétinoïque (Hansford *et al.*, 2003).

La neurexine-2 alpha apparaît dans les entérocytes de l'iléon des rats non sevrés suite à l'ingestion de spermine. Il s'agit d'une protéine de surface probablement impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire et habituellement observée dans le cerveau (Ushkaryov *et al.*, 1992). Cependant, la multiplication du nombre de gènes codant pour cette protéine et du nombre de sites d'épissage des ARNm codant pour cette même protéine suggère qu'il est possible d'obtenir plus de 1 000 isoformes de la neurexine-2 alpha (Ullrich *et al.*, 1995). Il n'est donc pas exclu qu'il existe une isoforme spécifique de cette protéine dans l'intestin.

Plusieurs protéines appartenant au système du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (chaîne mature alpha du CMH I, RT1.C, RT1.E), identifiées dans l'iléon des rats témoins, disparaissent après l'ingestion de spermine par des animaux du même âge. La structure de ces protéines est très proche de celle des récepteurs intestinaux aux immunoglobulines de type G (IgG) présentes dans le lait maternel. Ces récepteurs sont composés d'une chaîne bêta-2 microglobuline et d'une chaîne alpha (Simister, 1993 ; Ahouse *et al.*, 1993). Les protéines identifiées concernent éventuellement ces récepteurs intestinaux. Leur disparition, induite par l'ingestion de spermine, correspond à ce qui est observé lors de la maturation naturelle de l'intestin grêle. Par ailleurs, l'administration de cortisone ou de thyroxine à des rats non sevrés induit une diminution du nombre de récepteurs aux IgG (Gill *et al.*, 1999).

L'activateur 28 du protéasome 20S (PA28) n'est pas mis en évidence dans les cellules du jéjunum isolées de l'intestin d'animaux traités par la spermine, soit que sa concentration ait diminué, soit qu'il ait été modifié au niveau de ses propriétés physico-chimiques et, de ce fait, été déplacé sur le gel de polyacrylamide. L'activateur 28 du protéasome 20s est impliqué dans la formation de peptides de reconnaissance de classe I, requis pour la présentation antigénique (Kloetzel & Ossendorp, 2004). La disparition, suite au traitement par la spermine, de protéines de surface appartenant au CMHI a également été constatée lors de notre analyse. L'activateur du protéasome PA28 est lui-même activé par l'interféron gamma dont la sécrétion est inhibée en présence de spermine (Hasko *et al.*, 2000).

Conclusion

L'analyse protéomique a permis d'identifier, dans les entérocytes, un certain nombre de protéines dont des paramètres sont modifiés suite au traitement des rats par la spermine. Plusieurs niveaux fonctionnels de la cellule sont concernés : la dynamique du cytosquelette et la régulation de la sécrétion ; le métabolisme dont, notamment, celui des acides gras ; le cycle de l'urée ; la respiration cellulaire ; la régulation de la transcription de gènes et/ou de la prolifération cellulaire ; des cascades de signalisation intracellulaire ; la dégradation protéique faisant intervenir l'ubiquitine ou des protéases spécifiques ; certaines protéines, telles les protéines hsp, intervenant de manière ubiquitaire dans la cellule.

Ces résultats confirment qu'un bouleversement métabolique important caractérise le passage du phénotype immature au phénotype adulte dans le cas des entérocytes.

Les interactions que connaissent les polyamines avec certaines protéines, identifiées par l'analyse protéomique que nous avons réalisée, ont été décrites dans la littérature et résumées dans ce chapitre. A plusieurs reprises, nous avons constaté que les facteurs de régulation de propriétés de ces protéines sont les mêmes que ceux mis en évidence dans le cadre de la maturation intestinale postnatale. Rappelons, à titre d'exemple, que la signalisation par la protéine STAT5, que nous avons identifiée dans les entérocytes provenant de rats témoins, est stimulée par les glucocorticoïdes. Le rôle de ceux-ci dans la maturation postnatale de l'intestin a effectivement été amplement démontré (Henning, 1978 ; Galand, 1989).

Devant la diversité des protéines identifiées, la suite de nos investigations a dû être ciblée. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux modifications survenant au niveau des enzymes du cycle de l'urée et au niveau de la cathepsine D. En effet, le métabolisme des polyamines est directement lié au cycle de l'urée par un intermédiaire commun, l'ornithine. La cathepsine D, quant à elle, est une protéase lysosomiale, abondante dans l'iléon, pouvant être impliquée dans les altérations morphologiques observées dans cet organe dès les premières heures qui suivent l'ingestion de spermine.

Dans le but d'identifier des protéines qui sont affectées dans les moments initiaux de la maturation des entérocytes, une seconde analyse protéomique a été réalisée. Dans ce cas, ces

cellules ont été isolées quelques heures après l'ingestion de spermine. Les résultats de cette analyse sont présentés dans un chapitre ultérieur de ce travail.

2.3 Modifications du cycle de l'urée

L'analyse des modifications de propriétés de protéines contenues dans les entérocytes, suite à l'ingestion de spermine, suggère une variation de la quantité de synthétase de carbamoyl phosphate (EC 6.3.4.16) et de synthétase d'argininosuccinate (EC 6.3.4.5). Ces deux enzymes interviennent dans le cycle de l'urée ou cycle de l'ornithine, comprenant trois autres enzymes : la transcarbamylase de l'ornithine (EC 2.1.3.3), la lyase de l'argininosuccinate (EC 4.3.2.1) et l'arginase (EC 3.5.3.1) (figure III.2.3-1).

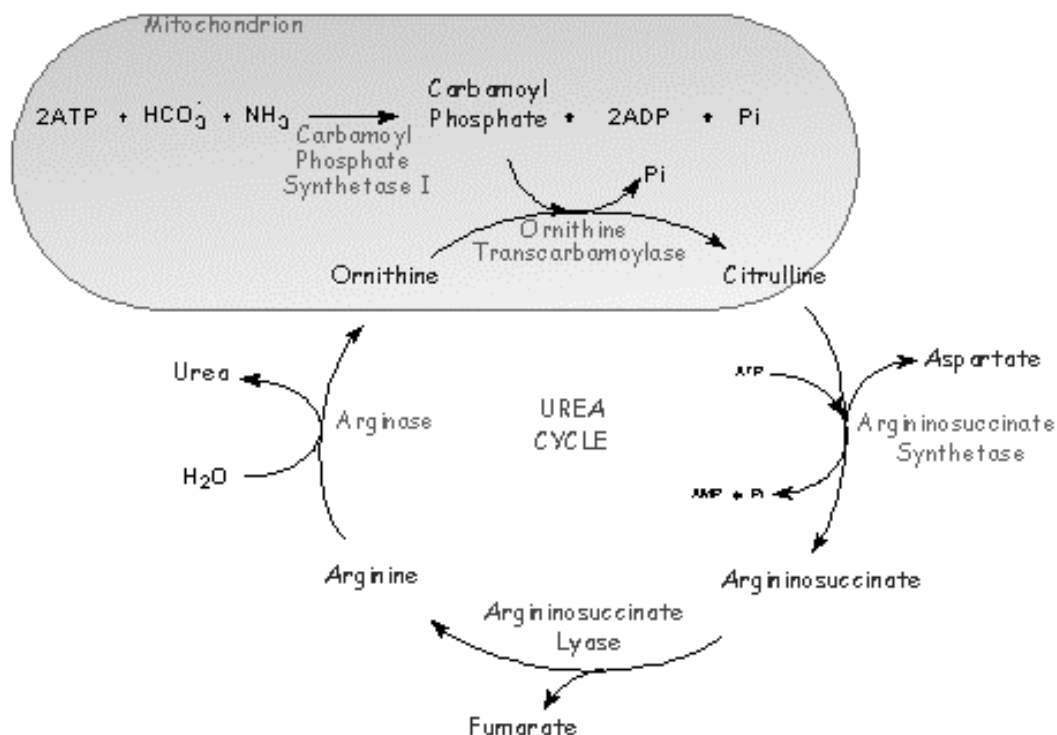


Figure III.2.3-1 : Le cycle de l'ornithine.

Bien qu'initialement décrit dans le foie, au niveau duquel il sert à convertir, sous forme d'urée, l'excès d'ammoniaque produit par le catabolisme des protéines, le cycle de l'urée est présent dans divers organes selon l'âge et le développement. Ainsi, une activité importante de l'ensemble des enzymes du cycle a été mise en évidence dans l'intestin grêle en développement (Hurwitz & Kretchmer, 1986 ; de Jonge *et al.*, 1998). D'autres organes possèdent également une partie des enzymes du cycle. Chez l'adulte, par exemple, on

retrouve la synthétase de l'argininosuccinate et la lyase de l'argininosuccinate dans le rein (Tizianello *et al.*, 1980 ; Levillain *et al.*, 1990). Ces enzymes permettent la synthèse d'arginine à partir de la citrulline libérée par l'intestin grêle (Wu & Morris, 1998 ; Mori & Gotoh, 2000).

La synthétase de l'argininosuccinate est une enzyme-clé du cycle de l'ornithine. Elle est présente de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères et est impliquée dans diverses pathologies. Sa déficience entraîne une citrullinémie pouvant être létale (McMurray *et al.*, 1962 ; Beaudet *et al.*, 1986) tandis qu'une hyperactivité de l'enzyme provoque une surproduction de monoxyde d'azote (Xie & Gross, 1997 ; Xie *et al.*, 2000). Le cycle de l'ornithine est, en effet, connecté avec plusieurs autres voies métaboliques dont, entre autres, la synthèse du monoxyde d'azote à partir de citrulline et la synthèse des polyamines via l'ornithine.

L'activité de la synthétase de l'argininosuccinate évolue chez la souris au cours du développement postnatal (Hurwitz & Kretchmer, 1986). Alors qu'elle est élevée au niveau de l'intestin grêle peu après la naissance, elle n'est plus présente que sous forme de traces dans l'intestin de la souris adulte. Par ailleurs, la synthèse d'arginine à partir de citrulline est plus importante dans l'intestin grêle que dans les reins chez le rat non sevré. La situation est inversée chez le rat adulte où l'activité de la synthétase de l'argininosuccinate est détectée essentiellement dans le rein et dans le foie (de Jonge *et al.*, 1998).

Résultats

La disparition de la synthétase de l'argininosuccinate suite à l'ingestion de spermine chez le rat non sevré est confirmée par immunodétection de l'enzyme. Les résultats obtenus révèlent que cette protéine d'environ 56 000 daltons disparaît dans le jéjunum et dans l'iléon des animaux traités à la spermine. Cette disparition correspond à ce qui est observé chez l'animal adulte (figure III.2.3-2).

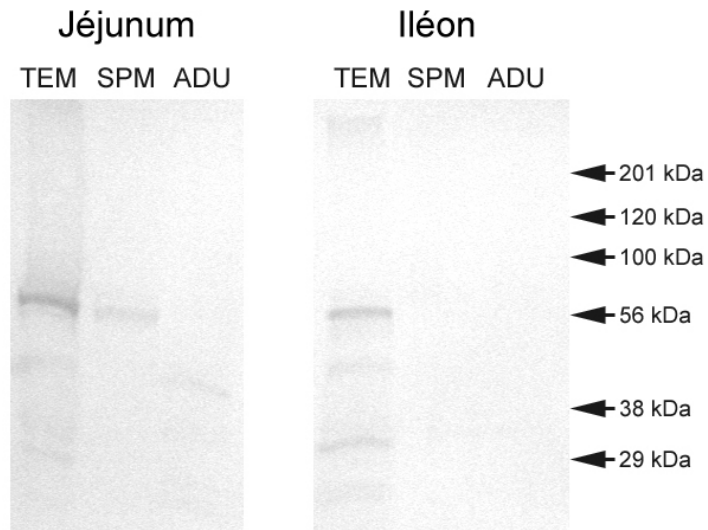


Figure III.2.3-2 : Immunodétection de la synthétase de l'argininosuccinate dans les protéines extraites du jéjunum et de l'iléon de rats non sevrés témoins (TEM), traités à la spermine (SPM) ou de rats adultes (ADU).

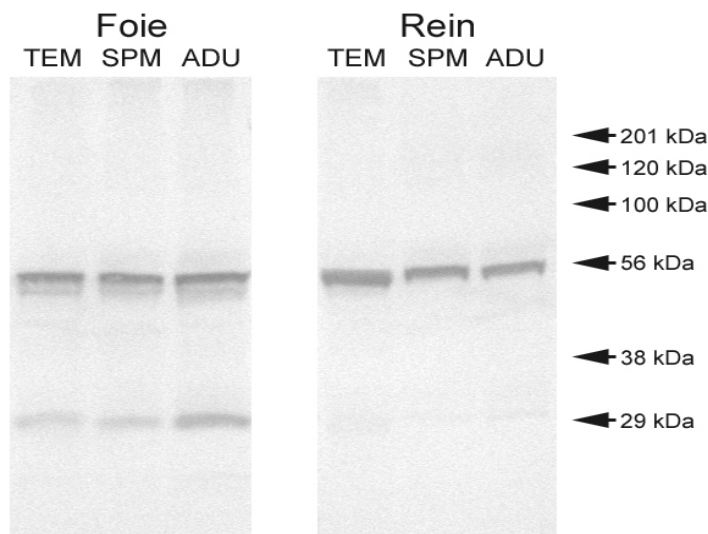


Figure III.2.3-3 : Immunodétection de la synthétase de l'argininosuccinate dans les protéines extraites du foie et du rein de rats non sevrés témoins (TEM), traités à la spermine (SPM) ou de rats adultes (ADU).

Dans le foie et dans le rein de rats non sevrés, le traitement à la spermine ne provoque pas la disparition de l'enzyme. Dans le foie, une bande protéique d'environ 29 000 daltons apparaît et son intensité est plus importante chez l'animal adulte (figure III.2.3-3). L'identité de cette bande est inconnue.

L'analyse de l'expression des gènes codant pour la synthétase du carbamoyl-phosphate, la transcarbamylase de l'ornithine, la synthétase de l'argininosuccinate, la lyase de l'argininosuccinate, et l'arginase, par rapport à l'expression du gène codant pour la déshydrogénase du glycéraldéhyde-3-phosphate, montre plusieurs différences significatives (figure III.2.3-4 ; tableau III.2.3-1). Dans le jéjunum, le traitement des rats non sevrés à la spermine réduit significativement l'expression du gène codant pour la synthétase du carbamoyl-phosphate ($p = 0,02$). Dans l'iléon, l'expression des gènes codant pour la synthétase de l'argininosuccinate ($p = 0,016$) et la lyase de l'argininosuccinate ($p = 0,009$) est significativement réduite par l'administration de spermine. A l'inverse, l'expression du gène codant pour l'arginase est augmentée dans les cellules suite à l'ingestion de spermine, à la fois dans le jéjunum ($p = 0,006$) et dans l'iléon ($p = 0,028$).

| | | Enzyme ARNm/GAPDH ARNm | |
|-----|-----|------------------------|-----------------|
| | | Jéjunum | Iléon |
| CPS | Tém | 0.482 ± 0.035 | 0.515 ± 0.378 |
| | Spm | 0.207 ± 0.071* | 0.807 ± 0.297 |
| OTC | Tém | 1.097 ± 0.250 | 2.300 ± 1.058 |
| | Spm | 0.725 ± 0.060 | 1.067 ± 0.343 |
| ASS | Tém | 1.341 ± 0.466 | 3.334 ± 0.892 |
| | Spm | 0.534 ± 0.296 | 1.207 ± 0.416* |
| ASL | Tém | 1.420 ± 0.013 | 2.257 ± 0.291 |
| | Spm | 1.376 ± 0.413 | 1.294 ± 0.174** |
| ARG | Tém | 0.458 ± 0.006 | 0.501 ± 0.288 |
| | Spm | 2.227 ± 0.276** | 1.158 ± 0.205* |

*Tableau III.2.3-1 : Rapport des densités optiques des ARNm de la GAPDH et de l'enzyme considéré, obtenus par RT-PCR d'1µg d'ARNm total de jéjunum ou d'iléon d'animal témoin (tém) ou traité à la spermine(spm). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'écart-type (N=3). CPS : synthétase du carbamoyl-phosphate ; OTC : transcarbamylase de l'ornithine ; ASS : synthétase de l'argininosuccinate ; ASL : lyase de l'argininosuccinate ; ARG : arginase 2 ; GAPDH : déshydrogénase du glycéraldéhyde-3-phosphate. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.*

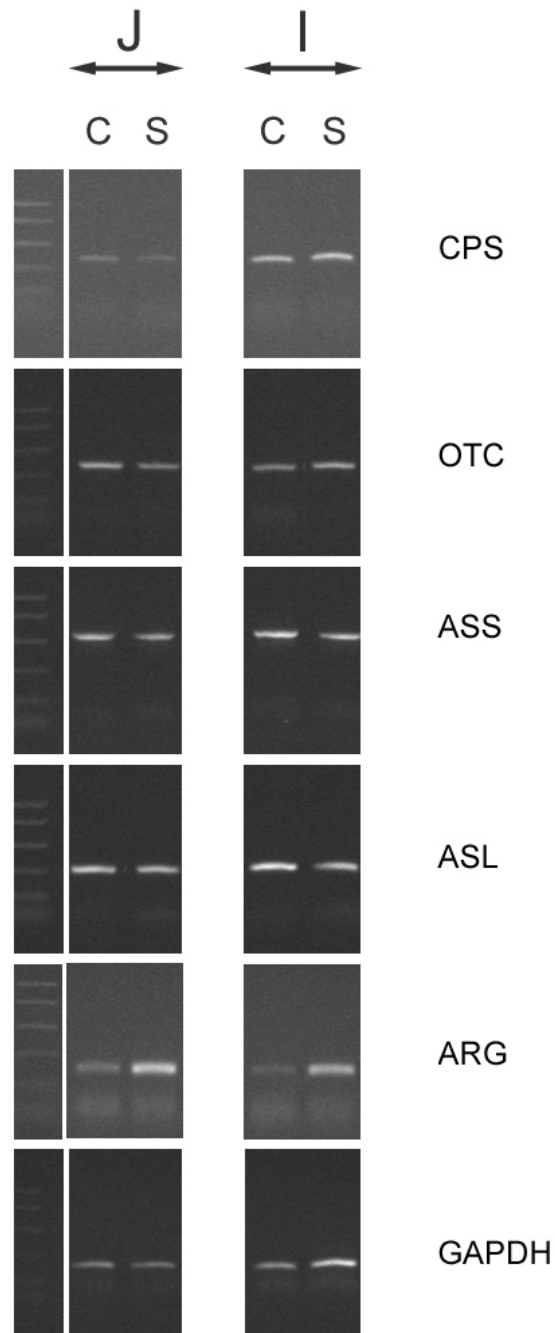


Figure III.2.3-4 : Amplification (RT-PCR) des transcrits des gènes codant pour la synthétase du carbamoyl-phosphate (CPS), la transcarbamylase de l'ornithine (OTC), la synthétase de l'argininosuccinate (ASS), la lyase de l'argininosuccinate (ASL), l'arginase (ARG) et la déshydrogénase du glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH) contenus dans le jéjunum (J) et dans l'iléon (I) de rats non sevrés âgés de 14 jours traités (S) ou non (C) à la spermine.

