



HAL
open science

Etude des fonctions de la spectrine α non érythroïde

Sylvain Metral

► **To cite this version:**

Sylvain Metral. Etude des fonctions de la spectrine α non érythroïde. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2009. Français. NNT : . tel-00377569

HAL Id: tel-00377569

<https://theses.hal.science/tel-00377569>

Submitted on 22 Apr 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. Sciences du Vivant
Bâtiment Lamarck
35, rue Hélène Brion
75205 PARIS CEDEX 13

INSERM UMR_S 665
Institut National de la Transfusion Sanguine
6, rue Alexandre Cabanel
75739 PARIS CEDEX 15

Thèse de Doctorat de l'Université Paris Diderot - Paris 7

Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire

Spécialité Structures, fonction et ingénierie des protéines

Présentée par

Sylvain METRAL

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris Diderot – Paris 7

Etude des fonctions de la spectrine α non érythroïde

Soutenue le lundi 6 Avril 2009

devant le jury composé de

Pr Fernando RODRIGUES-LIMA, Université Paris Diderot
Dr Elisabeth GENOT, INSERM U 889
Dr Faouzi BAKLOUTI, CNRS UMR 5534
Dr Aziz EL-AMRAOUI, INSERM UMRS 587
Dr Stéphane GASMAN, CNRS UPR 3212
Dr Marie-Christine LECOMTE, INSERM U 665

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait sûrement pas d'existence sans la participation de nombreuses personnes que je voudrais remercier à travers ces quelques lignes. Ces personnes ont joué un rôle important dans ma thèse par les apports techniques, les conseils, les suggestions, les encouragements qu'elles m'ont apportées tout au long de mon doctorat et jusqu'aux derniers moments. Toutes ces personnes ont permis d'aboutir à ce travail.

J'adresse mes remerciements, tout d'abord, au Docteur Yves COLIN pour m'avoir accepté au sein de l'unité de recherche INSERM UMR-S 665, et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail de thèse.

D'autre part, je tiens à remercier les membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Je remercie particulièrement le Professeur Fernando RODRIGUES-LIMA d'avoir accepté de présider le jury.

Un grand merci aux Docteurs Elisabeth GENOT et Faouzi BAKLOUTI pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux Docteurs Aziz EL-AMRAOUI et Stéphane GASMAN pour avoir accepté d'examiner et de discuter ce travail.

Je remercie le Docteur Marie-Christine LECOMTE, pour m'avoir encadré durant ces 4 années de thèse. Je lui adresse ma reconnaissance pour tout le temps passé avec moi, à travers les discussions scientifiques qu'on a pu avoir ainsi que pour la réalisation de mon manuscrit.

J'adresse mes remerciements au Docteur Jean-Pierre CARTRON qui a donné son aval pour l'accomplissement de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Gaël NICOLAS pour ses compétences scientifiques: ses idées, ses remarques, ses critiques toujours très pertinentes. Je souhaite aussi souligner ses qualités humaines que j'ai pu apprécier tout au long de ma thèse.

Mes remerciements vont également au Docteur Claude LOPEZ pour m'avoir formé aux rudiments de la biologie cellulaire. Cette formation m'a aidé fortement dans les travaux que j'ai réalisés durant cette thèse.

Je voudrais remercier Emmanuel COLLEC pour son humour, et pour avoir fait passer un jour mon curriculum vitae dans le laboratoire de l'unité INSERM U76.

Je remercie Sylvie COCHET, Claude HATTAB ainsi que le Docteur Olivier BERTRAND pour m'avoir fait aimer ce travail qui est devenu mon métier.

J'aimerais remercier aussi Viviane BONY et Pierre GANE qui m'ont montré les joies de la cytométrie en flux, c'est avec eux que j'ai pu faire mes premières armes.

Je remercie le Docteur Didier DHERMY pour m'avoir fait bénéficier de son savoir ainsi que de sa grande expérience sur la spectrine.

Merci au Docteur Fabien SOHET pour m'avoir supporté tous les jours de la semaine pendant presque 4 ans.

