

L'ACADÉMIE ROUMAINE
Institute de Biologie Pathologie Cellulaire
„NICOLAE SIMIONESCU”

THÈSE
-Résumé-Book-

CARACTERISATION FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE
DES MICRODOMAINES MEMBRANAIRES DANS UN ETAT
NORMAL ET PATHOLOGIE
(diabète, hypercholestérolémie, l'athérosclérose)

Directeur de thèse
MM Felicia Antohe

Doctorant
Elena Uyy

BUCAREST
2012

TABLE DES MATIÈRES

PARTIE I - ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR MICRODOMAINES MEMBRANAIRES

I.1. Membrane plasmique et microdomaines lipidiques	
I.2. Cavéoles, Microdomaines membranaires hautement spécialisé	7
I.2.1. Introduction	10
I.2.2. Cavéoles et leur implication dans la physiologie cardiovasculaire	16
I.3. Cavéoles dans des cellules endothéliales	17
I.3.1. Introduction	17
I.3.2. L'implication des cavéoles dans la régulation de la perméabilité vasculaire	19
I.3.3. Rôle des cavéoles / cavéoline dans le plasma macromolécules transport et l'homéostasie	26
I.3.4. La cavéoline-1 et de l'angiogenèse	29
I.4. Dysfonctionnement des cellules endothéliales et les cavéoles	30
I.4.1. Introduction	30
I.4.2. Dysfonction des cellules endothéliales dans les maladies cardiovasculaires et le rôle des cavéoles dans:	31
I.4.2.1. diabète	36
I.4.2.2. hypercholestérolémie / athérosclérose	42
I.4.2.3. l'hypertension artérielle	49
I.4.2.4. cancer	58
I.5. Récepteurs et des voies de signalisation impliquées dans la relation des cavéoles / cavéoline et la dysfonction des cellules endothéliales	61
I.5.1. Récepteurs associés de la membrane cavéoles	61
I.5.2. Les voies de signalisation	63
I.5.3. Rôle des cavéoles dans la mobilisation du Ca^{2+}	65
I.5.4. Cavéoles, récepteur de folate, le groupement récepteur et la potocytose..	66
I.5.5. Potentiel thérapeutique des conjugués de folate	67
I.6. Conclusions	69

PARTIE II - CONTRIBUTIONS ORIGINALES

II.1. Introduction et objectifs	71
II.2. Méthodologie expérimentale	73
II.2.1. Les modèles expérimentaux	73
II.2.2. Techniques de la microscopie	75
II.2.2.1. La microscopie électronique et analyse morphométrique	75
II.2.2.2. La microscopie optique	75
II.2.3. Préparation d'extraits cytoplasmiques, nucléaires et membrane protéines	76
II.2.4. Préparation des domaines membranaires enrichies en cavéoline-1 par centrifugation en gradient de saccharose	77
II.2.5. Western Blotting	77
II.2.6. ELISA	78
II.2.7. Extraction d'ARN et RT-qPCR	78

II.2.8. LC-MS/MS.....	79
II.2.9. Analyse statistique	79
II.3. Des études expérimentales	80
II.3.1 La cavéoline-1 est associée à des changements structuraux dans les cellules endothéliales pulmonaires chez les diabétiques	80
II.3.1.1. Introduction	80
II.3.1.2. Les modèles expérimentaux	81
II.3.1.3. Résultats et discussion	82
II.3.1.3.1. Caractérisation des modèles expérimentaux	82
II.3.1.3.2. Les changements structuraux de cellules endothéliales pulmonaires chez les diabétiques	82
II.3.1.3.3. Caractérisation de la cavéoline-1 riche microdomaines membranaires (activité de ACE, le cholestérol, les protéines totales)..	85
II.3.1.3.4. Augmentation de l'expression des protéines de la cavéoline-1 et -2 dans le diabète.....	88
II.3.1.3.5. Augmentation de l'expression du gène de la cavéoline-1 dans le diabète	91
II.3.1.4. Conclusions.....	93
II.3.2. Corrélation de l'expression protéique des protéines de choc thermique ou HSP (pour heat shock protein) et des protéines dans le microdomaines membranaires en hyperlipidémie expérimental.....	95
II.3.2.1. Introduction	95
II.3.2.2. Les modèles expérimentaux	97
II.3.2.3. Résultats et discussion	97
II.3.2.3.1. Hyperlipidémie induite par l'alimentation la formation des plaques athérosclérotique	97
II.3.2.3.2. Les changements structuraux de l'endothélium pulmonaire en hyperlipidémie.....	101
II.3.2.3.3. Caractérisation de la cavéoline-1-riche microdomaines membranaires.....	102
II.3.2.3.4. Caractérisation des fractions enrichies en protéines cytosolique / nucléaire / membrane	106
II.3.2.3.5. Hyperlipidémie induit une augmentation de l'expression protéines de la cavéoline-1 dans le microdomaines membranaires.....	108
II.3.2.3.6. L'expression du gène de la cavéoline-1 dans l'athérosclérose ...	108
II.3.2.3.7. L'athérosclérose entraîne une diminution de l'expression des protéines de PTRF dans le microdomaines membranaires enrichie en cavéoline-1.....	109
II.3.2.3.8. L'athérosclérose induit une augmentation de l'expression protéines de RAGE co-fraction avec la cavéoline-1 et l'activation de la voie de signalisation AKT	111
II.3.2.3.9. Augmenter l'expression du récepteur de folate dans l'endothélium pulmonaire dans l'athérosclérose	114
II.3.2.3.10. Régulation à la hausse des protéines impliquées dans la	