Discussion

Chez le rat, l'expression des gènes codant pour la synthétase du carbamoyl-phosphate et pour la synthétase de l'argininosuccinate a été décrite comme diminuant spontanément dans l'intestin grêle de la naissance à la fin du sevrage (de Jonge *et al.*, 1998). Les résultats obtenus dans ce chapitre sont en accord avec ces observations, apportant un argument supplémentaire en faveur de la similitude existant entre la maturation intestinale induite par l'ingestion de spermine et la maturation intestinale postnatale naturelle.

L'expression d'autres gènes codant pour des enzymes du cycle de l'urée est modulée par l'administration de spermine. C'est le cas de l'expression du gène codant pour la lyase de l'argininosuccinate, qui diminue, ainsi que de celle du gène codant pour l'arginase qui augmente après l'ingestion de spermine.

L'augmentation de l'expression du gène codant pour l'arginase et la diminution de celle des gènes codant pour la synthétase du carbamoyl-phosphate, la synthétase de l'argininosuccinate et la lyase de l'argininosuccinate dans l'intestin grêle pourraient indiquer que le métabolisme de cet organe, fortement impliqué dans la biosynthèse d'arginine chez l'animal non sevré, s'oriente vers la biosynthèse de polyamines, de proline ou de glutamate à partir de l'ornithine. En effet, l'administration de spermine induit une augmentation de l'activité de la décarboxylase de l'ornithine dans l'intestin grêle du rat non sevré (Wild *et al.*, 1993) ainsi qu'une augmentation de la concentration en putrescine, en spermidine et en spermine dans l'iléon du rat non sevré trois jours après l'ingestion de spermine (Wéry *et al.*, 1996). Cette orientation du cycle vers la biosynthèse des polyamines, de proline et de glutamate pourrait être un appui à la prolifération des cellules afin de (1) reconstituer la morphologie de l'épithélium intestinal après la perte cellulaire induite par la spermine (Kaouass *et al.*, 1996 ; Peulen *et al.*, 2001) et (2) acquérir le phénotype adulte de l'épithélium intestinal (Dufour *et al.*, 1988). La production éventuelle de proline, à partir d'ornithine, pourrait être nécessaire à la production de protéines de la matrice extracellulaire tel le collagène, une protéine très riche en proline.

Au niveau du foie, l'expression du gène codant pour la synthétase de l'argininosuccinate ne varie pas entre le 4^{ème} et le 25^{ème} jours après la naissance (Dingemans *et al.*, 1996).

L'enzyme est principalement localisée dans les hépatocytes périportaux où elle joue un rôle de détoxification de l'ammoniaque.

Dans le rein, la synthétase de l'argininosuccinate est une enzyme corticale (Morris *et al.*, 1991 ; Dhanakoti *et al.*, 1992) impliquée dans la production d'arginine à partir de la citrulline libérée par les entérocytes de l'intestin grêle. Le gène codant pour la synthétase de l'argininosuccinate est déjà exprimé dans le rein à la naissance. Cette expression augmente entre le 5^{ème} jour postnatal et le moment du sevrage. Les résultats, que nous avons obtenus par immunodétection, ne montrent pas de modification de la concentration de la synthétase de l'argininosuccinate ni entre l'animal nouveau-né et l'adulte, ni suite à l'ingestion de spermine par le rat non sevré. Ceci peut être expliqué par le fait que la synthétase de l'argininosuccinate possède une demi-vie de plusieurs jours (Schimke *et al.*, 1964 ; Tsuda *et al.*, 1979) tandis que son ARNm ne survit que quelques heures (Morris *et al.*, 1987). La concentration de cet ARNm semble donc être un meilleur indicateur temporel des modifications survenant dans le rein que la protéine elle-même.

En conclusion, alors qu'aucun nutriment n'avait encore été identifié comme modulateur de l'expression de la synthétase de l'argininosuccinate dans l'intestin (Husson *et al.*, 2003), nous montrons que l'abondance du transcrit de cette enzyme peut être modulée dans cet organe par des substances alimentaires comme la spermine. D'autres enzymes du cycle de l'urée sont influencées par la spermine d'une manière qui suggère une orientation de la voie métabolique, entre autres, vers la synthèse de polyamines.

2.4 Modifications de la cathepsine D dans les entérocytes

L'analyse protéomique, réalisée à partir d'échantillons de rats traités ou non par la spermine, suggère une modification de la quantité de cathepsine D présente dans les entérocytes de l'iléon, trois jours après l'ingestion de spermine.

La cathepsine D est une protéase à aspartate contenue dans les lysosomes. Elle est particulièrement abondante dans l'iléon du rat non sevré. Son activité est faible dans le jéjunum et élevée dans l'iléon lors de la période néonatale de cet animal. Elle diminue ensuite lors de la maturation intestinale spontanée (Davis & Messner, 1984 ; Ekström & Weström, 1991).

La cathepsine D est abondante dans le lait maternel. Son activité est augmentée d'un facteur 3 dans la glande mammaire au cours de la lactation (Hernandez-Montes *et al.*, 1999). L'augmentation de l'activité de cette protéase peut être expliquée par le *turn-over* important de constituants des organites cellulaires (Rosano *et al.*, 1976) et l'accélération de la synthèse protéique (Roh *et al.*, 1994), qui caractérisent les cellules de la glande mammaire en période de lactation. Plus récemment, Lkhider et ses collaborateurs (2004) ont attribué à la cathepsine D, présente dans le lait maternel, un rôle dans le clivage de la prolactine. Cette hormone est présente dans la glande mammaire en lactation et dans le lait maternel sous plusieurs formes (Sinha, 1995 ; Ellis & Picciano, 1995 ; Lkhider *et al.*, 1996). La signification fonctionnelle de ces différentes formes est encore très peu comprise. Cependant, un fragment de 16 kDa, résultant de l'hydrolyse de la prolactine, présente un intérêt particulier (Corbacho *et al.*, 2002). Ce fragment, à l'inverse de la prolactine intacte qui stimule l'angiogenèse, apparaît comme un inhibiteur potentiel de ce phénomène tant *in vivo* qu' *in vitro* (Ferrara *et al.*, 1991 ; Clapp *et al.*, 1993 ; Struman *et al.*, 1999). Il peut également agir en tant que facteur pro-apoptotique (Martini *et al.*, 2000). La production de ce fragment de 16 kDa, issu de la prolactine, est réalisé par la cathepsine D, agissant à pH physiologique, dans le milieu extracellulaire.

La cathepsine D joue un rôle essentiel dans le remodelage et la régénération tissulaires, vraisemblablement par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de croissance. Des souris *knock-out* pour la cathepsine D se développent normalement jusqu'au moment du sevrage. Par la suite, ces animaux dépérissent rapidement. Deux altérations majeures sont alors observées :

une nécrose hémorragique dans l'intestin grêle et l'augmentation du nombre de cellules en apoptose dans le thymus (Saftig *et al.*, 1995).

Chez l'homme, la présence de mutations dans le gène codant pour la cathepsine D induit chez l'enfant un syndrome neurodégénératif comprenant une cécité précoce et l'installation progressive de troubles psychomoteurs. Ces mutations se traduisent, notamment, par une diminution de la quantité et de l'activité protéolytique de l'enzyme au niveau des fibroblastes (Steinfeld *et al.*, 2006).

Lors de maladies inflammatoires de l'intestin, la transcription de la cathepsine D est induite dans les macrophages intestinaux. La protéine est détectée dans la muqueuse de patients atteints de maladies inflammatoires alors qu'elle est absente de celle de personnes saines (Hausmann *et al.*, 2004).

La cathepsine D est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux sous la forme d'une pro-enzyme inactive de 52 kDa (Gieselmann *et al.*, 1983). Dans le système de Golgi, cette pro-enzyme reçoit un signal moléculaire de type phosphomannosyl (mannose-6-phosphate) qui la dirige vers les compartiments endosomiaux par l'intermédiaire du récepteur au mannose-6-phosphate (MPR300) fonctionnant de manière indépendante de cations (Kornfeld, 1992 ; Koster *et al.*, 1993). Dans les endosomes tardifs, le récepteur et son ligand sont recyclés (Ghosh *et al.*, 2003 ; Arighi *et al.*, 2004) tandis que la pro-cathepsine D subit un premier clivage qui produit une forme intermédiaire de 48 kDa (Rijnboutt *et al.*, 1991 ; Wittlin *et al.*, 1999). Cette molécule est alors clivée dans les lysosomes pour former l'enzyme mature constituée de deux chaînes d'environ 14 et 34 kDa (Gieselmann *et al.*, 1983).

Bien qu'une auto-activation de l'enzyme ait été mise en évidence *in vitro* en milieu acide (Hasilik *et al.*, 1982), des études récentes ont montré que l'activation de la pro-cathepsine D est indépendante de sa propre fonction catalytique. En effet, l'inhibition de protéases à cystéine entraîne l'accumulation des formes de 52 et 48 kDa. Par ailleurs, l'inhibition spécifique des cathepsines lysosomiales B et L, qui sont des protéases à cystéine, induit l'accumulation de la forme de 48 kDa. Ces résultats suggèrent que le clivage de la cathepsine D produisant la forme mature de l'enzyme est un processus assisté, dépendant de l'activité d'autres protéases (Laurent-Matha *et al.*, 2006).

Dans ce chapitre, nous confirmons les modifications survenant au niveau de l'activité et de l'expression de la cathepsine D dans les entérocytes, suite à l'ingestion de spermine.

Résultats

La mesure de l'activité de la cathepsine D est estimée par l'hydrolyse d'un substrat spécifique de cette enzyme, le BOC-Phe-Ala-Ala-pNitro-Phe-Phe-Val-Leu-4 hydroxyméthylpyridine ester. Un des produits de cette hydrolyse absorbe la lumière à la longueur d'onde de 310 nm. L'évolution de l'absorbance à cette longueur d'onde en fonction de la durée d'hydrolyse permet de calculer la vitesse initiale de la réaction catalysée par l'enzyme (figure III.2.5-1). Dans les conditions où la concentration en substrat n'est pas limitante, cette vitesse initiale est directement proportionnelle à la quantité de complexe enzyme-substrat et donc d'enzyme. On constate que la cathepsine D est plus active dans l'iléon que dans le jéjunum (figure III.2.5-2). Dans l'iléon le traitement des animaux à la spermine réduit l'activité de l'enzyme.

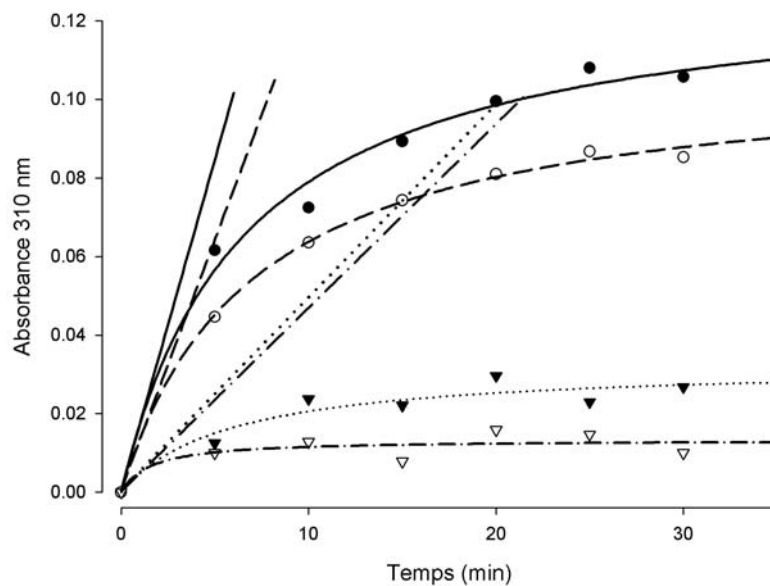


Figure III.2.5-1 : Mesure de la quantité de produit libéré par l'hydrolyse de BOC-Phe-Ala-Ala-pNitro-Phe-Phe-Val-Leu-4 hydroxyméthylpyridine ester catalysée par la cathepsine D contenue dans le jéjunum (▽) et dans l'iléon (○) de rats traités (○ ou ▽) ou non (● ou ▼) à la spermine. Les vitesses initiales de la réaction sont représentées par les pentes des tangentes à la courbe à l'origine.

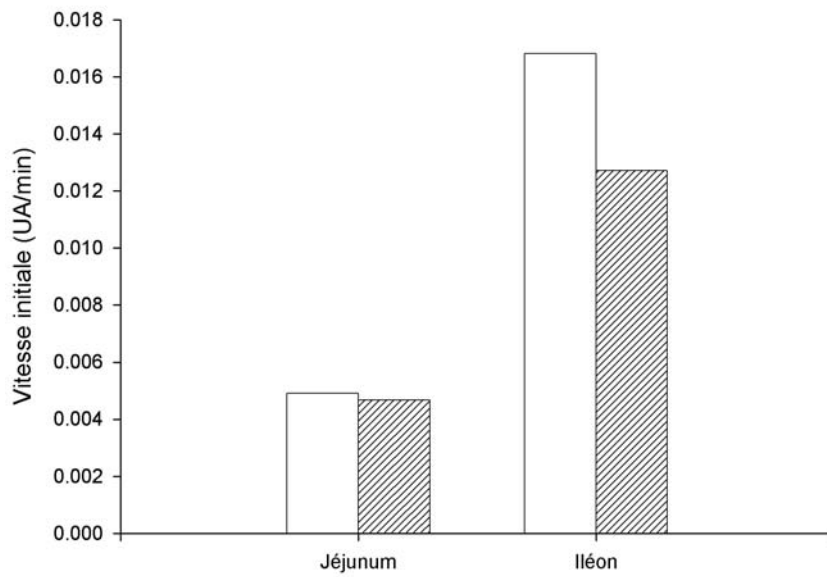


Figure III.2.5-2 : Activité de la cathepsine D (vitesse initiale : UA/min) contenue dans le jéjunum et dans l'iléon de rats non sevrés traités (histogrammes hachurés) ou non (histogrammes blancs) à la spermine.