J'effectue aussi mes remerciements à tous les membres du laboratoire qui constituent l'unité de recherche INSERM UMR-S 665 et particulièrement :

« pablocito », Pablo BARTOLUCCI ; « la post-doc », Vicky CHAAR ; Béata MACHNICKA ;
« Facsman » Julien PICOT ; Wina SEDECAS et Christine GASTREIN.

Enfin je remercie toute ma famille, mes parents Josiane et Claude, mon petit frère Didier ainsi que Catherine, qui ont toujours su me soutenir dans les moments de doute.

Par ces dernières lignes, je rends hommage à mes grands parents, Adèle et Charles VIEUX JEANTON.

Table des matières

Table des matières	6
INTRODUCTION	12
I La membrane et le squelette membranaire dépendant de la spectrine	13
II.1 Le squelette membranaire dépendant de la spectrine dans le globule rouge	13
II.2 Le squelette membranaire dépendant de spectrine dans les cellules nucléées	16
III La spectrine : un élément essentiel du squelette membranaire.....	17
III.1 La famille multigénique de la spectrine : les gènes et les isoformes	17
III.1.1 Chez les mammifères	17
III.1.2 Chez d'autres organismes.....	18
III.1.2.1 Chez les oiseaux et les amphibiens	18
III.1.2.2 Chez le poisson <i>Danio rerio</i>	20
III.1.2.3 Chez la Drosophile <i>Drosophila melanogaster</i>	20
III.1.2.4 Chez le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	20
III.2 L'architecture des sous-unités de la spectrine.....	21
III.2.1 L'aspect structural de la spectrine : structure et domaines.....	21
III.2.1.1 Structure de la spectrine: l'unité répétitive ou « spectrin repeat »	21
III.2.2 Les sites et domaines de la spectrine.....	23
III.2.2.1 L'interaction des différentes chaînes de spectrine	23
III.2.2.1.1 Le site de nucléation: formation du dimère $\alpha\beta$	23
III.2.2.1.2 Le site de tétramérisation	24
III.2.2.2 L'interaction de la spectrine avec d'autres protéines	25
III.2.2.2.1 Le complexe Spectrine-Actine	25
III.2.2.2.2 Les sites d'ancrages de la spectrine à la membrane plasmique.....	26
III.2.2.2.2.1 Le domaine de liaison à la protéine 4.1	26
III.2.2.2.2.2 Le domaine de liaison à l'ankyrine	26
III.2.2.2.2.3 L'interaction directe de la spectrine à la membrane : le domaine PH.....	28
III.2.2.2.3 Les domaines EF-hand et la fixation du calcium	29
III.2.2.2.4 Le domaine SH3.....	30
III.2.2.2.5 Le domaine de fixation à la calmoduline	32
III.2.2.2.6 La boucle de la chaîne α II Σ 1	32
III.2.2.2.7 La boucle CCC (Caspase Calmoduline Calpaïne)	33
III.2.3 Les modifications post traductionnelles de la spectrine.....	35
III.2.3.1 Le clivage de la spectrine par des protéases.....	35
III.2.3.1.1 Le clivage par des calpaïnes.....	35
III.2.3.1.2 Le clivage par la caspase3	37
III.2.3.1.3 Le clivage pathologique de la spectrine	38
III.2.3.2 La phosphorylation.....	38
IV Les fonctions de la spectrine	39
IV.1 Les fonctions du squelette membranaire.....	39
IV.2 Les modèles animaux déplétés en spectrine: effet sur la viabilité et le développement	40
IV.2.1 La drosophile : <i>D. melanogaster</i>	40
IV.2.2 Le nématode : <i>C. elegans</i>	41
IV.2.3 Le poisson : <i>Danio rerio</i>	43
IV.2.4 Chez les mammifères : l'homme, la souris	44
IV.2.4.1 La spectrine et la stabilité membranaire	45