dynamine endocytose que la co-fractionnement avec la cavéoline-1 (dynamine, clathrine filamine A).....	115
II.3.2.3.11. La corrélation de la sécrétion de la protéine de choc thermique dans le sérum des animaux hyperlipidémiques avec leur expression dans la membrane cavéoline-1 fractions enrichies	118
II.3.2.4. Conclusions.....	121
II.3.3. Absorption accrue de folate conjugués par les macrophages activés	
hyperlipidémie expérimental.....	125
II.3.3.1. Introduction	125
II.3.3.2. Les modèles expérimentaux	127
II.3.3.3. Les procédures expérimentales	127
II.3.3.3.1. La préparation des tissus cryosections avec lésions athéroscléreuses	128
II.3.3.3.2. L'absorption de l'acide folique-Texas Red dans des cultures de macrophages péritonéaux	129
II.3.3.3.3. L'absorption de l'acide folique-FITC / Texas Red par le monocytes U937	129
II.3.3.4. Résultats et discussion	130
II.3.3.4.1. L'absorption spécifique de l'acide folique-Texas Red dans des cultures de macrophages péritonéaux	130
II.3.3.4.2. L'absorption de l'acide folique par les cellules associées plaque d'athérome.....	133
II.3.3.4.3. L'absorption spécifique du acid-FITC/Texas folique rouges par la lignée cellulaire U937	135
II.3.3.5. Conclusion.....	137
II.4. Conclusions générales	139
II.5. Bibliographie	143
II.6. Liste des communiqués publiés et des articles scientifiques	161

MOTS-CLÉS

**LES CELLULES ENDOTHÉLIALES,
RADEAUX LIPIDIQUES
LA CAVEOLINE-1,
PTRF,
LE FOLATE RECEPTEUR
LE DIABETE,
L'HYPERLIPIDEMIE,
L'ATHEROSCLEROSE,**

PART I

ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR MICRODOMAINES MEMBRANAIRES

La modèle "mosaïque fluide" de membranes cellulaires structurer (ainsi que endomembranes) est basée sur une bicouche lipidique fluide hétérogène, asymétrique, organisé en deux dimensions, un plus: des protéines qui lui confèrent un caractère mosaïque (protéines sont flottantes, ou sont immergés dans une mer de lipides), cytosquelette membranaire associé (une structure située sur la face interne de la membrane) et le glicocalyx (une structure exposée sur la surface extérieure des membranes, composé de chaînes olygo-(poly)-saccharide de composition de glycolipides, les glycoprotéines et les protéoglycane de la membrane).

En plus du modèle de la "mosaïque fluide" en termes de structure, et de fonction ont été définies les notions de domaines et/ou microdomaines membranaires. Composition et de l'existence de microdomaines (cavéoles, radeaux lipidiques, clathrine structures enrobés) ont un caractère dynamique qui répond à la nécessité constante évolution des cellules, imposée par les activités internes biochimiques, ou par des stimuli externes. Composants de la membrane soit des lipidique, de protéines ou de structures glucides ont deux rôles structuraux et métaboliques. Cette dualité des rôles est valable pour les deux classes de composants de la membrane biochimiques et entités moléculaires (même molécule peut effectuer à la fois structurelle et les fonctions métaboliques) (Pike et al, 2009)

Des progrès significatifs ont été réalisés en biologie moléculaire et cellulaire en 2009, lorsque Pike et ses collaborateurs ont formulé plusieurs questions dont la réponse est demandée, même dans le présent. En bref, les questions portent sur les mécanismes suivants:

- 1) Comment le niveau de protéine de la membrane modifie en réponse à des stimuli provenant de l'environnement qui affectent la composition et le comportement des "radeaux lipidiques"?,
- 2) Quelles sont les fonctions physiologiques de les radeaux lipidiques?,
- 3) Comment est le flux continu des lipides membranaires en, et à partir de la membrane plasmique de compartiments internes;
- 4) Comment il affecte le champ d'écoulement de formation et comment l'alimentation ou un traitement médicamenteux pour modifier la composition lipidique en modifiant le fonction des domaines lipidiques?