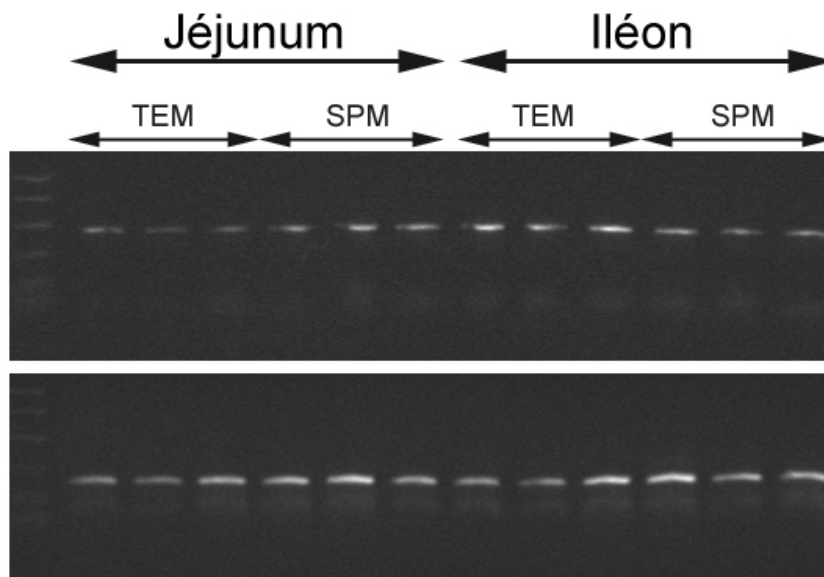


Figure III.2.5-3 : Expression des gènes codant pour la cathepsine D (panneau supérieur) et pour la déshydrogénase du glycéraldehyde-3-phosphate (panneau inférieur) dans le jéjunum et dans l'iléon de rats traités (SPM) ou non (TEM) à la spermine.

| | Rapport de la densité des bandes d'amplification des transcrits des gènes CATHD et GAPDH | |
|----------|--|--------------|
| | Jéjunum | Iléon |
| Témoin | 0,347 ± 0,80 | 0,854 ± 0,3 |
| Spermine | 0,437 ± 0,06 | 0,327 ± 0,06 |

Tableau III.2.5-1 : Rapport des densités des bandes d'amplification des transcrits des gènes codant pour la cathepsine D (CATHD) et la GAPDH présents dans le jéjunum et dans l'iléon de rats non sevrés âgés de 14 jours traités ou non à la spermine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart type (N=3).

Dans l'iléon, l'expression du gène codant pour la cathepsine D rapportée à l'expression du gène codant pour la GAPDH, est significativement réduite par l'ingestion de la spermine ($p = 0,006$). Ce n'est pas le cas dans le jéjunum (figure III.2.5-3, tableau III.2.5-1).

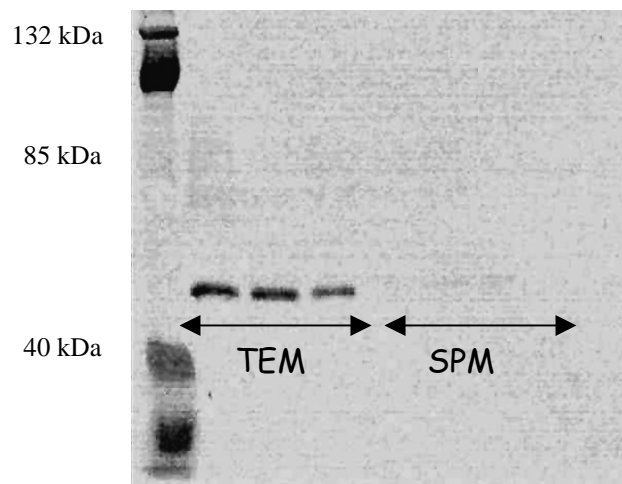


Figure III.2.5-4 : Immunodétection de la cathepsine D dans les protéines extraites de l'iléon de rats non sevrés témoins (TEM) ou traités à la spermine (SPM).

Deux formes de la cathepsine D sont mises en évidence par immunodétection au sein des protéines extraites des entérocytes de l'iléon (figure III.2.5-4). La première, de très faible intensité et de masse moléculaire voisine de 60 kDa, ne semble pas être affectée par le traitement. La deuxième, de masse moléculaire voisine de 50 kDa, disparaît presque totalement des échantillons provenant des animaux ayant ingéré la spermine.

Discussion

Dans l'iléon des animaux ayant ingéré la spermine, une diminution de l'activité et de la quantité de la cathepsine D ainsi qu'une réduction de l'expression du gène codant pour cette enzyme sont observées. Deux formes de la cathepsine D sont révélées par immunodétection. La forme dont la masse moléculaire est proche de 60 kDa correspond vraisemblablement à la pro-cathepsine D. La concentration de celle-ci est faible et aucune modification n'est visible à ce niveau suite à l'ingestion de spermine. A l'inverse, la forme de 48 kDa, n'est plus que très faiblement visible sur le gel contenant les protéines issues de l'intestin grêle des rats traités à la spermine contrairement à ce qui est observé dans le cas des animaux témoins. La disparition relative de cette forme de la protéine est corrélée à la diminution de l'activité observée dans les entérocytes de l'iléon suite au traitement des animaux à la spermine.

Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé lors de la maturation intestinale spontanée. En effet, pendant les deux premières semaines de vie après la naissance, l'activité de l'enzyme est particulièrement élevée dans l'iléon. Elle diminue brusquement au moment du sevrage pour atteindre les faibles valeurs de l'animal adulte (Davis & Messner, 1984). Cette observation coïncide avec la disparition des vacuoles supranucléaires de l'iléon (Veress & Baintner, 1970). Ces vacuoles sont de grands lysosomes caractéristiques des entérocytes de l'iléon dont ils refoulent le noyau à la base de la cellule.

L'activité de la cathepsine D et l'expression du gène codant pour l'enzyme ne sont pas modifiées dans les entérocytes isolés du jéjunum des animaux ayant ingéré la spermine. Le jéjunum ne contient pas de vacuoles supranucléaires et l'activité de la cathepsine D est faible dans cet organe même avant le sevrage des animaux (Ekström & Weström, 1991).

Les résultats décrits dans notre étude apportent un argument supplémentaire en faveur d'une identité entre la maturation intestinale postnatale naturelle et la maturation intestinale postnatale induite par l'ingestion de spermine.

A ce jour, aucun inhibiteur endogène de la cathepsine D n'a pu être mis en évidence dans les cellules de mammifère. La possibilité de moduler l'activité et la concentration de la cathepsine D ainsi que l'expression de cette enzyme par la spermine apporte des perspectives intéressantes concernant le contrôle de la progression tumorale, en particulier dans le cas du

cancer du sein. En effet, les cellules cancéreuses de ce type de tumeur surexpriment le gène codant la cathepsine D (Rochefort *et al.*, 1989). Par ailleurs, la concentration de cathepsine D présente dans les tissus cancéreux est corrélée à un mauvais décours de la maladie et au développement de métastases (Spyratos *et al.*, 1989 ; Thorpe *et al.*, 1989 ; Garcia *et al.*, 1990 ; Rochefort *et al.*, 1992 ; Ravdin, 1993 ; Liaudet *et al.*, 1994 ; Foekens *et al.*, 1999 ; Westley & May, 1999).

Ces considérations nous ont amenée à approfondir les résultats obtenus concernant les modifications survenant au niveau de la cathepsine D induites par la spermine. Des investigations ont ainsi été menées à partir d'une lignée cellulaire de tumeur mammaire surexprimant le gène de la cathepsine D, les cellules MCF-7. Cette étude ainsi que les résultats obtenus sont décrits dans le chapitre suivant de ce travail.

2.5 Modification de la cathepsine D dans les cellules MCF7

L'analyse protéomique, réalisée à partir d'entérocytes d'iléon de rats traités ou non par la spermine une fois par jour pendant trois jours, suggère que ce traitement provoque une modification de la quantité de cathepsine D présente dans ces cellules. Nous avons décrit dans le chapitre précédent l'action inhibitrice que possède l'ingestion de spermine sur l'expression du gène codant pour la cathepsine D et sur l'activité de cette enzyme présente dans des homogénats intestinaux.

Outre son implication dans la dégradation des protéines au sein des lysosomes, plusieurs rôles biologiques ont été attribués à la cathepsine D, certains n'étant pas liés à son activité protéolytique. Libérée dans le cytoplasme, la cathepsine D module l'apoptose cellulaire (Deiss *et al.*, 1996 ; Roberg & Ollinger 1998 ; Saftig *et al.*, 1998 ; Koike *et al.*, 2003). Elle dégrade la matrice extracellulaire et possède une activité mitogène vis-à-vis des fibroblastes (Laurent-Matha *et al.*, 2005). Elle est également impliquée dans les processus de néovascularisation (Berchem *et al.*, 2002) et de diffusion métastatique de cellules tumorales (Garcia *et al.*, 1990 ; Liaudet *et al.*, 1994).

La pro-cathepsine D, sécrétée par les cellules épithéliales mammaires cancéreuses, se lie vraisemblablement à la surface cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur non encore identifié à ce jour. Elle agit en tant que facteur mitogène pour les cellules épithéliales dont elle est issue, stimule la croissance des fibroblastes environnants de manière paracrine ainsi que l'angiogenèse par une action au niveau des cellules endothéliales (Liaudet-Coopman *et al.*, 2005 ; figure III.2.5-1).

La possibilité de moduler l'activité, la quantité de la cathepsine D et l'expression du gène codant pour cette enzyme par la spermine apporte des perspectives intéressantes concernant le contrôle de la progression tumorale en particulier dans le cas du cancer du sein. En effet, les cellules cancéreuses de ce type de tumeur surexpriment le gène codant pour la cathepsine D (Rocheffort *et al.*, 1989). Par ailleurs, la concentration de cathepsine D présente dans les tissus est corrélée à un mauvais décours de la maladie et au développement de métastases (Spyratos *et al.*, 1989 ; Thorpe *et al.*, 1989 ; Garcia *et al.*, 1990 ; Rocheffort *et al.*, 1992 ; Ravdin, 1993 ; Liaudet *et al.*, 1994 ; Foekens *et al.*, 1999 ; Westley & May, 1999).

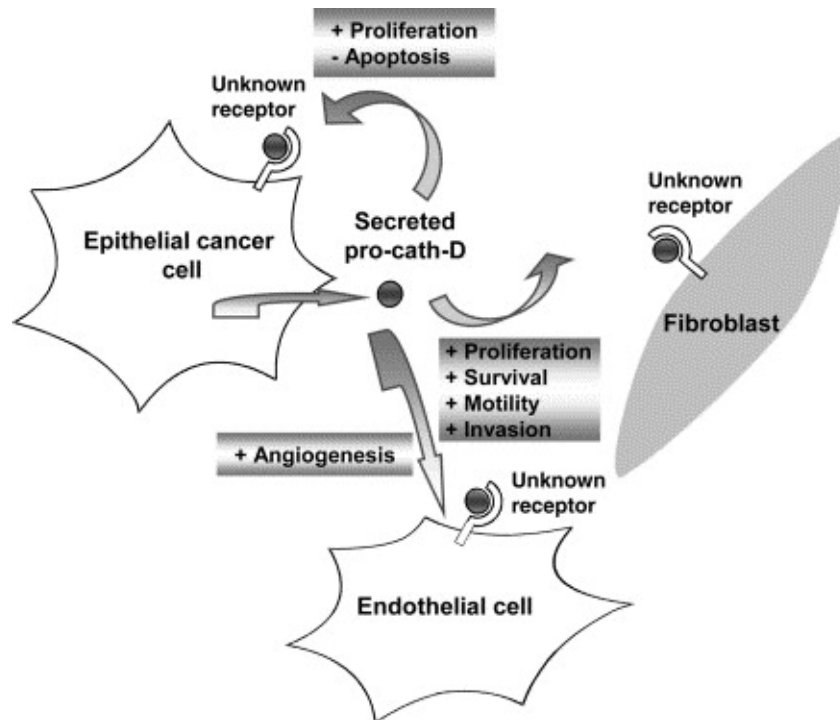


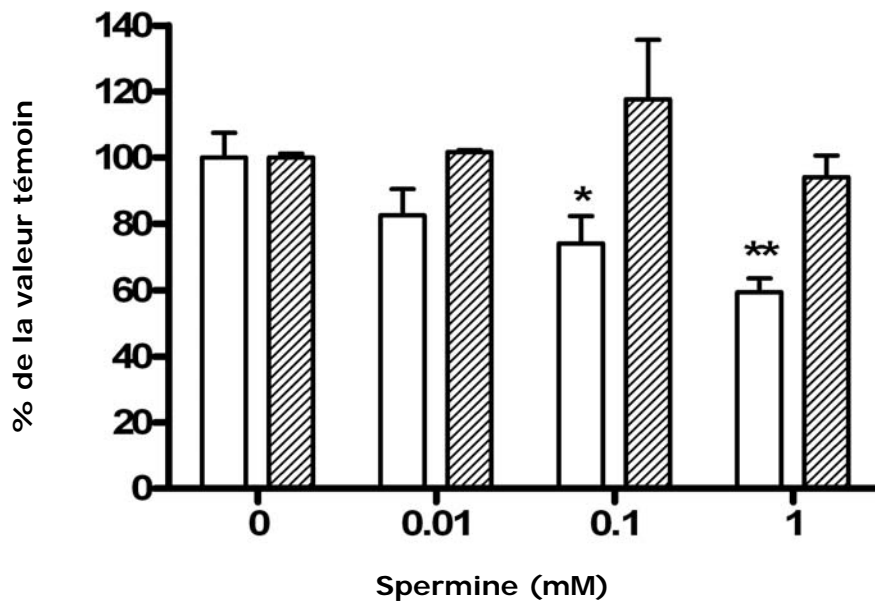
Figure III.2.5-1 : Rôles de la pro cathepsine D dans la progression tumorale. Explications dans le texte. D'après Liaudet-Coopman et al, 2005).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'hypersecretion de la pro-cathepsine D par les cellules tumorales telles une surexpression du gène codant pour l'enzyme (Arighi *et al.*, 2004), un déficit de synthèse du signal moléculaire « mannose-6-phosphate » (Isidoro *et al.*, 1997), requis pour l'adressage correct de la protéine, et l'absence du récepteur MPR300 (Byrd *et al.*, 1999). Récemment, Kokkonen ses collaborateurs (2004) ont montré qu'un défaut d'acidification des organelles intracellulaires avait pour conséquence la sécrétion anormale de pro-cathepsine D par les cellules MCF7.

Dans ce chapitre, nous avons testé, *in vitro*, l'effet de la spermine sur l'expression du gène codant pour la cathepsine D et sur l'activité de l'enzyme dans le cas des cellules MCF7, issues d'une lignée cellulaire provenant d'un adénocarcinome de sein humain. Dès la confluence, les cellules sont cultivées pendant trois jours en absence ou en présence de différentes concentrations de spermine.

Résultats

L'activité de la cathepsine D a été mesurée dans des extraits de cellules traitées ou non par la spermine ainsi que dans le milieu de culture. La figure III.2.5-2 montre une diminution significative de l'activité de l'enzyme dans les cellules mises en présence de spermine ($p = 0,015$ pour 0,1 mM ; $p = 0,008$ pour 1 mM). Cette diminution est d'autant plus grande que la concentration en spermine est élevée dans le milieu. Lorsque les cellules sont placées dans un milieu contenant 1 mM de spermine, l'activité de la cathepsine D est réduite à 60% de la valeur observée en l'absence de spermine. Dans le milieu, l'activité de l'enzyme n'apparaît pas affectée par le traitement. Il est intéressant de noter qu'en valeur absolue, l'absorbance mesurée dans les extraits des cellules mises en présence de 1 mM de spermine, rejoint celle observée dans le milieu de culture (figure III.2.5-3).



*Figure III.2.5-2 : Effet d'un traitement de trois jours à la spermine sur l'activité de la cathepsine D, mesurée à partir d'extraits de cellules MCF7 (histogrammes blancs) ou dans le milieu de culture (histogrammes hachurés). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle, c'est-à-dire de la valeur mesurée en absence de spermine. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ($N = 3$).*

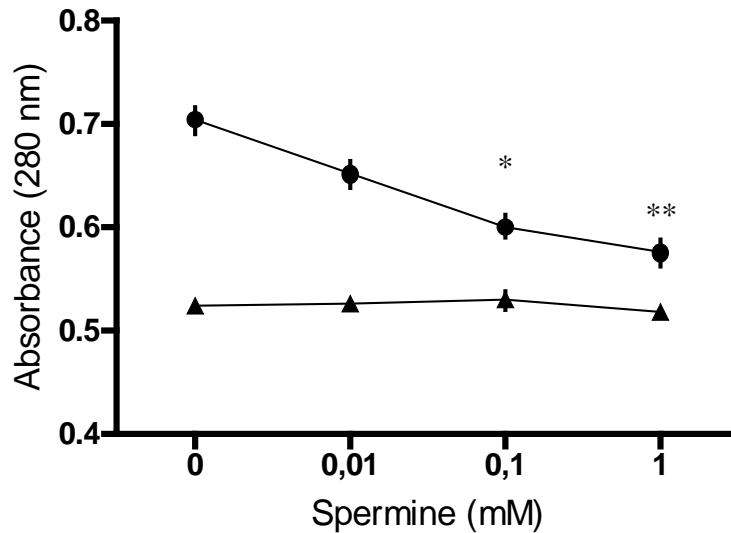


Figure III.2.5-3 : Effet d'un traitement de trois jours à la spermine sur l'activité de la cathepsine D mesurée à partir d'extraits de cellules MCF7 (cercles) ou dans le milieu de culture (triangles). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ($N = 3$).