IV.2.4.2 La Spectrine et l'organisation de la membrane.....	45
IV.2.4.3 La spectrine et le remodelage de la membrane	49
IV.2.4.4 La spectrine et l'adhérence cellulaire.....	50
IV.2.4.4.1 Les interactions cellule-cellule.....	50
IV.2.4.4.2 Les interactions cellule matrice extra-cellulaire	52
IV.2.4.5 La spectrine et la polarisation	53
IV.2.4.6 La spectrine : une machine accumulatrice	55
IV.2.4.7 La spectrine et le transport intracellulaire.....	56
IV.2.4.7.1 La spectrine dans le trafic intracellulaire	58
du Réticulum Endoplasmique vers le Golgi.....	58
IV.2.4.7.2 La spectrine dans l'adressage de vésicules du Golgi vers la membrane plasmique	58
IV.2.4.8 La spectrine et l'endocytose / exocytose.....	61
IV.2.4.9 La spectrine et le noyau	61
OBJECTIFS	64
MATERIELS ET METHODES	67
I Matériels	68
I.1 Les anticorps	68
I.1.1 Les anticorps primaires	68
I.1.2 Les anticorps secondaires	68
I.2 Les agents de transfection.....	70
I.3 Les SiARN	70
II Méthodes générales de culture cellulaire	72
II.1 La lignée WM-266.....	72
II.2 Le passage des cellules	72
II.3 La congélation et décongélation des cellules	72
III Méthodes générales de biochimie	73
III.1 La lyse des cellules.....	73
III.2 Le dosage protéique	73
III.3 Electrophorèse et Western blot	74
IV La transfection des cellules WM266 par les SiARN	75
IV.1 La préparation du mélange de transfection	75
IV.2 La préparation des cellules à transfecter	76
V Immunomarquage pour une analyse en Cytometrie en Flux.....	76
VI Immunomarquage pour une analyse en microscopie	77
VI.1 Traitement des cellules avant marquage	77
VI.2 Le marquage des cellules	77
VII L'étude du cycle cellulaire	78
VII.1 La préparation des cellules pour l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux	78
VII.2 Le marquage de l'ADN par l'iodure de propidium et l'analyse en cytométrie en flux	78
VIII L'étude de l'apoptose	79
VIII.1 L'analyse du SubG1 du cycle cellulaire.....	80
VIII.2 Analyse de la fragmentation de l'ADN : L'effet TUNEL.....	81
VIII.3 Le DioC6 : l'analyse du $\Delta\psi$ de la membrane mitochondriale.....	82

IX L'adhérence statique des cellules	83
IX.1 Préparation des cellules.....	83
IX.1.1 Le marquage des cellules témoin avec le Hoechst 33342.....	83
IX.1.2 Le marquage des cellules transfectées avec la calcéine AM	84
IX.2 Tests d'adhérence.....	84
IX.3 L'expérience d'adhérence en présence d'anticorps bloquants des intégrines.....	85
X La migration des cellules	85
X.1 Tests de migration	86
X.2 La récupération des cellules migrantes pour comptage par la cytométrie en flux ...	86
XI Le fractionnement cellulaire : Extraction nucléaire cytoplasme des cellules transfectées.....	87
XII L'étude de l'expression de protéines membranaires à la surface des cellules.....	88
RESULTATS	91
I La présentation du modèle utilisé pour l'étude des fonctions de la spectrine αII	92
I.2 La présentation des mises au point concernant la technique des SiARN	93
I.2.1 Les mises au point des transfections.....	93
I.2.2 Choix des SiARN ciblant la spectrine	95
II Mise en évidence de la déplétion de la spectrine αII par différentes techniques.....	96
II.1 Etude cinétique de l'efficacité de SiARN dirigés contre la spectrine α II par western blot.....	96
II.2 La diminution du taux de spectrine α II observée par cytométrie en flux	97
II.3 La diminution du taux de spectrine α II observée par immuno fluorescence.....	102
III Les premiers résultats obtenus lors des mises au point du modèle.....	103
IV L'étude de la prolifération des cellules : l'apoptose et le cycle cellulaire	104
IV.1 La prolifération cellulaire : Comptage des cellules par cytométrie en flux	104
IV.2 L'étude de l'apoptose par deux analyses différentes: l'effet TUNEL (fragmentation de l'ADN) ou la mesure du potentiel de membrane mitochondriale	107
IV.2.1 L'effet TUNEL : mesure de la fragmentation de l'ADN.....	107
IV.2.2 La mesure du potentiel de membrane mitochondriale $\Delta\Psi$ grâce à un marqueur le DioC6	109
IV.3 L'étude du cycle cellulaire par deux techniques différentes.....	111
IV.3.1 L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	111
IV.3.2 L'analyse du cycle cellulaire par western blot et détection de la phosphorylation de la protéine rétinoblastome et ainsi que des protéines comme p21 et p15 16 18.....	113
IV.4 Les expériences de la présence de la spectrine α II dans le noyau des cellules WM-266.....	119
V L'étude de l'adhérence, de l'étalement ainsi que de la migration des cellules	121
V.1 L'adhérence statique des cellules	121
V.2 L'étalement des cellules	124
V.3 La migration des cellules.....	126
VI L'étude de l'expression des intégrines présentes dans les cellules WM-266	128
VI.1 L'expression de différentes intégrines à la surface des cellules en cytométrie en flux et par western blot.....	128
VI.2 L'implication des intégrines dans l'adhérence des cellules WM-266	132
VI.2 La localisation des intégrines par immunofluorescence	133