PARTIE II

CONTRIBUTIONS ORIGINALES

Des expériences réalisées *in vitro* sur des systèmes membranaires que le modèle du *black hole* n'expliquent pas toutes les fonctions complexes de cellules intactes. Dans ce contexte, des expériences *in vivo* ont été réalisées pour l'd'une meilleure compréhension de la physiopathologie de la membrane microdomaines. Notre enquête a montré que:

Dans le diabète insulino-dépendant, les cellules endothéliales expriment un nombre élevé de cavéoles, à exposer une plus grande surface luminale et un complexe membrane interne biosynthétique bien développée. Ces changements sont en corrélation avec l'activité accrue ACE, avec le niveau de cholestérol et de la cavéoline-1 expression qui indiquent une réponse de la CE au stress induit par le glucose élevé et les taux de lipides sériques (Uyy et al., 2010).

Association du diabète de type I et régime alimentaire hyperlipidémie met l'accent sur l'effets induits de diabète dans le tissu pulmonaire.

L'augmentation du cholestérol dans la membrane plasmatique induite par le diabète de type I et / ou l'hyperlipidémie alimentation, indiquant un enrichissement de la membrane de la cellule avec des radeaux lipidiques d'une composition biochimique de modification qui affecte de manière significative la fluidité et la perméabilité de la membrane cellulaire (Uyy et al., 2010, Uyy et al., in press 2012).

Dans la pathogenèse du diabète sucré insulino-dépendant, augmentation de l'expression de la cavéoline-1, de la concentration du cholestérol et une augmentation ACE activité enzymatique peut provoquer l'inhibition de la eNOS situé sur la face interne de la membrane, suivie d'une réduction de la production de NO, qui aboutira à la dysfonction émergence de cellules endothéliales (Uyy et al., 2010).

Les résultats que nous avons obtenus ont un potentiel appliqué simultanément à travers le ciblage des molécules sur la surface des cellules endothéliales affectée par l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (ACE, la cavéoline-1), un mécanisme qui pourrait être une stratégie thérapeutique supplémentaire dans le diabète de type I (Uyy et al., 2010).

Les modèles expérimentaux créés à l'aide d'un régime alimentaire hyperlipidémie sur hamsters Dorés Syriens et souris *knockout* dans APO E, ont démontré le développement des lésions d'athérosclérose et l'installation de pathologie s'accompagne de changements

importants dans la cellule endothéliale (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011, Uyy et al., in press 2012).

Hyperlipidémie régime alimentaire induit des changements dans l'expression des protéines membranaires impliquées dans la fission des vésicules de transport, qui cofractionne avec la cavéoline-1. Ces résultats confirment la rapidité au démontage de cavéoles en réponse des cellules endothéliales au stress hyperlipidémie et aussi la redistribution de la cavéoline-1 dans la non-cavéoles "radeaux lipidiques" au niveau du plasmalemme ou des membranes intracellulaires (diminution de l'expression PTRF et la dynamine et expression accrue de protéines de la cavéoline-1 et de filamine A) (Uyy et al., in press 2012).

Les changements induit par la diète hyperlipidémie dans l'expression de protéines qui co-fractionnée avec la cavéoline-1 impliqué dans la fission des vésicules de transport (PTRF, dynamine, clathrine et filamine A) peut être une réponse indirecte de l'internalisation accrue des macromolécules par endocytose dépendante dynamine clathrine au détriment de l'une caveolar dans des conditions pathologiques provoquées par l'athérosclérose chez microvascularisation pulmonaire (Uyy et al., in press 2012).

L'apparition de l'athérosclérose a induit une augmentation à l'expression RAGE et de récepteurs de folate (FR) qui co-fractionnement avec la cavéoline-1 de la membrane endothéliale pulmonaire par activation la voie de signalisation AKT. Ces mécanismes maintenir et amplifier les processus inflammatoires dans le tissu pulmonaire (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011).

Le traitement par statine diminue de manière significative la tendance du récepteur de folate et RAGE à s'accumuler dans les fractions membranaires isolées à partir de l'endothélium pulmonaire et atténue l'activation AKT signalisation et l'inflammation associées à l'athérosclérose.