La cathepsine D est mise en évidence dans les extraits de cellules MCF7 et dans le milieu de culture de celles-ci par immunodétection (figure III.2.5-4). Dans les cellules, trois bandes apparaissent, de masses moléculaires voisines de 54, 51 et 34 kDa. L'intensité de ces trois bandes diminue lorsque la concentration en spermine augmente (figure III.2.5-4.A). Dans le milieu de culture, deux bandes de masses moléculaires voisines de 54 et 51 kDa apparaissent. L'intensité de ces bandes n'est pas modifiée en présence de spermine (figure III.2.5-4.B).

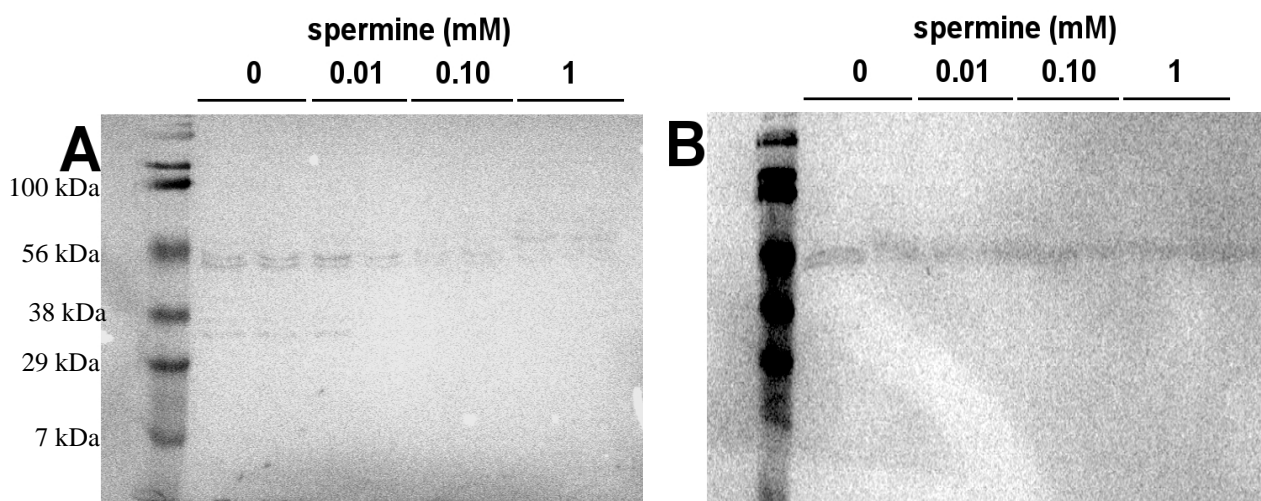
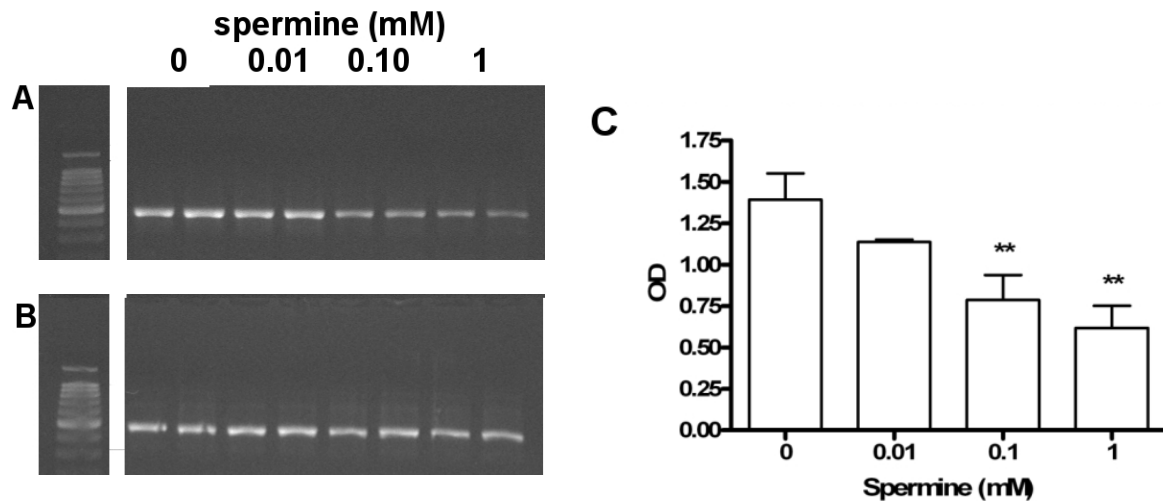


Figure III.2.5-4 : Immunodétection de la cathepsine D dans les cellules MCF7 (A) et dans le milieu de culture cellulaire (B).

L'analyse par RT-PCR de l'expression du gène codant pour la cathepsine D (figure III.2.5-5.A), comparée à celle du gène codant pour la β -actine (figure III.2.5-5.B), révèle une diminution de la quantité d'ARNm codant pour la cathepsine D, présente dans les cellules (figure III.2.5-5.C). Cette diminution est proportionnelle à la concentration en spermine utilisée lors du traitement.



*Figure III.2.5-5 : Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes codant pour la cathepsine D (A) et la β -actine (B) contenues dans les cellules MCF7 cultivées en présence ou en absence de spermine dans le milieu de culture pendant trois jours dès la confluence. L'histogramme (C) indique les modifications du rapport CathD ARNm/ β -actine ARNm. OD : optical density). ** $p < 0,01$ ($N = 3$).*

Afin de vérifier que les modifications observées ne sont pas dues à une altération cellulaire, résultant de la présence de spermine dans le milieu de culture, deux tests de viabilité cellulaire ont été réalisés.

La réduction, par les déshydrogénases cellulaires, d'un substrat spécifique, le MTS, produit du formazan qui est soluble dans le milieu de culture. L'absorbance du formazan à 540 nm est proportionnel au nombre de cellules métaboliquement actives (test au MTT). Cette absorbance n'est pas modifiée quelle que soit la concentration en spermine présente dans le milieu de culture (figure III.2.5-6). Ce résultat est confirmé par l'observation, au microscope à fluorescence, des cellules mises en présence d'un mélange de bromure d'éthidium et d'acridine orange (figure III.2.5-7).

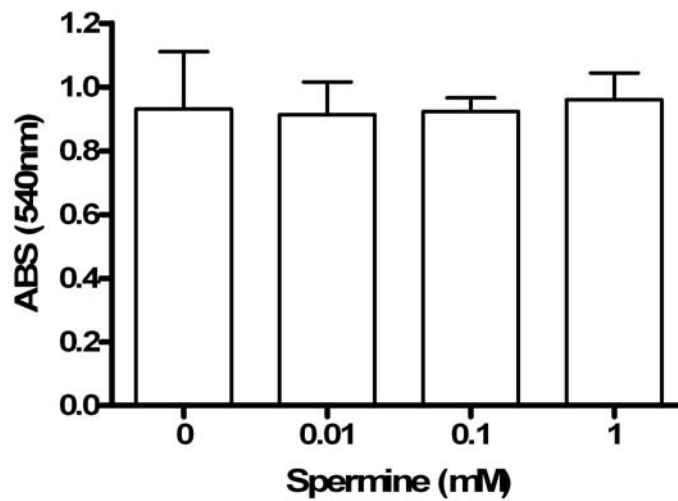


Figure III.2.5-6 : Test de viabilité cellulaire (MTT) réalisé sur les cellules MCF-7 cultivées pendant trois jours, dès la confluence, en présence ou en absence de spermine dans le milieu de culture. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type (N=3).

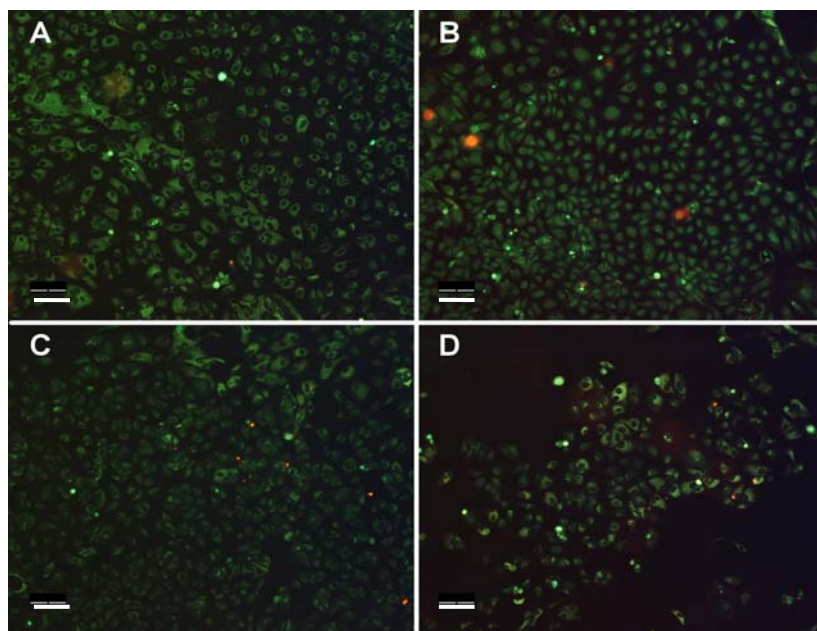


Figure III.2.5-7 : Test d'exclusion d'un marqueur fluorescent appliqué à une monocouche de cellules MCF7 arrivées à confluence, cultivées en absence de spermine (A) ou en présence de 0,01 mM (B) 0,1 mM (C) ou 1 mM de cette polyamine (D). La barre représente 100 μ m.

Discussion

Nos résultats indiquent que l'expression du gène codant pour la cathepsine D, ainsi que la quantité et l'activité de cette enzyme sont réduites dans les cellules MCF-7 traitées à la spermine. Les tests de viabilité réalisés suggèrent que ces modifications ne sont pas le reflet d'une altération cellulaire.

La transcription du gène codant pour la cathepsine D est dépendante des oestrogènes (Morisset *et al.*, 1986 ; Cavailles *et al.*, 1993). Par ailleurs, la régulation de la croissance cellulaire par les oestrogènes est liée aux polyamines (Manni & Wright, 1984). En effet, en présence de DFMO, les oestrogènes n'exercent plus leur effet stimulant sur la croissance des cellules (Lima & Shiu, 1985). Les éléments de réponse aux oestrogènes (*estrogen responsive element*, ERE), qui régulent l'expression du gène codant pour la cathepsine D, lient des complexes formés de récepteurs aux oestrogènes (*estrogen receptor*, ER) et d'oestrogènes. Thomas *et al.* (1995) ont montré que les polyamines stimulent la liaison ER-ERE de manière dose-dépendante. Cependant, en grande concentrations, les polyamines inhibent la liaison des complexes de récepteurs aux ERE. La spermine inhibe la formation de complexes ER-ERE et la liaison des oestrogènes sur leurs récepteurs avec un IC50 de 3 mM et de >0,1 mM respectivement (Lu *et al.*, 1998). Dans le cas de la cathepsine D, la dimérisation des récepteurs aux oestrogènes est nécessaire afin de permettre leur interaction avec les ERE (Schwartz & Skafar, 1993). Les polyamines pourraient donc agir à ce niveau en empêchant la dimérisation des ER. Ce phénomène aurait pour conséquence la diminution de l'expression du gène codant pour la cathepsine D. L'action inhibitrice des polyamines sur des interactions entre protéines a déjà été mise en évidence à plusieurs reprises. Elle concerne les histones et l'ubiquitine (Gugliucci & Menini, 2003), des protéines interagissant avec le récepteur aux glucocorticoïdes (*glucocorticoid receptor interacting protein*, GRIP) et le facteur nucléaire des hépatocytes 4 (*hepatocyte nuclear factor*, HNF4) (Maeda *et al.*, 2002).

Des thérapies anti-cancéreuses utilisées à l'heure actuelle font intervenir des inhibiteurs du métabolisme des polyamines, tels le DFMO, un inhibiteur spécifique de l'ODC, ou la SAM486A, inhibiteur de la SamDC. Ces inhibiteurs de la synthèse intracellulaire des polyamines freinent la prolifération des cellules cancéreuses. L'inhibition de l'ODC par le DFMO réduit le développement de métastases à partir de xénogreffes de tumeurs mammaires

(Manni *et al.*, 2002) ainsi que l'invasion locale de la tumeur primaire chez des souris implantées avec des cellules mammaires cancéreuses (Manni *et al.*, 2005). Ces informations semblent en contradiction avec notre hypothèse puisque que la spermine diminue l'activité de la cathepsine D, une enzyme impliquée dans la progression de cancers et identifiée en tant que marqueur de tumeur mammaire (Rodriguez *et al.*, 2005 ; Riley *et al.*, 2000). Cependant, il est important de noter que le DFMO, bien qu'il réduise effectivement les concentrations de spermidine et de putrescine au sein des tumeurs, n'affecte pas la concentration intracellulaire de spermine (Manni *et al.*, 2005).

Un argument supplémentaire en faveur d'un rôle éventuellement protecteur de la spermine dans le cadre de la prolifération tumorale est mis en évidence dans le cas du cancer de la prostate. La concentration en spermine est normalement élevée dans cet organe et est corrélée à un statut prolifératif limité et à une différenciation des cellules. Elle diminue lors de la transformation maligne du tissu. Cette diminution est plus importante lorsque la tumeur est accompagnée de métastases (Schipper *et al.*, 2003). Par ailleurs, la spermine inhibe l'expansion de cellules de carcinome de prostate *in vitro* et prévient l'expansion subcutanée de cette tumeur *in vivo* (Smith *et al.*, 1995).

Ces informations suggèrent que le rapport des concentrations spermine/putrescine est peut-être important à considérer lorsqu'il s'agit de réduire la progression cancéreuse. Mesuré dans le sang de patients atteints de cancer, ce rapport est augmenté dans les tumeurs (Stabellini *et al.*, 2003). Le rapport des concentrations spermine/spermidine est semblable dans les tissus mammaires normaux et cancéreux. Par ailleurs, seule l'augmentation de la concentration en putrescine, et non celle de spermidine ou de spermine, est corrélée à un risque accru de récurrence du cancer du sein et à son issue létale (Cañizares *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données pourraient nous amener à reconsidérer la position des polyamines dans le traitement de cancer.

3. EFFETS PRECOCES DE LA PRISE ORALE DE SPERMINE

Une importante desquamation de l'épithélium intestinal, principalement dans l'iléon, peut faire suite à une ingestion de spermine par le rat non sevré (Kaouass *et al.*, 1996). Ce phénomène précède les modifications morphologiques caractérisant la maturation intestinale induite par cette polyamine (figure III.3.1). La perte de cellules épithéliales s'accompagne d'une apoptose (Peulen *et al.*, 1998b ; Peulen *et al.*, 1999 ; Peulen *et al.* 2001a) et de l'activation de métallo-protéases (Peulen *et al.*, 2001a).

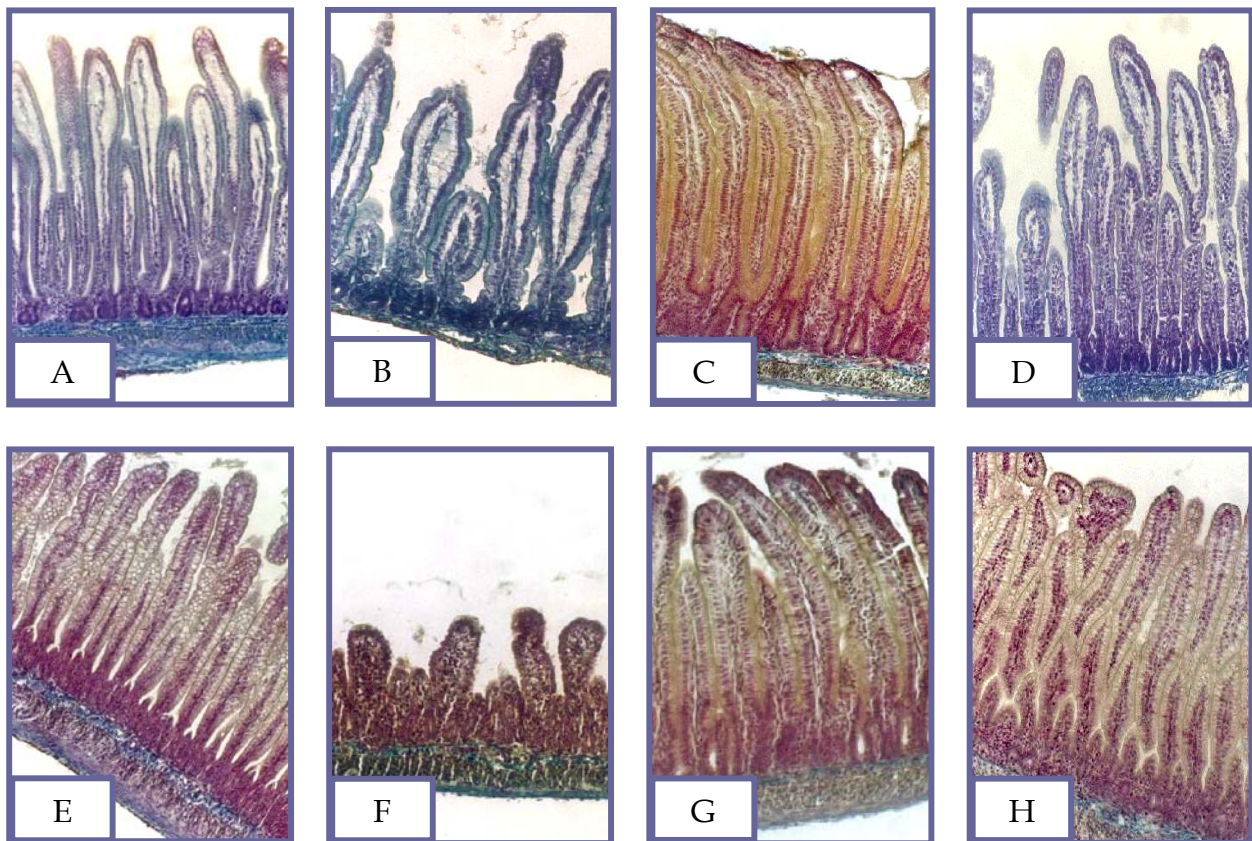


Figure III.3.1 : Microphotographies (200x) de la muqueuse jéjunale (A) et iléale (E) du rat non sevré âgé de 11 jours. Huit heures après l'administration de spermine, on observe un gonflement important des villosités dans le jéjunum (B) et une diminution de la hauteur de celles-ci dans l'iléon (F). Après trois jours de traitement, les villosités sont reconstituées dans le jéjunum (C) et dans l'iléon (G). La muqueuse prend l'aspect de celle observée chez l'animal sevré dans le cas des rats ayant ingéré la spermine tandis qu'elle conserve son aspect initial dans le cas des animaux « contrôles », âgés de 14 jours, tant dans le jéjunum (D) que dans l'iléon (H).