DISCUSSION	138
I Discussion sur les techniques utilisées pour obtenir et vérifier les résultats	139
I.1 Choix de la forme des SiARN et des conditions de transfection utilisés pour dépléter la spectrine α II.....	139
I.2 La détection de la déplétion en spectrine α II	140
-par dosage des ARN messagers de la protéine cible.....	140
-par western blot.....	141
-par cytométrie en flux	141
-par immunofluorescence en microscopie.....	141
I.3 Les premières observations en microscopie	141
II La spectrine αII et son implication dans la forme des cellules	142
III La spectrine αII et le réseau d'actine	143
IV L'adhérence des cellules et la spectrine αII	145
IV.1 La spectrine et l'adhérence dans un aspect quantitatif.....	145
IV.2 La spectrine et l'adhérence dans un aspect qualitatif.....	147
IV.3 L'organisation des points focaux et le regroupement des protéines	147
V La prolifération et spectrine αII: Apoptose et Cycle cellulaire	148
V.1 La mort cellulaire et la spectrine α II	148
V.2 Le cycle cellulaire et la spectrine α II	149
V.3 La présence de la spectrine α II dans le noyau	152
VI Effet direct ou secondaire de la spectrine αII sur la polymérisation de l'actine la prolifération et l'adhérence	154
VI.1 La spectrine α II a un rôle direct sur les différents processus cellulaires	154
VI.2 Un lien étroit entre les processus cellulaires observés	155
VI.2.1 La prolifération et le réseau d'actine.....	155
VI.2.2 L'adhérence et le réseau d'actine.....	155
VI.2.3 L'adhérence et la prolifération	158
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	161
I Travaux sur la spectrine αII et son environnement direct afin d'expliquer les phénotypes	163
I.1 Etude de l'expression et de la localisation des partenaires directs de la spectrine ..	163
I.2 Etude des domaines de la spectrine α II.....	163
II Etudes des processus cellulaires pour expliquer l'implication de la spectrine αII 164	
II.1 Etude de la polymérisation de l'actine	164
II.2 Etude de l'adhérence	164
II.3 Etude de la prolifération cellulaire	165
II.4 Etude d'autres processus cellulaires	165
Tables des figures et des tableaux	167
BIBLIOGRAPHIE	177
ARTICLES	203

INTRODUCTION

I La membrane et le squelette membranaire dépendant de la spectrine

Au cours de l'évolution, les organismes pluricellulaires se sont adaptés à leur environnement. L'émergence de nouvelles fonctions, issues de cellules bien spécifiques, prodigue à ces organismes une plus grande complexité. L'apparition de nouvelles fonctions s'est faite en partie grâce à l'évolution des membranes plasmiques, par leur composition et leur organisation.

Cette membrane est constituée d'une bicouche de lipides intégrant un grand nombre de protéines spécifiques à chaque type cellulaire. Elle est soutenue par un squelette membranaire (sous-membranaire) lui conférant une robustesse mais laissant à cette membrane sa propriété de « mosaïque fluide » (Singer, S.J. et Nicolson, G.L. 1972). Une telle structure a été caractérisée pour la première fois à la membrane du globule rouge.