Le démontage de cavéoles induite par l'hyperlipidémie et la redistribution de la cavéoline-1 dans la non-cavéoles "radeaux lipidiques" ne semble pas influencer l'expression des deux protéines (RAGE et FR) dans la cavéoline-1 positifs fractions membranaires enrichis en "radeaux lipidiques" mais peut être mise en corrélation avec une expression accrue de la protéine cavéoline-1.

L'athérosclérose provoque une sur-expression de HSP 70 et une régulation à la baisse HSP 90 de cofractionne avec la cavéoline-1 dans les fractions membranaires isolées à partir de tissu pulmonaire (Uyy et al., in press 2012).

Le traitement par statine inverse de manière significative les processus induits par l'hyperlipidémie en réduisant la sécrétion sérique de HSP 60 et 70 et en augmentant la sécrétion et cofractionation de HSP 90 avec la cavéoline-1 (Uyy et al., in press 2012)..

L'état hyperlipidémique induit un changement dans l'expression de la protéine de HSP 70 et HSP 90 qui cofractionate avec la cavéoline-1 dans les fractions membranaires qui est en corrélation avec l'expression de la protéine HSP 70 et HSP 90, sécrétée dans le sérum isolé de la même expérimentation animale groupe, ce qui nous amène à émettre l'hypothèse de la participation de la cavéoline-1-positifs "radeaux lipidiques" dans leur sécrétion (Uyy et al., in press 2012).

Parce que les modèles expérimentaux que nous avons utilisés présentent des similitudes avec la pathologie humaine, les données obtenues peuvent être utiles pour la modulation des processus moléculaires à des patients avec diabète de type I et / ou l'athérosclérose.

Le quantitatif (spectrofluorimétrique) et qualitatives (microscopie à fluorescence) a révélé une augmentation significative de la rétention de l'acide folique - conjugués par les macrophages péritonéaux récoltés à partir des hamsters hyperlipidémiques par opposition aux animaux qui ont été entretenus sur soit normal (folate élevée) ou acide folique déficient alimentation (Antohe, Puchianu et al. 2005).

L'analyse histologique a confirmé l'adoption répandue de conjugué folate par les plaques d'athérosclérose peuplées par les macrophages, par rapport aux régions distales qui présentaient un faible niveau de fluorescence (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Les expériences réalisées sur des macrophages U937 en culture en utilisant moyenne hyperlipidémie ont confirmé les résultats obtenus *in vivo* (Antohe, Puchianu et al. 2005).

L'augmentation de l'absorption de folate par les macrophages U937 peut être expliquée par l'expression accrue des récepteurs de folate (FR) sur les macrophages activés. Cette augmentation de l'expression FR peut être exploitée dans les ciblées thérapies composés d'acide folique avec de divers médicaments destinés aux lésions athéroscléreuses, riches en macrophages activés (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Le concept des microdomaines membranaires que explique la dysfonction des cellules endothéliales dans diverses maladies, est un sujet d'actualité. À cet égard, leur caractérisation teneur en protéines et les possibilités thérapeutiques offertes par les microdomaines membranaires lipidiques pourrait élargir l'arsenal des options de traitement pour les maladies cardio-pulmonaires.

Bibliography

- Elena Uyy, Felicia Antohe, Luminita Ivan, Raluca Haraba, Dorel Lucian Radu, Maya Simionescu, Upregulation of caveolina-1 expression is associated with structural modifications of endothelial cells în diabetic lung, *Microvascular Research*, 79, 154-159, 2010.
- Elena Uyy, Luminita Ivan, Raluca Boteanu, Viorel Suica and Felicia Antohe, Heat Shock Proteins and Membrane Caveolins Overexpression în Experimental Hyperlipidemia trimisa spre publicare la *Biology of the cell* (FI 4,898)
- Felicia Antohe, Luminita Radulescu, Elena Puchianu, Michael D. Kennedy, Philip Low, Maya Simionescu - Increased uptake of folate conjugates by activated macrophages în experimental hyperlipemia, *Cell Tissue Res.*, 320(2):277-285, 2005. (FI 2,991)
- Pike L. J., The challenge of lipid „raft”s, *Journal of Lipid Research*, 2009, 50:S323-328
- Raluca Haraba, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression în hyperlipidemia, *International Journal of Cardiology*, Jul 1;150(1):105-7, 2011, (FI 7,078)
- Raluca Haraba, Viorel I. Suica, Elena Uyy, Luminita Ivan, Felicia Antohe, Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of nuclear high mobility group box 1 protein, *Cell Tissue Res.* Dec; 346 (3) : 361-8. 2011 (FI 3,114)