Au cours des premières heures qui suivent son ingestion, la spermine induit une augmentation de la concentration plasmatique en corticostérone, en ACTH, en IL1- β , en IL2, en IL6 et en TNF- α (Kaouass *et al.*, 1997b ; Peulen & Dandrifosse, 2004). La concentration plasmatique maximale, en ce qui concerne l'IL1- β et l'IL6, apparaît quatre heures après l'administration de spermine. Elle se situe au moment où les concentrations maximales en ACTH et en corticostérone sont détectées après le traitement (Kaouass *et al.*, 1994b). Au même moment, la concentration en intracellulaire des entérocytes en spermine, ainsi que celle de la muqueuse intestinale, augmente sur l'ensemble de l'axe crypto-villositaire (Wéry & Dandrifosse, 1993 ; Wéry *et al.*, 1996a).

Dans ce chapitre, nous utilisons les méthodes employées lors de l'analyse de la maturation intestinale induite par ingestion de spermine, une fois par jour pendant trois jours, par des rats non sevrés (voir chapitre III.2-2). Notre objectif consiste en l'identification de protéines pouvant être liées à la phase de desquamation initialement observée lors de l'ingestion spermine et/ou associées aux événements précoces de la maturation intestinale induite par cette polyamine.

3.1 Caractérisation de la muqueuse intestinale

L'examen du contenu cellulaire de la lumière intestinale et la mise en évidence des entérocytes qui y sont présents, permet d'estimer l'importance de la desquamation de la muqueuse intestinale soumise à l'action de la spermine. La mesure d'autres paramètres, tels les activités spécifiques de disaccharidases et de la phosphatase alcaline des cellules de l'épithélium, complètent ces informations. Ces données permettent de caractériser les événements survenant au niveau de la muqueuse intestinale et de cibler préférentiellement la durée du traitement avant de procéder aux investigations concernant l'analyse des protéines.

Observation du contenu cellulaire de l'intestin

L'intensité de la desquamation, qui touche les villosités, est estimée par l'observation du contenu cellulaire de la lumière intestinale et la mise en évidence des entérocytes présents le chyme au moyen d'un substrat chromogène de la phosphatase alcaline (figure III.3.2).

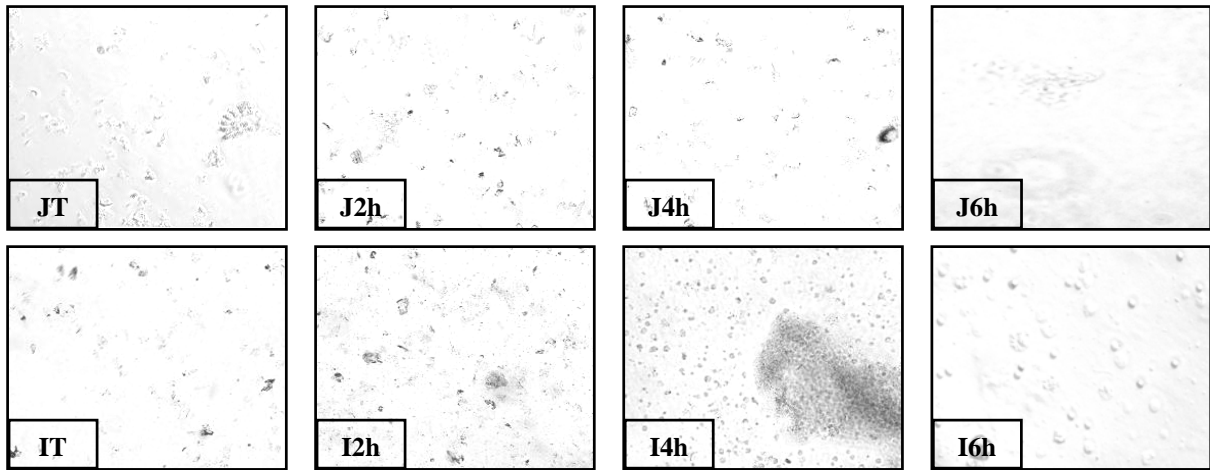


Figure III.3.2 : Observation en microscopie optique (objectif 20x) du matériel cellulaire contenu dans la lumière intestinale du jéjunum (J, en haut) et de l'iléon (I, en bas) d'un animal témoin (JT-IT) ou d'un animal ayant ingéré de la spermine depuis deux heures (J2h-I2h), quatre heures (J4h-I4h) ou six heures (J6h-I6h). L'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules a été mise en évidence au moyen de Fast Red Tablet.

Tant dans le jéjunum que dans l'iléon du raton témoin, très peu d'entérocytes sont présents dans le contenu intestinal. Il en est de même deux heures après l'ingestion de spermine. Quatre heures après l'ingestion de spermine, la desquamation cellulaire est importante, particulièrement au niveau de l'iléon dans la lumière duquel une grande quantité d'entérocytes est mise en évidence. Le jéjunum, à l'inverse, ne semble pas affecté. Six heures après l'ingestion de spermine, la quantité de cellules desquamées présente dans la lumière intestinale est très faible. Elle est comparable à ce qui est observé chez les animaux témoins dix-huit heures après l'ingestion de cette polyamine (résultats non présentés).

Pour nos recherches ultérieures, nous avons choisi de cibler deux moments précis faisant suite au traitement, à savoir six heures et dix-huit heures après l'ingestion de spermine. En effet, (1) l'analyse protéomique requiert un matériel de départ relativement abondant et pur, (2) l'importance de la desquamation observée quatre heures après l'ingestion de spermine constitue un frein technique à la récolte des cellules épithéliales et aux investigations souhaitées, (3) Kaouass et ses collaborateurs (1996) ont, montré que, 24 heures après le traitement, l'épithélium est déjà en cours de maturation.

Dosage d'activités disaccharidasiques

Dans le jéjunum, aucune modification significative de l'activité spécifique de la lactase n'est mise en évidence suite à l'ingestion de spermine (figure III.3.3).

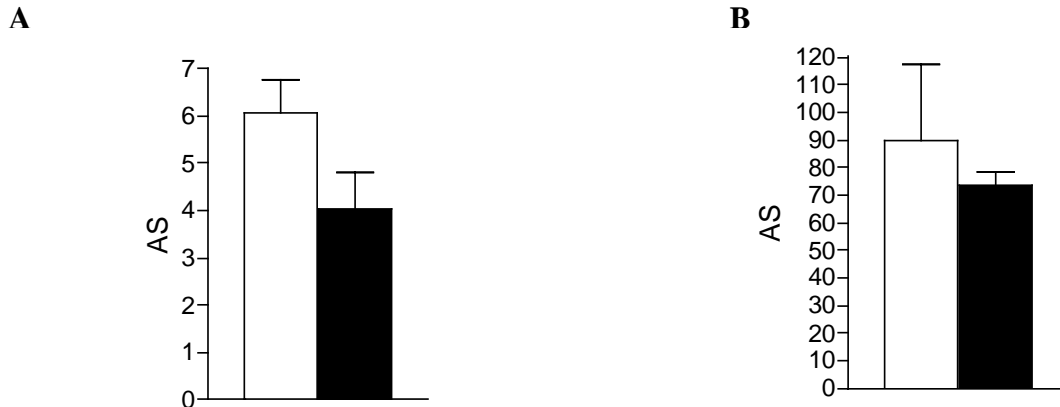
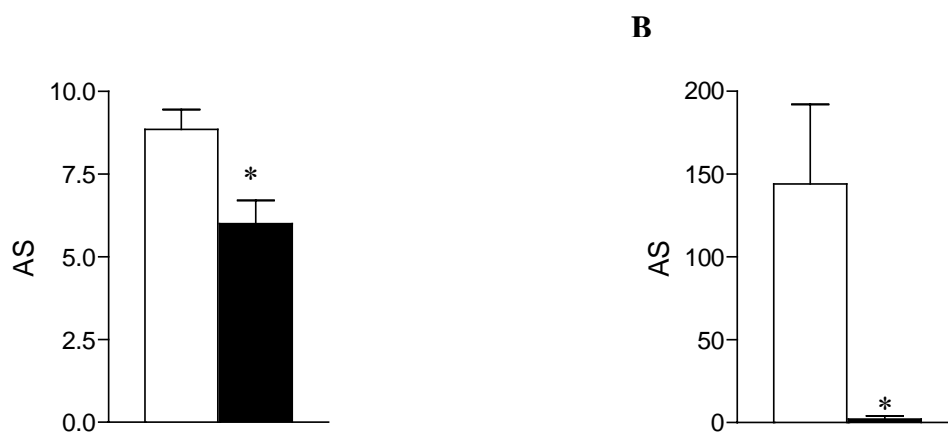


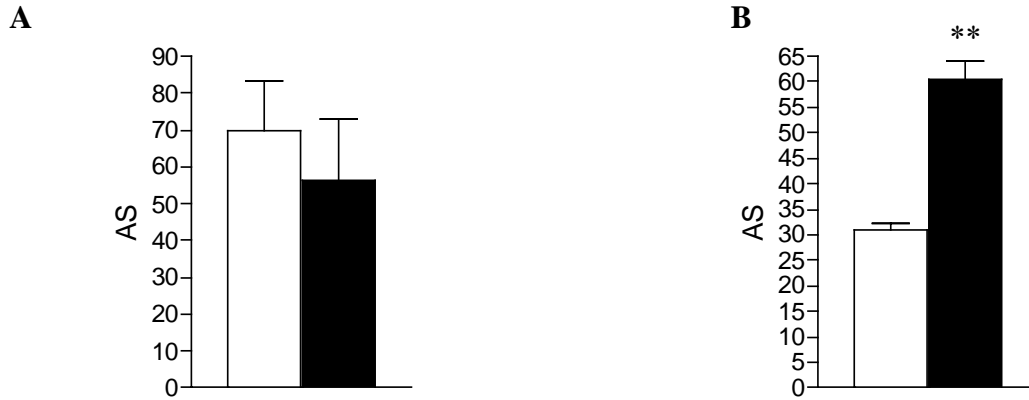
Figure III.3.3 : Effet de l'ingestion de spermine sur l'activité spécifique de la lactase dans des homogénats de jéjunum. Les rats sont sacrifiés 6 heures (A) ou 18 heures (B) après l'ingestion de spermine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type, N=3. Histogrammes blancs = animaux témoins ; histogrammes noirs = animaux traités

La desquamation cellulaire est illustrée, au niveau biochimique, par une diminution de l'activité spécifique de la lactase dans l'iléon, six heures après l'ingestion de spermine (figure III.3.4.A). Dix-huit heures après le traitement, alors qu'il n'y a plus de desquamation, l'activité de la lactase reste réduite dans l'iléon (figure III.3.4.B).

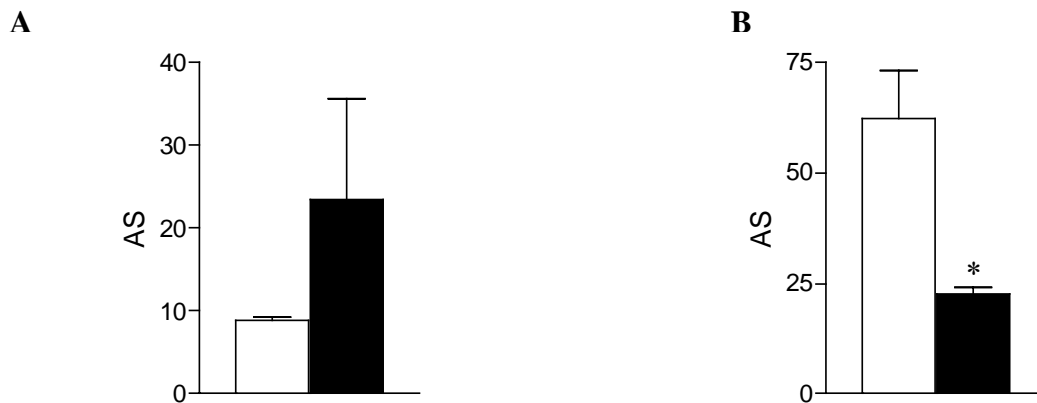


*Figure III.3.4 : Effet de l'ingestion de spermine sur l'activité spécifique de la lactase dans des homogénats d'iléon. Les rats sont sacrifiés 6 heures (A) ou 18 heures (B) après l'ingestion de spermine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0,05$; N=3. Histogrammes blancs = animaux témoins ; histogrammes noirs = animaux traités*

L'activité spécifique de la maltase n'est modifiée ni dans le jéjunum ni dans l'iléon six heures après l'ingestion de spermine (figure III.3.5.A et III.3.6.A). Dix-huit heures après cette ingestion, l'activité spécifique de la maltase augmente de manière significative dans le jéjunum tandis qu'elle est réduite dans l'iléon (figure III.3.5.B et III.3.6.B).



*Figure III.3.5 : Effet de l'ingestion de spermine sur l'activité spécifique de la maltase dans des homogénats de jéjunum. Les rats sont sacrifiés 6 heures (A) ou 18 heures (B) après l'ingestion de spermine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type. ** $p < 0,01$; $N=3$. Histogrammes blancs = animaux témoins ; histogrammes noirs = animaux traités*

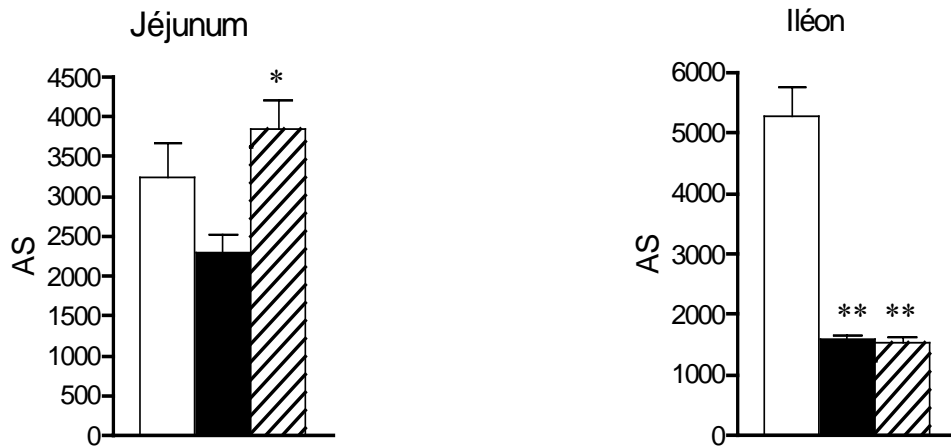


*Figure III.3.6 : Effet de l'ingestion de spermine sur l'activité spécifique de la maltase dans des homogénats d'iléon. Les rats sont sacrifiés 6 heures (A) ou 18 heures (B) après l'ingestion de spermine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0,05$; $N=3$. Histogrammes blancs = animaux témoins ; histogrammes noirs = animaux traités*

Aussi bien dans les homogénats provenant de rats témoins que d'animaux ayant ingéré la spermine, aucune activité de la sucrase n'est détectée (résultats non présentés).

Analyse de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline

L'activité spécifique de la phosphatase alcaline n'est pas modifiée dans le jéjunum six heures et dix-huit heures après l'ingestion de spermine par comparaison aux valeurs observées chez l'animal témoin. Cependant, une augmentation de l'activité spécifique de l'enzyme est mise en évidence entre six heures et dix-huit heures après l'ingestion de spermine (figure III.3.7).