II.1 Le squelette membranaire dépendant de la spectrine dans le globule rouge

La composition de ce squelette membranaire érythrocytaire ainsi que sa structure sont bien décrites (Yu, J., Fischman, D.A. *et al.* 1973). Il est composé en majeure partie par une protéine : la spectrine (Marchesi, V.T. et Steers, E., Jr. 1968). La spectrine érythroïde est constituée de deux longues chaînes flexibles, les sous-unités α et β , qui s'associent latéralement de façon antiparallèle, et forment un hétéro-dimère $\alpha\beta$. Les hétéro-dimères s'assemblent tête-à-tête pour former des hétéro-tétramères qui constituent les filaments du réseau. Ces longs filaments flexibles de 200 nm de longueur et 3 - 6 nm de large sont connectés entre eux par des filaments d'actine de 40 nm et d'autres protéines (nœuds de ce réseau) pour former un réseau polygonal composé de cinq à sept filaments de spectrine (Liu, S.C., Derick, L.H. *et al.* 1987) (figure 1 en page 14).

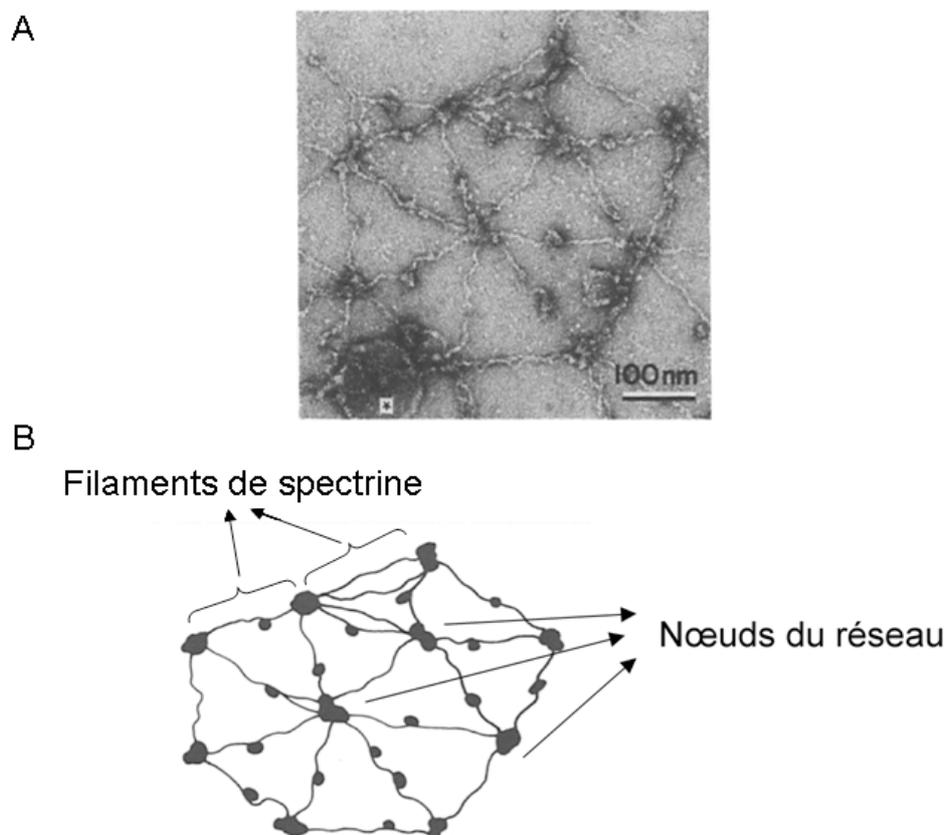


Figure 1: Image du réseau membranaire de spectrine obtenue en microscopie électronique (A). Représentation schématique de ce réseau (B) (d'après (Liu, S.C., Derick, L.H. *et al.* 1987)). Les nœuds du réseau correspondent aux liens entre la spectrine et l'actine.