*Figure III.3.7 : Effet de l'ingestion de spermine sur l'activité spécifique de la phosphatase alcaline contenue dans des homogénats de jéjunum et d'iléon. Les rats sont sacrifiés 6 heures (histogrammes noirs) ou 18 heures (histogrammes hachurés) après l'ingestion de spermine. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0,05$ par comparaison à l'animal traité ayant ingéré la spermine depuis 6 heures. ** $p < 0,01$ par comparaison aux animaux témoins ; $N = 3$.*

Dans l'iléon, l'activité spécifique de l'enzyme est diminuée six heures après l'ingestion de spermine. Cette diminution est toujours observée dix-huit heures après ce traitement.

L'activité de la phosphatase alcaline a aussi été mise en évidence par zymographie. Cette technique permet de distinguer, sur un gel d'électrophorèse, les différentes isoformes de l'enzyme.

Dans le jéjunum, trois isoformes de l'enzyme sont mises en évidence. Six heures après l'ingestion de spermine, elles n'apparaissent pas modifiées par le traitement (figure III.3.8.A). Par contre, dix-huit heures après le traitement, les trois isoformes montrent une coloration plus intense, témoignant de l'augmentation de l'activité de l'enzyme (figure III.3.8.C).

Dans l'iléon, la zymographie révèle la présence de deux isoformes de l'enzyme dans les homogénats provenant de rats témoins. Ces deux isoformes apparaissent avec une intensité plus faible dans les homogénats d'iléon d'animaux ayant ingéré la spermine depuis six heures (figure III.3.8.B). Dix-huit heures après la prise orale de cette polyamine, d'autres isoformes de l'enzyme sont mises en évidence par zymographie dans les homogénats d'iléon (figure III.3.8.D).

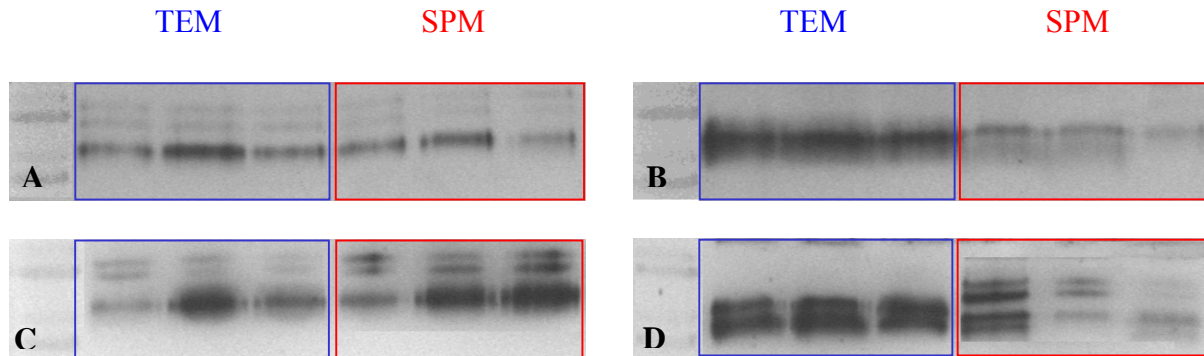


Figure III.3.8 : Révélation par zymographie non réductrice de l'activité de la phosphatase alcaline dans des homogénats de jéjunum (A, C) et d'iléon (B, D) de rats non sevrés. Les rats sont sacrifiés 6 heures (A, B) ou 18 heures (C, D) après l'ingestion de spermine. TEM= témoin ; SPM = spermine

Conclusion

L'observation des cellules contenues dans la lumière intestinale et le dosage d'activités enzymatiques spécifiques caractérisant les entérocytes du jéjunum ou de l'iléon permettent de décrire les événements survenant dans la muqueuse intestinale suite à l'ingestion de spermine par le rat non sevré.

Les diminutions d'activités enzymatiques spécifiques observées dans l'iléon (lactase et phosphatase alcaline) six heures après le traitement, peuvent résulter d'une diminution de la quantité de ces enzymes, présente dans les entérocytes. Elles peuvent également être la conséquence d'une réduction du nombre d'entérocytes présents dans la muqueuse intestinale, comme c'est le cas lors d'un phénomène de desquamation. Compte tenu des observations réalisées au microscope, cette dernière hypothèse a été retenue pour la suite de notre travail. Elle est en accord avec les travaux réalisés par Kaouass et ses collaborateurs (1996).

Dix-huit heures après le traitement, l'activité spécifique de la maltase a augmenté significativement dans le jéjunum. Par contre, les activités spécifiques de la lactase et de la phosphatase alcaline ne sont pas modifiées. Cependant, il faut noter qu'une augmentation d'activité spécifique de la phosphatase alcaline est constatée entre 6 heures et 18 heures de traitement. Cette augmentation pourrait être la conséquence d'une régénération cellulaire ayant lieu après la desquamation.

En ce qui concerne l'iléon, l'activité spécifique de la phosphatase alcaline est diminuée de manière significative tant 6 heures que 18 heures après l'ingestion de spermine. Les zymographies réalisées révèlent deux isoformes de la phosphatase alcaline chez les animaux témoins et ayant ingéré la spermine depuis 6 heures et trois isoformes chez les animaux traités depuis 18 heures. Une diminution significative de l'activité de la lactase et de la maltase est également observée après le traitement.

La diminution de l'activité de la lactase observée dans l'iléon ainsi que l'augmentation de l'activité de la maltase observée dans le jéjunum, surviennent également lors du sevrage (Cummins *et al.*, 1988). L'apparition de trois isoformes de la phosphatase alcaline dans l'iléon correspond à ce qui est observé lorsque la maturation intestinale est induite par l'ingestion de spermine, trois jours après le traitement (Peulen *et al.*, 2004). Ce dernier événement est actuellement le premier indicateur de l'apparition de la maturation de l'iléon induite par la spermine.

Il est intéressant de remarquer que, dans nos observations, tous les paramètres pouvant témoigner d'une maturation ne semblent pas évoluer de manière parallèle. Il ne semble pas y avoir de synchronisme entre les événements survenant dans le jéjunum et ceux qui se déroulent dans l'iléon. Par exemple, suite au traitement, l'activité spécifique de la lactase diminue dans l'iléon alors qu'elle n'est pas modifiée dans le jéjunum. Ceci peut être dû au fait que les entérocytes de l'iléon et du jéjunum présentent des différences de fonction et de structure (Baintner & Veress, 1967).

De plus, dans une même partie de l'intestin les événements traduisant une maturation, n'apparaissent pas simultanément. Par exemple, 18 heures après le traitement, l'activité spécifique de la maltase augmente dans le jéjunum alors que l'activité spécifique de la lactase et l'activité spécifique de la phosphatase alcaline ne sont pas modifiées. Pourtant, lors de la maturation intestinale spontanée, l'activité de la lactase diminue et l'activité de la phosphatase

alcaline augmentent dans le jéjunum. Il en est de même chez des animaux soumis à un traitement à la spermine pendant trois jours (Dufour *et al.*, 1988; Peulen *et al.*, 2004). Ceci peut être expliqué en admettant que tous ces paramètres ne sont pas régulés de la même façon (Kaouass *et al.*, 1994 et Deloyer *et al.*, 2005). Par exemple, Kaouass et ses collaborateurs (1994) ont montré que l'augmentation de l'activité spécifique de la sucrase et de la maltase, provoquée par l'ingestion de spermine, est de moindre importance chez les animaux ayant subi une ablation des glandes surrénales et traités par la spermine tandis que la diminution de l'activité spécifique de la lactase n'est pas modifiée par cette opération. On sait, par ailleurs que l'action de la spermine est réversible (Georges *et al.*, 1990) bien que la maturation intestinale obtenue après trois jours de traitement à l'aide de cette polyamine soit parfaitement identique à la maturation intestinale naturelle (Peulen *et al.*, 1998). Cette réversibilité de la maturation induite par l'administration orale de spermine aux rats non sevrés ne concerne pas tous les paramètres intestinaux. En effet, tandis que les activités enzymatiques spécifiques de la maltase et de la sucrase retournent aux valeurs observées dans l'intestin immature, celle de la lactase reste basse jusqu'au sevrage (Deloyer *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus suite aux dosages d'activités enzymatiques suggèrent donc que, 6h après l'ingestion de spermine, l'épithélium intestinal est dans une phase de desquamation. Par contre, 18h après le traitement, la maturation de la muqueuse intestinale induite par la spermine est clairement engagée comme le suggèrent, notamment, les résultats obtenus par zymographie.

3.2 Analyse protéomique

Les modifications survenant au niveau des protéines dans les entérocytes suite à l'ingestion de spermine par le rat non sevré sont mises en évidence par une migration des protéines contenues dans ces cellules en une seule dimension sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS (SDS-PAGE).

La sélection des « bandes » d'intérêt s'opère dans ce cas à partir d'une analyse densitométrique réalisée à l'aide du programme informatique *QuantityOne* (BioRad). Les « bandes » sélectionnées présentent une différence d'intensité particulièrement élevée entre les échantillons provenant, d'une part, d'animaux témoins et, d'autre part, d'animaux traités par la spermine.

L'identification des protéines, présentes dans les « bandes » sélectionnées, est obtenue grâce à la séparation et à l'analyse de leurs fragments peptidiques, obtenus par digestion enzymatique, en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (1D-nanoLC-MS/MS). Un programme informatique, le logiciel *Mascot* (Matrix Sciences Inc.) permet de comparer les spectres de fragmentation obtenus lors de l'analyse en spectrométrie de masse à ceux théoriquement obtenus pour une protéine donnée.

Plusieurs protéines d'intérêt ont pu être identifiées par spectrométrie de masse. Seules les protéines présentes dans les entérocytes des animaux témoins et absentes dans les entérocytes des animaux traités à la spermine, ou inversement, ont été prises en compte (tableau III.3.1).

| Mises en évidence chez l'animal témoin | Identité de la protéine | Nomenclature |
|--|---|----------------|
| | 6 heures après l'ingestion de spermine | |
| | Lamine B1 | P70615 |
| | Sulfide:quinone oxydoréductase | E.C.: 1.6.5.2 |
| | Ubiquinol cytochrome c réductase | E.C.: 1.10.2.2 |
| | SWI 3/SNF (<i>switch/sucrose nonfermenting, member 3</i>) | Q6PCN7 |
| | <i>Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2</i> | Q9QYP2 |
| 18 heures après l'ingestion de spermine | | |
| | Hydratase du fumarate | E.C.: 4.2.1.2 |
| | Aminotransférase de l'ornithine | P04182 |
| Mises en évidence chez l'animal traité | Identité de la protéine | Nomenclature |
| | 6 heures après l'ingestion de spermine | |
| | Protéine ribosomiale S16 | P62250 |
| 18 heures après l'ingestion de spermine | | |
| | Cytokératine 19 | Q63279 |
| | Facteur d'élongation 1- α | P62630 |
| | N-myc | Q63379 |

Tableau III.3.1 : Protéines identifiées par l'analyse en spectrométrie de masse des peptides contenus dans les « bandes » de protéines sélectionnées sur les gels d'électrophorèse. La nomenclature utilisée est celle proposée par les bases de données Swiss-Prot/TrEMBL ou provient de l' « Enzyme Commission » dans le cas des enzymes.

La lamine B1 appartient à la famille des filaments intermédiaires. Cette protéine forme une structure fibreuse, la lamina nucléaire, associée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Son récepteur, le LBR, est une protéine intégrée à la membrane nucléaire interne. La lamine B1 peut interagir avec des protéines de type HP1 de l'hétérochromatine (voir plus loin) ainsi qu'avec certaines régions de la chromatine. Cette propriété particulière lui permet de jouer un rôle dans l'assemblage et le désassemblage de la chromatine, notamment au cours de la mitose (Kasbekar, 1999). Pendant l'interphase, les lamines sont déphosphorylées et forment des filaments tétramériques. Au début de la mitose, les lamines sont hyperphosphorylées et les tétramères se dissocient, permettant la rupture de la membrane nucléaire. Lors de la télophase, les lamines sont déphosphorylées et la lamina nucléaire se reforme (Appelbaum *et al.*, 1990).

Les protéines HP1 sont indispensables à la formation d'hétérochromatine et jouent un rôle important dans la « variégation » par effet de position. Ce phénomène peut être décrit comme suit : des gènes, habituellement localisés dans l'euchromatine active, sont placés, à la suite d'un réarrangement chromosomique, à proximité d'une région centromérique (hétérochromatique). La chromatine nouvellement déplacée a ses gènes réprimés, devient plus compacte et commence à s'associer avec des protéines HP1, habituellement confinées aux centromères.

Blobel (1985) a suggéré que le contexte nucléaire dans lequel les gènes opèrent est critique pour l'expression de ces derniers. Si le LBR influence ce contexte en modifiant le nombre de contacts entre les protéines HP1 et la membrane nucléaire, il est concevable que cela puisse affecter l'expression de gènes susceptibles à la variégation par effet de position.

La lamine B1 est impliquée dans certains mécanismes de différenciation cellulaire (Billi *et al.*, 1991). En effet, l'induction de la différenciation de cellules érythroïdes en culture par de l'hexaméthylène bis-acétamide (HMBA) passe par une phosphorylation précoce de la lamine B1, ce qui permet à des facteurs de transcription d'atteindre le noyau.

Par ailleurs, on sait que la spermine est impliquée dans la régulation de la phosphorylation de protéines. Par exemple, à concentration physiologique, elle protège la PKC de l'inactivation en réduisant l'insertion de cette enzyme dans la partie hydrophobe interne de la membrane (Monti *et al.*, 1994). La spermine pourrait donc agir sur le degré de phosphorylation de la

lamine B1 et réguler l'accès de facteurs de transcription au noyau, interférant ainsi avec la transcription de gènes codant pour d'autres protéines.

SWI/SNF est un complexe protéique impliqué dans le remodelage de la chromatine. L'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription ainsi qu'aux complexes initiateurs est un élément essentiel dans l'activation de la transcription. Les éléments architecturaux de la chromatine limitant cet accès, un remodelage de la chromatine est nécessaire pour l'activation de la transcription. Le terme remodelage définit tous les événements qui altèrent la sensibilité aux nucléases d'une région de la chromatine (Aalfs & Kingston, 2000). Ce remodelage nécessite ou non une source d'énergie (ATP), et peut impliquer des modifications post-traductionnelles des histones. Les événements aboutissant au remodelage sont variables selon les promoteurs. De façon générale, l'activation de la transcription implique la fixation d'un facteur de transcription qui recrute le complexe de remodelage. La machinerie transcriptionnelle en phase d'élongation contient une activité acétyltransférase d'histones; elle pourrait donc, elle aussi, participer au remodelage (Cho *et al.*, 1998 ; Orphanides & Reinberg, 2000). A l'heure actuelle, une dizaine de complexes, regroupés en deux grandes familles, est impliquée dans le remodelage dépendant de l'ATP. Une de ces familles est basée sur les protéines SWI/SNF (Aalfs & Kingston, 2000).

En cas de mutations au niveau des gènes codant pour des protéines du complexe SWI/SNF, on observe une déficience au niveau de la transcription de certains gènes, révélant l'importance de ces protéines dans ce phénomène. Chez la levure, l'expression du gène de la sucrase (SUC2) est dépendante de l'expression des gènes de la famille SWI/SNF (Hirschhorn *et al.*, 1992). Un autre complexe protéique, le Ada3p/Ada2p/GCN5p, est également requis pour l'expression du gène SUC2. Le gène GCN5 code pour une acétyltransférase d'histones agissant sur les résidus lysine des domaines N-terminaux des histones H3 et H4, ce qui entraîne une rupture de la chromatine (Brownell *et al.*, 1996, Kuo *et al.*, 1996, Ruiz-Garcia *et al.*, 1997) D'une manière générale, les gènes qui ne requièrent pas le complexe SWI/SNF pour leur expression ne requièrent pas non plus le complexe ADA/GCN5. Les gènes ADA3, ADA2 et GCN5 sont en fait identiques aux gènes SWI7, SWI8 et SWI9 (Pollard & Peterson, 1997). Ces considérations impliquent que le complexe SWI/SNF possède également une activité d'acétyltransférase d'histones.

Hobbs et ses collaborateurs (2002) ont montré qu'il existe une corrélation entre la concentration intracellulaire de polyamines, l'acétylation des histones et la prolifération cellulaire. L'addition de spermine ou de spermidine aux cellules en culture module l'activité des acétylases et déacétylases d'histones. Les polyamines peuvent avoir un effet régulateur positif ou négatif sur l'expression et/ou l'activité des acétylases d'histones. Les effets obtenus par l'augmentation de la concentration intracellulaire de polyamines sont dépendants du statut prolifératif du tissu considéré (Hobbs *et al.*, 2003). Une analyse par RT-PCR a confirmé la modification observée au niveau de l'abondance d'ARNm codant pour SWI3/SNF dans les cellules. En effet, une diminution significative est mise en évidence dans le jéjunum non seulement 6 heures, mais également 18 heures après l'ingestion de spermine (figure III.3.9.A). Aucune modification n'est mise en évidence dans l'iléon (figure III.3.9.B).

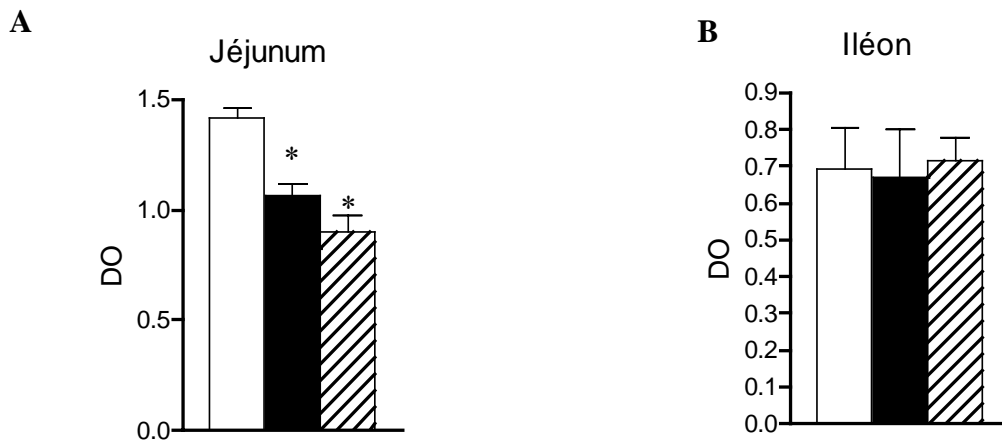


Figure III.3.9 : Rapport entre les densités optiques (DO) des « bandes » électrophorétiques correspondant aux ARNm, amplifiés par RT-PCR, de SWI3/SNF et d'un gène d'entretien, codant pour la GAPDH, contenus dans les entérocytes provenant d'animaux témoins (histogrammes blancs) ou d'animaux ayant ingéré la spermine depuis 6 heures (histogrammes noirs) ou 18 heures (histogrammes hachurés). * $p < 0,05$; $N = 3$.

L'observation d'une modification au niveau d'une protéine ribosomiale, 6 heures après le traitement, peut être corrélée avec de précédentes études ayant montré une augmentation de la synthèse protéique dans les entérocytes 5 heures après ingestion de spermine (Kaouass *et al.*, 1996). *In vitro*, Kakegawa et son équipe (1986) ont montré que les polyamines pouvaient lier les ribosomes et faciliter l'assemblage de leurs sous-unités. Les polyamines interviendraient ainsi dans la régulation de la transcription.

Dans l'intestin grêle, l'apparition de N-myc ainsi que du facteur d'élongation 1- α (EF1- α), dix-huit heures après l'ingestion de spermine, témoigne d'une régénération cellulaire faisant suite à la phase de desquamation cellulaire intense observée précédemment.

Le facteur d'élongation 1- α (EF1- α) est une protéine impliquée dans la liaison des ARN de transfert aux ribosomes. Elle serait également impliquée dans la régulation du cytosquelette, notamment dans l'assemblage de l'actine (Kurasawa, 1996). Lopez-Valenzuela (2004) a démontré, chez le maïs, qu'une augmentation de la concentration intracellulaire d'EF 1- α est liée à une synthèse accrue des protéines du cytosquelette, ce dernier étant alors plus dense autour du réticulum endoplasmique rugueux. L'apparition de EF1- α , ou sa modification, pourrait être liée à la régénération cellulaire faisant suite à la desquamation.

L'hypothèse d'une régénération cellulaire dix-huit heures après l'ingestion de spermine est confortée par l'apparition ou la modification de myc, un proto-oncogène impliqué dans la transcription de nombreux gènes et dans le contrôle du cycle cellulaire. Pour agir, il forme un dimère avec la protéine Max. Myc est présent essentiellement pendant la période de transition G0 – G1, mais également quand les cellules passent du cycle cellulaire à la phase quiescente et quand elles se différencient. Parmi les gènes activés par myc, on trouve des gènes codant pour des cyclines ainsi que le gène de l'ornithine décarboxylase (Bello-Fernandez *et al.*, 1993).

L'effet du traitement à la spermine au niveau de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, et plus particulièrement du complexe bc1, a déjà été mis en évidence lors d'études concernant l'induction de la maturation intestinale (chapitre III.2-2). De la même manière, l'ubiquinol cytochrome c réductase n'est pas détectée au même endroit sur les gels d'électrophorèse dans les échantillons provenant d'animaux traités. Cette enzyme permet le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c.

La sulfide:quinone oxydoréductase catalyse la réduction de NAD(P)⁺ en NAD(P)H par transformation de sulfure d'hydrogène en sulfite et eau. Cette enzyme, possédant pour cofacteur le FAD, est également impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Griesbeck *et al.*, 2000).

Dalla Via et ses collaborateurs (1998) ont montré que la spermine pouvait effectivement se lier à des sites de fixation spécifiques au sein même de la mitochondrie et y exercer un effet protecteur, prévenant les troubles de perméabilité causés par des divers agents, tels le ruthénium ou l'antimycine, associés à un excès d'ions de calcium.

Parmi les autres enzymes identifiées, on trouve l'aminotransférase de l'ornithine. Cette enzyme utilise le pyridoxal 5'-phosphate comme cofacteur et catalyse la seconde réaction de la voie de dégradation de l'arginine.

L'hydratase du fumarate est également détectée. Elle catalyse l'hydratation du fumarate en malate dans le cycle de Krebs.

La cytokératine 19 est présente dans les entérocytes après 18 heures de traitement. Les cytokératines constituent les filaments intermédiaires des cellules épithéliales, formant un réseau intracytoplasmique au niveau des jonctions intercellulaires. Selon le type de cellule épithéliale envisagé, on trouve différentes cytokératines qui sont spécifiques du stade de différenciation cellulaire (Calnek & Quaroni, 1992). Dans l'intestin adulte, par exemple, les ARNm des cytokératines 18 et 19 sont confinés au niveau des cryptes tandis que la cytokératine 20 concerne les entérocytes différenciés des villosités (Calnek & Quaroni, 1993).

Une étude intéressante menée par Salas *et al.* (1997) révèle l'importance de la cytokératine 19 dans l'organisation des microvillosités intestinales. En utilisant un ARNm antisens, dirigé contre celui de la cytokératine 19 de cellules Caco-2 en culture, ces auteurs ont observé une diminution du nombre de microvillosités. Cette diminution est associée à une désorganisation du cytosquelette, localisée au niveau apical des cellules.

L'amplification des ARNm codant pour la cytokératine 19 révèle une augmentation de l'expression du gène concerné dans l'iléon 6 heures et 18 heures après le traitement (figure III.3.10.B). Cette modification correspond à celle observée dans notre étude protéomique réalisée 18 heures après l'ingestion de spermine. Aucune modification dans l'expression du gène ne peut être observée dans le jéjunum après l'ingestion de spermine (figure III.3.10.A).

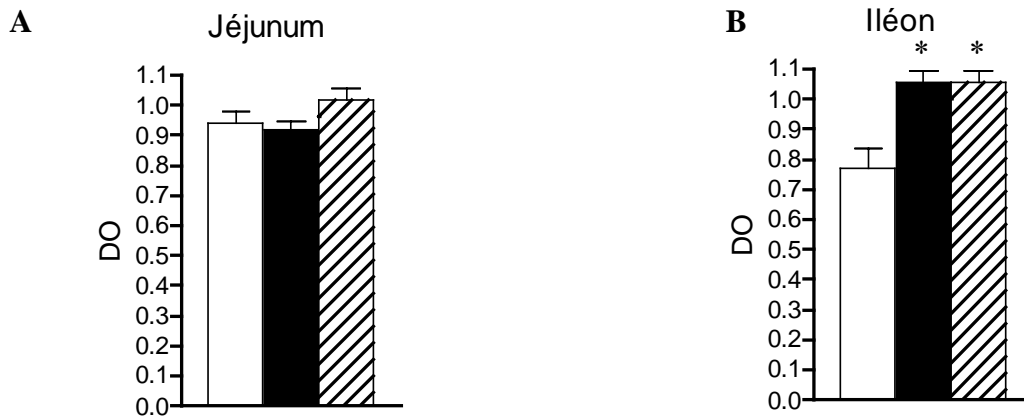


Figure III.3.10 : Rapport entre les densités optiques (DO) des « bandes » électrophorétiques correspondant aux ARNm, amplifiés par RT-PCR, de la cytokératine 19 et d'un gène d'entretien, codant pour la GAPDH, contenus dans les entérocytes provenant d'animaux témoins (histogrammes blancs) ou ayant ingéré la spermine depuis 6 heures (histogrammes noirs) ou 18 heures (histogrammes hachurés).

Enfin, 6 heures après l'ingestion de spermine, nous avons identifié le « Cadhérine EGF LAG 7TM récepteur de type G ». Celui-ci est également connu sous le nom de « Flamingo1 ». Il s'agit d'un récepteur à sept segments transmembranaires possédant plusieurs domaines fonctionnels.

La région extracellulaire de cette protéine comprend 8 domaines « cadhérine » en tandem, 5 domaines « EGF-like », 2 domaines « laminine G » et un domaine formant un récepteur à des hormones (Shima *et al.*, 2004). Les motifs répétés de type cadhérine permettent une interaction homophile entre les domaines extracellulaires de différents récepteurs. Dans les épithélia, Flamingo1 joue un rôle important dans l'établissement et le maintien de la polarisation cellulaire planaire (Usui *et al.*, 1999, Uemura & Shimada, 2003). Les interactions homophiles observées ont également une importance marquée dans le développement du système nerveux, notamment dans le maintien et la régulation de l'arborisation dendritique des neurones de Purkinjé et des neurones pyramidaux. Différentes formes de la protéine sont synthétisées et engendrent différentes réponses cellulaires selon deux déterminants que sont, d'une part, la composition de la région extracellulaire en dehors du domaine cadhérine et, d'autre part, celle de la « queue » intracellulaire carboxy-terminale (Shima *et al.*, 2004).

Conclusion

Les différentes analyses, rapportées dans ce chapitre de notre travail, avaient pour but de préciser les événements moléculaires qui surviennent dans les premières heures subséquentes à l'ingestion de spermine. L'identification de protéines impliquées dans la régulation de la transcription est effectivement importante pour la définition de(s) (la) cascade(s) d'évènements aboutissant à l'établissement du phénotype mature des entérocytes. La spectrométrie de masse apporte des informations importantes et permet d'ouvrir différentes pistes. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour établir précisément un mécanisme d'action de la spermine en relation avec les protéines identifiées. Ils permettent toutefois de formuler un certain nombre de réflexions et d'hypothèses.

Ainsi, six heures après l'ingestion de spermine, les mesures d'activités enzymatiques confirment l'existence d'une desquamation des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, suite à l'ingestion de spermine. Cependant, l'analyse protéomique met en évidence, à ce même moment, des protéines impliquées dans la transcription et la synthèse protéique. Ceci pourrait indiquer que la phase de desquamation touche à sa fin, que le processus de régénération débute ou que ces deux phénomènes sont concomitants. A ce stade, il n'est pas possible de préciser si cette régénération éventuelle est accompagnée ou non d'une différenciation cellulaire orientée vers le phénotype présenté par les entérocytes de l'intestin du rat adulte.

Le fait de constater la disparition de la lamine B1 après l'ingestion de spermine est intéressant à relever. La lamine B1 est une protéine impliquée dans des mécanismes de différenciation impliquant des phosphorylations. Celles-ci, ou d'autres modifications post-transcriptionnelles résultant de la prise orale de spermine, pourraient avoir déplacé la lamine B1 dans les gels d'électrophorèse, ce qui expliquerait sa « disparition » en analyse protéomique. Une telle hypothèse, si elle devait se vérifier, pourrait indiquer que l'action initiale de la spermine, comme agent déclenchant la maturation intestinale, s'exerce au niveau post-transcriptionnel de la lamine B1, par exemple en modifiant l'activité d'une kinase de protéines. Ce phénomène régulerait l'accès de facteurs de transcription au noyau, interférant avec la transcription de gènes codant pour d'autres protéines. Une action directe de la spermine comme agent déclenchant la maturation intestinale n'a, en effet, jamais été écartée (Kaouass *et al.*, 1997b ; Dandrifosse *et al.*, 2000), ce qui n'exclut pas également une action hormonale induite par

l'inflammation résultant de la desquamation de l'épithélium. L'origine de cette inflammation serait due à l'activation de métallo-protéases (Peulen *et al.*, 2001a).

Si l'hypothèse présentée ci-dessus se vérifie, la régénération de l'épithélium intestinal, accompagnée d'une différenciation cellulaire orientée vers le type adulte, débiterait très rapidement, c'est-à-dire peu de temps après l'augmentation de la concentration de spermine dans les cellules souches ou proches de celles-ci.

Par ailleurs, SWI/SNF est affecté par le traitement à la spermine. Il en est de même de la concentration des ARNm codant pour les protéines de ce complexe. Ce dernier est impliqué dans le remodelage de la chromatine. L'action de la prise orale de spermine, mise en évidence au niveau de SWI/SNF, pourrait faire suite aux effets de la lamine B1 signalés ci-dessus. Il pourrait en être de même de l'augmentation de l'expression du gène de la cytokératine 19 dans l'iléon.

Dix-huit heures après l'ingestion de spermine, l'activité spécifique de la maltase diminue et le patron iso-enzymatique de la phosphatase alcaline est modifié dans l'iléon. Dans le jéjunum, l'activité de la maltase augmente significativement. Par contre, l'activité de la lactase et de la phosphatase alcaline ne sont pas modifiées dans cet organe. A ce moment, l'analyse protéomique met évidence des protéines impliquées dans la transcription et le métabolisme cellulaire. Certaines protéines identifiées font également partie du cytosquelette. Ces éléments vont dans le sens d'une régénération cellulaire sans qu'il soit possible de préciser le type de ce phénomène : conservateur ou différenciant. La zymographie non réductrice indique, cependant, un début de maturation des entérocytes comme l'indique la modification du patron iso-enzymatique de la phosphatase alcaline dans l'iléon, ce qui permet de suggérer que la régénération observée est accompagnée de différenciation. Ces résultats ne permettent pas, néanmoins, de préciser le moment du début de ce dernier phénomène.

Si la spermine agit initialement sur la phosphorylation de la lamine B1, comme proposé ci-dessus, ces observations suggèrent l'existence d'une cascade arborescente d'événements moléculaires aboutissant finalement aux diverses étapes de la différenciation des entérocytes des villosités intestinales des animaux adultes. Le contrôle des réactions enzymatiques ou de cascades métaboliques conduisant à l'établissement du phénotype adulte serait différent entre le jéjunum et l'iléon. Une telle possibilité est en accord avec la différence existant entre les

phénotypes des entérocytes immatures du jéjunum et de l'iléon chez le raton non sevré (Baintner & Veress, 1967).

Afin d'explorer au mieux les premiers évènements moléculaires provoqués par l'ingestion de spermine, il serait intéressant de réaliser des analyses une, deux et trois heures après le traitement, juste avant la phase de desquamation prononcée, pour tenter de déterminer ce qui la déclenche. Une voie intéressante supplémentaire serait de comparer le protéome de cellules desquamées avec celui de cellules présentes dans l'épithélium de l'animal non traité. Ces deux analyses pourraient mettre en évidence des protéines impliquées directement dans la desquamation. Cependant, l'isolement de cellules desquamées et de leurs protéines n'est pas aisé. Il est difficile d'obtenir des échantillons suffisamment concentrés et peu contaminés par des protéines environnementales.