Les protéines présentes dans les nœuds du réseau sont: l'adducine, la tropomyosine, la tropomoduline, ces protéines contrôlent ou régulent l'interaction spectrine-actine. D'autres protéines présentes dans ces complexes protéiques comme les protéines 4.1 et p55 connectent la spectrine à la protéine transmembranaire glycophorine C.

La région dense au milieu des tétramères de spectrine correspond à un autre site d'interaction avec un complexe protéique constitué de la bande 3 et de l'ankyrine (figures 2 et 3 en page 15). L'ankyrine liée à la bande 3 et à la glycoprotéine RHAG (protéines transmembranaires) interagit avec la sous-unité β pour former une seconde connexion à la membrane plasmique (Ungewickell, E. et Gratzner, W. 1978; Shotton, D.M., Burke, B.E. *et al.* 1979; Liu, S.C. et Palek, J. 1980; Winkelmann, J.C. et Forget, B.G. 1993; Delaunay, J. 2007).

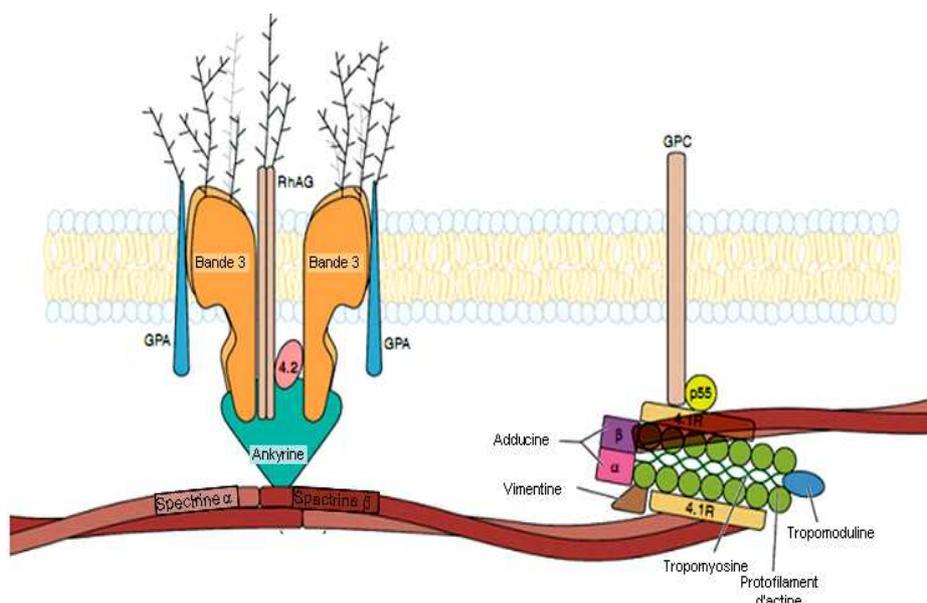


Figure 2: Schéma du squelette membranaire dépendant de la spectrine dans le globule rouge (image tirée de la revue de Xiuli An et Narla Mohandas (2008)).