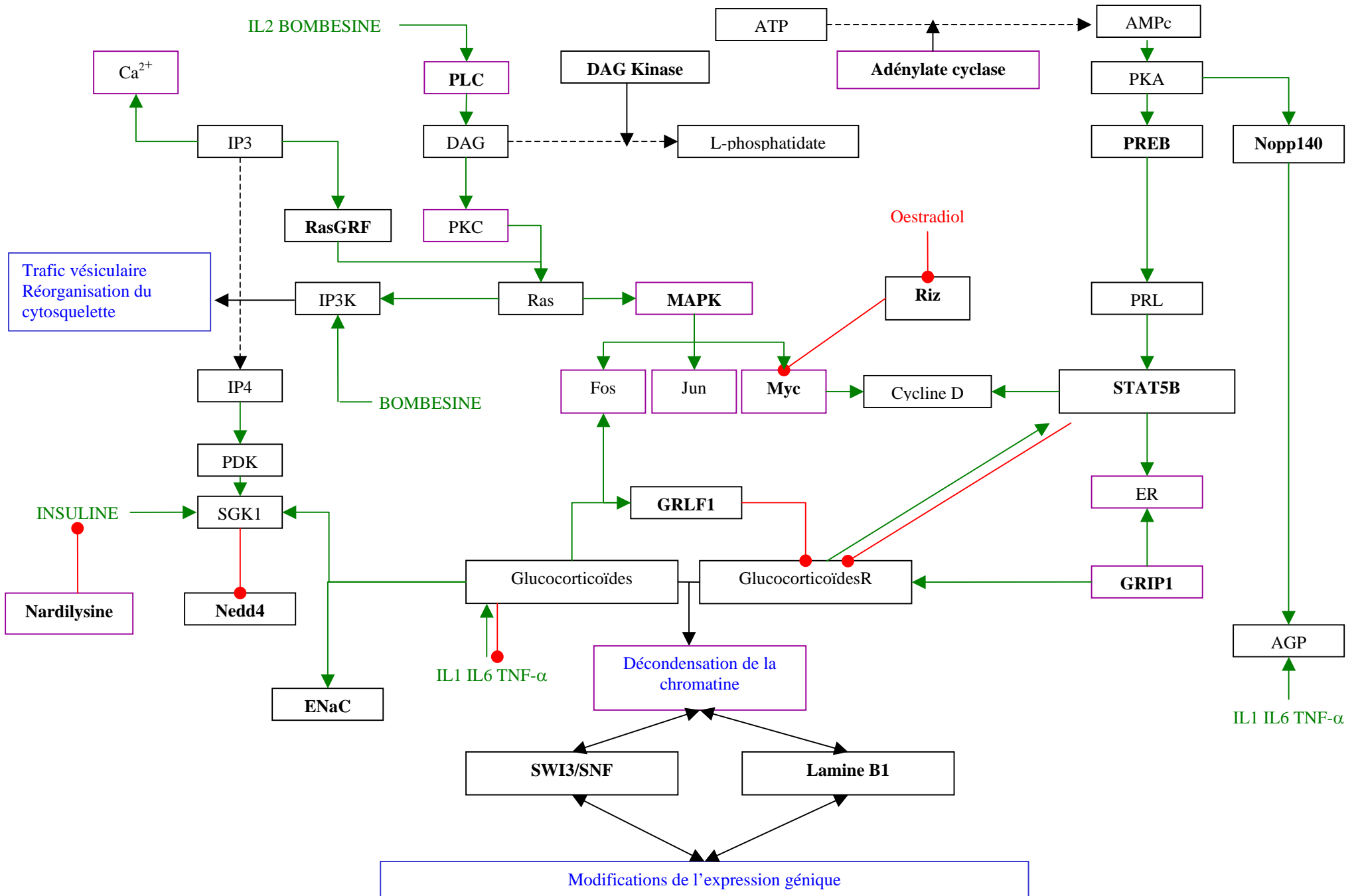
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'administration de spermine à des animaux non sevrés, dans des conditions expérimentales précises, est considérée comme un modèle permettant de déclencher, à un moment donné, la maturation de l'intestin grêle. Ce déclenchement à la demande nous a permis de découvrir des mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation du phénotype entérocytaire de l'état immature en l'état mature.

Un certain nombre de protéines, dont des paramètres (abondance, poids moléculaire) sont modifiés dans les entérocytes, suite au traitement des rats par la spermine, ont été identifiées par l'analyse protéomique. Plusieurs niveaux fonctionnels de la cellule sont concernés : la dynamique du cytosquelette et la régulation de la sécrétion ; le métabolisme dont, notamment, celui des acides gras ; le cycle de l'urée ; la respiration cellulaire ; la régulation de la transcription de gènes et/ou de la prolifération cellulaire ; des cascades de signalisation intracellulaire ; la dégradation protéique faisant participer l'ubiquitine ou des protéases spécifiques ; certaines protéines, telles les protéines hsps, intervenant de manière ubiquitaire dans la cellule.

Devant la diversité des protéines identifiées, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux modifications survenant au niveau de la cathepsine D et des enzymes du cycle de l'urée. Des caractéristiques des enzymes de ce cycle sont effectivement modifiées lors de la maturation postnatale spontanée de l'intestin grêle. Lors de l'ingestion de spermine, on observe des modifications du niveau de la transcription de gènes codant pour certaines de ces enzymes. Dans le cas de la cathepsine D, l'expression du gène codant pour l'enzyme et l'activité de celle-ci sont diminuées dans les entérocytes de l'iléon suite à l'ingestion de spermine. L'analyse approfondie de ces observations a apporté des arguments supplémentaires quant à la similitude existant entre la maturation spontanée et celle induite par l'ingestion de spermine.

Par ailleurs, les études par RT-PCR ont révélé que, dans certains cas, la spermine n'agissait pas au niveau de l'expression génique mais que des modifications post-traductionnelles des protéines pouvaient être à l'origine des variations d'activités enzymatiques observées. Citons, par exemple, le cas de la phosphatase alcaline dont l'expression génique ne varie pas suite à



l'ingestion de spermine tandis que la protéine elle-même change de forme et que son activité enzymatique est modifiée.

Les protéines identifiées par l'analyse protéomique et l'étude théorique de leur régulation révèlent que plusieurs voies de signalisation intracellulaire sont affectées par l'ingestion de spermine (figure IV.1). Nos résultats, ainsi que les données recueillies dans la littérature, indiquent que cette polyamine peut activer la voie de signalisation faisant intervenir la phospholipase C ainsi que celle dépendant des glucocorticoïdes. A l'inverse, la signalisation intracellulaire impliquant la PKA apparaît inhibée.

La voie de la PLC est activée par l'IL2 dont la concentration plasmatique augmente suite à l'ingestion de spermine (Peulen & Dandriofosse, 2004). Cette activation déclenche une cascade métabolique intracellulaire pouvant concerner de nombreux intervenants moléculaires. Parmi ceux-ci, certains ont été identifiés directement lors de l'analyse protéomique. La protéine Ras

Figure IV.1 : Schéma illustrant les différentes interactions possibles reliant les protéines identifiées par l'analyse protéomique (en gras sur le schéma). Les flèches vertes représentent une activation de l'expression du gène ou de l'activité de la protéine tandis que les flèches rouges représentent une action inhibitrice. Les cibles potentielles de la spermine, renseignées dans la littérature, sont indiquées par une astérisque et soulignées. Explications dans le texte.

AGP : acid glycoprotein ; DAG : diacylglycérol ; ENa : epithelium natrium canal ; ER : oestrogen receptor ; GlucocorticoïdesR : récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes ; GRIP1 : glucocorticoid-interacting protein ; GRLF1 : glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1 ; IP3 : inositol-3-phosphate ; IP4 : inositoltétrakisphosphate ; IP3K : kinase de l'IP3 ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; PKA : phosphokinase A ; PKC : phosphokinase C ; PKD : phosphoinositide dependent kinase ; PLC : phospholipase C ; PREB : prolactin regulatory element-binding protein ; PRL : prolactine ; RasGRF : Ras guanine releasing factor ; SGK1 : serum and glucocorticoid inducible kinase 1 ; STAT5B : Signal transducer et activator of transcription 5B ; SWI/SNF : switch/sucrose nonfermenting, member 3).

provoque la stimulation de la voie des MAPK, essentielle à la prolifération cellulaire, ainsi que celle d'une enzyme, la kinase de l'IP3, dont les produits interviennent dans de nombreux processus cellulaires.

Cette activation de la kinase de l'IP3 peut également être déclenchée par la bombésine (Matozaki *et al.*, 1991) qui peut également activer la PLC (Schulz *et al.*, 1999). Par ailleurs, on a montré qu'une injection intrapéritonéale de bombésine induit, chez le rat non sevré, une augmentation des activités spécifiques de la sucrase et de la maltase dans tout l'intestin grêle ainsi qu'une diminution de l'activité spécifique de la lactase dans l'iléon (Kaouass *et al.*, 1997a). De plus, l'administration orale de spermine aux rats provoque une diminution de la concentration de bombésine dans l'intestin grêle de ceux-ci sans faire varier la concentration plasmatique de cette substance.

L'activation de la kinase de l'IP3 produit des phosphatidyl-inositol-polyphosphatés qui peuvent être à l'origine de nombreuses modifications que nous avons observé, au niveau de protéines impliquées dans les processus de trafic vésiculaire et de sécrétion cellulaire (Fukuda & Mikoshiba, 1997), ainsi que dans la dynamique des microtubules (Akhmanova *et al.*, 2001).

La formation d'inositol-tétrakisphosphate (IP4), par l'intermédiaire de la PKD, aboutit à l'activation d'une autre enzyme, la *serum and glucocorticoid inducible kinase 1* (SGK1). Celle-ci est également stimulée par les glucocorticoïdes, ce qui révèle un premier point de connexion entre les voies de signalisation faisant intervenir la PLC et les glucocorticoïdes. La SGK1 agit directement sur l'enzyme Nedd4 que nous avons identifiée. Cette dernière protéine est impliquée dans les processus de dégradation protéique. Il est intéressant de noter également que SGK1 est stimulée par l'insuline, une substance déclenchant l'apparition de certains paramètres caractérisant la maturation intestinale postnatale (Menard & Malo, 1979 ; Menard *et al.*, 1981 ; Buts *et al.*, 1988 ; Shulman, 1990 ; Harada & Syuto, 1991). La dégradation de l'insuline est sous le contrôle de la nardilysine, une protéase identifiée au cours de l'analyse protéomique.

L'activation de la voie des MAPK aboutit à la stimulation de l'activité transcriptionnelle des gènes JUN, FOS et MYC. L'activation de la transcription du gène MYC peut être inhibée par la protéine régulatrice Riz que nous avons également identifiée. Cependant, la transcription de

la protéine Riz est elle-même inhibée par l'œstradiol (Gazzerro *et al.*, 2006). En effet, la liaison de cette substance à son récepteur, de même que la liaison du complexe ainsi formé à des éléments de réponse spécifique de l'ADN, permettant son activité régulatrice sur l'expression génique, sont inhibées en présence de polyamines (Lu *et al.*, 1998). L'activation de la transcription du gène FOS constitue un deuxième point de connexion entre la voie de signalisation médiée par la PLC et celle faisant intervenir les glucocorticoïdes.

Une élévation de la concentration plasmatique en glucocorticoïdes est observée lors de la maturation naturelle (Henning, 1978 ; Galand, 1989) de même que lors de celle induite par l'ingestion de spermine (Kaouass *et al.*, 1997b). Cette augmentation est corrélée à celle des concentrations plasmatiques en IL1- β , IL6 et TNF- α (Roh *et al.*, 1987 ; Cambronerio *et al.*, 1992 ; van der Meer *et al.*, 1996). Ces cytokines sont également présentes en plus grande quantité dans l'intestin lors du sevrage (Pié *et al.*, 2004).

La liaison des glucocorticoïdes à leurs récepteurs nucléaires déclenche une décondensation de la chromatine. Cette modification de la conformation de la chromatine est en relation avec des enzymes spécifiques du remodelage nucléaire tel le complexe SWI3/SNF (Wallberg *et al.*, 2000). Plusieurs protéines régulant l'activité des récepteurs aux glucocorticoïdes ont été identifiées, dont notamment GRIP1, GRLF1 et STAT5B. Ce dernier facteur agit conjointement avec la protéine myc pour activer la cycline D. Nous trouvons ainsi un troisième point de connexion entre la voie de signalisation médiée par la PLC et celle faisant intervenir les glucocorticoïdes. L'activité de la protéine STAT5B est stimulée par les glucocorticoïdes. Elle exerce, cependant, un rétro-contrôle sur cette activation en réprimant la signalisation par les récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes. Ce rétro-contrôle pourrait être de moindre efficacité dans notre contexte étant donné qu'une autre voie de signalisation, également stimulatrice de l'activité de STAT5B, est inhibée suite à l'ingestion de spermine. Il s'agit de la voie de la PKA. Celle-ci dépend de l'AMPc dont la concentration intracellulaire diminue en présence de spermine suite à l'inhibition de la cyclase de l'acide adénylique (Wright *et al.*, 1978). Par ailleurs, une stimulation, par l'APMc, de la voie de signalisation faisant intervenir la PKA ne favoriseraient pas la maturation des entérocytes (Boucher *et al.*, 2005). En effet, l'augmentation de la concentration en AMPc dans des cellules Caco-2/15 -un clone de la lignée Caco-2- diminue l'expression des gènes codant pour la villine et pour la sucrase. Cette augmentation de la concentration en AMPc provoque également une altération

de la morphologie cellulaire au niveau de la bordure en brosse, de l'adhérence des jonctions cellulaires et de la polarité cellulaire.

Les trois voies de signalisation mentionnées ci-dessus, médiées par la PLC, les glucocorticoïdes ou la PKA, permettent de mieux comprendre de quelle manière la spermine, par l'intermédiaire de l'activation de cytokines, est capable d'agir sur les différents niveaux fonctionnels de la cellule. Toutes les protéines que nous avons identifiées ne sont cependant pas concernées, au niveau de leur régulation, par les enzymes composant ces voies de signalisation, soulignant la probabilité que la polyamine puisse avoir d'autres cibles d'action.

En effet, la spermine est également capable d'agir directement au niveau de la chromatine et de modifier sa conformation (Matthews, 1993). Les modifications de la conformation de la chromatine pourraient être directement à l'origine de variations d'expression génique comme nous le signalons dans le cas de la lamine B1 (chapitre III.3.2).

Les informations récoltées par l'analyse protéomique et les expériences additionnelles réalisées ouvrent plusieurs pistes de recherche. Elles suggèrent des voies de signalisation intracellulaires dont l'activité est influencée par l'ingestion de spermine. Cependant, les conséquences de ces diverses modifications doivent encore être éclaircies. La diversité des variations survenant au niveau des protéines entérocytaires, l'ubiquité des niveaux cellulaires concernés et la possibilité que la spermine puisse agir selon plusieurs modes d'actions, mettent en exergue la difficulté de caractériser, de manière précise, les modifications pouvant survenir dans l'entérocyte lors de la maturation naturelle. De plus, les différences fonctionnelles mises en évidence entre les cellules de jéjunum et celles de l'iléon confortent l'hypothèse que nous sommes en présence de deux organes distincts. L'approche globale du protéome a apporté plusieurs éléments de réponses. Néanmoins, le changement de phénotype cellulaire est tellement grand qu'il convient de considérer individuellement les différents paramètres modifiés lors de la maturation des entérocytes. Par exemple, nous avons montré que les modifications concernant l'activité de la lactase sont associées à la PLC tandis que celles concernant la maltase et la sucrase sont en rapport avec les glucocorticoïdes. Cependant, les informations récoltées par l'analyse protéomique ne permettent pas d'associer directement d'autres variations du phénotype cellulaire à des protéines spécifiques, mais bien à des processus biologiques. Par exemple, la réorganisation du cytosquelette, impliquant de

nombreuses protéines que nous avons identifiées, est corrélée aux modifications survenant au niveau de la kinase de l'IP3.

L'analyse protéomique est un outil précieux d'investigation dans une optique d'approche globale dont l'objectif consiste à cibler des recherches ou des protéines particulières. Elle ne constitue alors qu'une première étape dans l'étude de phénomènes complexes, permettant d'orienter par la suite, avec l'utilisation d'autres techniques, des expériences approfondies concernant telle ou telle protéine identifiée. Une partie de ce travail est d'ailleurs consacrée à des explorations subséquentes aux résultats obtenus par l'analyse protéomique.

Plusieurs possibilités s'offrent à nous afin d'améliorer la pertinence de la technique choisie. Elles consistent à s'éloigner de la méthode globale, que nous avons utilisée, pour s'approcher d'objectifs plus ciblés. Une des possibilités consiste à considérer uniquement un organe particulier, comme le noyau, ou à ne sélectionner qu'un seul type de protéines, par exemple, en ne visant que les protéines de faible poids moléculaire, afin de cibler de petits facteurs de régulation. La première dimension de l'électrophorèse peut être réalisée dans un intervalle de pH très réduit, de une à deux unités, réduisant ainsi le nombre de protéines. Au niveau de la technique, il peut être intéressant d'utiliser des méthodes quantitatives qui distinguent non seulement les variations de type on/off, comme dans notre étude, mais également les variations de concentrations des protéines résolues sur le gel, afin de déterminer directement si une protéine est présente quantité en plus ou moins grande dans la cellule. Une telle technique est difficilement envisageable lorsqu'on considère le protéome complet d'une cellule, même limité aux protéines dont le point isoélectrique se situe entre les valeurs 4 et 7, comme dans notre travail. En effet, dans le contexte de la maturation intestinale, ainsi que nous l'avons montré, le nombre des modifications observées est tel que l'analyse de résultats obtenus par une méthode quantitative et leur confirmation par d'autres techniques apparaît difficilement réalisable dans le cadre d'un doctorat.

Ces différentes orientations, pouvant concerner la préparation de l'échantillon ou la technique d'analyse protéomique elle-même, permettent une analyse plus fine des modifications mais risquent cependant de masquer des modifications majeures pouvant survenir dans la cellule.

En conclusion, notre approche globale, considérant les protéines dont la concentration varie de manière majeure dans l'entérocytes ou dont les modifications post-traductionnelles sont

importantes au point de provoquer leur déplacement sur les gels d'électrophorèse, a permis d'ouvrir plusieurs pistes pour de futures recherches ciblées. La poursuite des investigations, limitées cette fois à considérer une voie métabolique particulière ou des protéines spécifiques, identifiées dans le présent travail, conduiront à une compréhension plus complète des modifications survenant dans la cellule lors de la maturation postnatale de l'intestin.