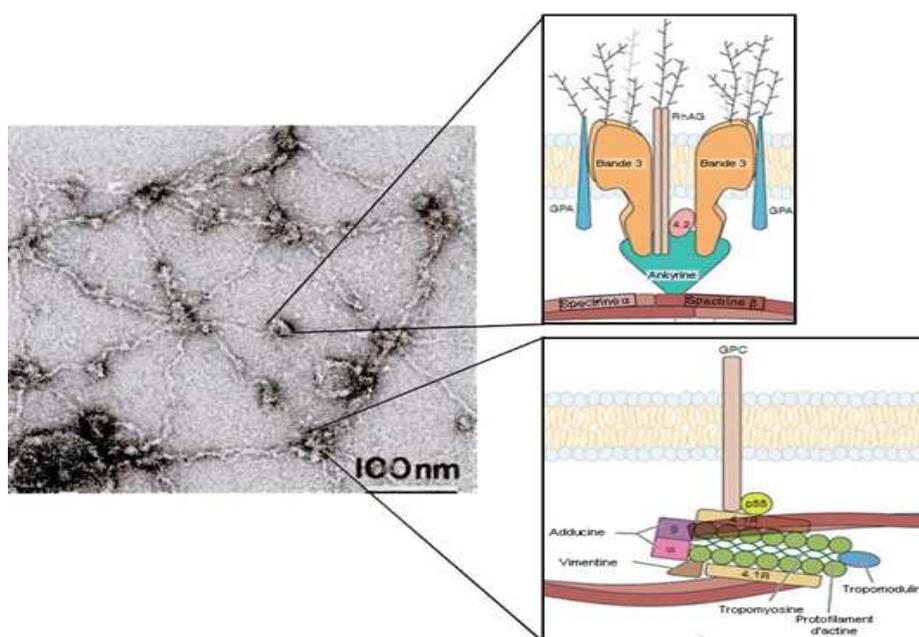


Figure 3: Description des nœuds du réseau de spectrine dans le globule rouge.

Dans le globule rouge, les rôles du squelette membranaire et en particulier de la spectrine sont bien connus : ils offrent à la bicouche lipidique, une troisième couche sous-membranaire lui conférant une plus grande rigidité ; ils jouent un rôle important dans la forme, la flexibilité et la résistance de la membrane. Ces données

ont été fournies grâce à l'étude d'anémies hémolytiques héréditaires, telles que la sphérocytose et l'elliptocytose héréditaires qui sont associées à des défauts quantitatifs ou qualitatifs des principaux constituants du squelette membranaire, notamment la spectrine, la protéine 4.1, l'ankyrine et la bande 3 (Delaunay, J. 2007).

II.2 Le squelette membranaire dépendant de spectrine dans les cellules nucléées

Ce squelette membranaire est en fait présent dans toutes les cellules : les composants de cette structure identifiée dans l'érythrocyte, ou d'autres isoformes /analogues sont exprimées dans toutes les cellules des vertébrés (mammifères, oiseaux, amphibiens, reptiles, poissons) (Lazarides, E. et Nelson, W.J. 1985; Fishkind, D.J., Bonder, E.M. *et al.* 1990). Ils sont présents chez les invertébrés (drosophile, nématode) (Byers, T.J., Brandin, E. *et al.* 1992). Des immuno-analogues de ces différents composants sont détectés chez les plantes et les champignons (Michaud, D., Guillet, G. *et al.* 1991 ; Faraday, C.D. et Spanswick, R.M. 1993).

Dans le globule rouge, il n'y a qu'un seul type de squelette membranaire. Il n'est formé que d'une seule forme de spectrine α et de spectrine β offrant une forme unique de tétramère de spectrine. Dans les cellules non-érythroïdes, ils co-existent différents squelettes membranaires dépendant de la spectrine : en effet, plusieurs spectrines α et plusieurs spectrines β sont exprimées. Il en est de même pour les ankyrines, les protéines 4.1 ou les adducines. Ces nombreuses isoformes offrent aux cellules nucléées une grande diversité dans la composition possible du squelette membranaire. Ces structures ont été identifiées non seulement à la membrane plasmique, mais également dans différents compartiments cellulaires (Golgi, vésicules, noyau). La diversité des squelettes membranaires dans les cellules non érythroïdes est en adéquation avec la diversité des membranes dans ces cellules. On peut penser que chaque type de membrane (selon le compartiment cellulaire et le type cellulaire) a un squelette membranaire spécifique qui lui permet d'assurer ses fonctions propres (Bennett, V. et Baines, A.J. 2001).

Cependant les fonctions de ces squelettes membranaires non érythroïdes sont moins bien connus. Ils jouent vraisemblablement les mêmes rôles que dans le

globule rouge dans l'architecture de la cellule mais comme ses constituants sont impliqués dans de nombreuses interactions avec diverses protéines référencées comme des pompes et des canaux ioniques, des molécules d'adhérence, et des récepteurs, leurs fonctions sont probablement plus vastes que dans le globule rouge.

III La spectrine : un élément essentiel du squelette membranaire

III.1 La famille multigénique de la spectrine : les gènes et les isoformes

III.1.1 Chez les mammifères

Chez l'homme, il existe deux gènes codant pour les sous-unités α et cinq pour les sous-unités β (voir Tableau 1 en page 19).

Les gènes codant pour les spectrines α :

- Le gène SPTA1 localisé sur le chromosome 1 code pour la sous-unité αI essentiellement exprimée dans le globule rouge. Ce gène a une taille de 80 kb avec 52 exons. La protéine produite dans le globule rouge, $\alpha I\Sigma 1$, (242 000 copies) possède 2 429 acides aminés, soit une masse calculée de 281 kDa. Une isoforme $\alpha I\Sigma^*$, dont la séquence n'est pas connue, est exprimée par ce gène dans le cervelet de la souris (Wasenius, V.M., Saraste, M. *et al.* 1989; Sahr, K.E., Laurila, P. *et al.* 1990; Kotula, L., Laury-Kleintop, L.D. *et al.* 1991; Clark, M.B., Ma, Y. *et al.* 1994).

- Le gène SPTAN1 qui est sur le chromosome 9, code pour la protéine αII , il a une taille de 80 kb et possède 61 exons. La spectrine αII est constituée de 2 472 acides aminés pour l'isoforme la plus longue. Il y a quatre isoformes de la chaîne αII connues, $\Sigma 1$ à 4. Les isoformes $\alpha II\Sigma 1$ et $\alpha II\Sigma 2$ sont exprimées dans toutes les cellules non érythroïdes (14), $\alpha II\Sigma 3$ est présente dans le cerveau, le cœur et les muscles et $\alpha II\Sigma 4$ n'a été retrouvée que dans le cerveau et le muscle (Cianci, C.D., Zhang, Z. *et al.* 1999).

Les gènes codant pour les spectrines β :

- Le gène SPTB, qui est sur le chromosome 14, code pour la sous unité βI . Ce gène, de plus de 100 kb, possède 36 exons et code pour l'isoforme $\beta I\Sigma 1$ (2 137 acides aminés soit une masse calculée de 246 kDa) présente dans le globule rouge en 242 000 copies. Il code également une isoforme particulière, $\beta I\Sigma 2$ exprimée dans

le cerveau et le muscle, cette isoforme possède dans sa partie C terminale une séquence unique de 21 kDa contenant un domaine PH (Prchal, J.T., Papayannopoulou, T. *et al.* 1990; Winkelmann, J.C., Costa, F.F. *et al.* 1990; Beck, K.A., Buchanan, J.A. *et al.* 1994).

- Le gène SPTBN 1 sur le chromosome 2 code pour deux isoformes, $\beta\text{II}\Sigma 1$ (avec un domaine PH) présente dans toutes les cellules non érythroïdes et $\beta\text{II}\Sigma 2$ exprimée dans le cœur et le cerveau (sans domaine PH) (Clark, M.B., Ma, Y. *et al.* 1994).

- Le gène SPTBN 2 sur le chromosome 11 codant pour la spectrine βIII , deux isoformes sont répertoriées : $\beta\text{III}\Sigma 1$ exprimée dans beaucoup de tissus comme le cerveau, le rein, le pancréas, le poumon et $\beta\text{III}\Sigma 2$ retrouvée essentiellement dans le cerveau.

- Le gène SPTBN 3 sur le chromosome 19 code pour six isoformes de la spectrine βIV qui sont toutes exprimées dans le cerveau.

- Le gène SPTBN 4 sur le chromosome 15 code pour la spectrine βV retrouvée principalement dans le cervelet, la moelle épinière et dans la rétine (Stabach, P.R. et Morrow, J.S. 2000).

III.1.2 Chez d'autres organismes

III.1.2.1 Chez les oiseaux et les amphibiens

Les oiseaux et les amphibiens ont des érythrocytes nucléés. Ils ne possèdent qu'un seul gène α homologue au gène codant pour la chaîne αII des mammifères. Le produit de ce gène peut s'associer dans le globule rouge avec le produit du gène βI ou dans les autres cellules avec le produit du gène βII . Ces organismes possèdent le même nombre de spectrine β que les mammifères avec des gènes codant pour la βIII , βIV et la βV spectrine.

Nom Gène	Expression tissulaire	chromosome	référence
$\alpha I\Sigma 1$ SPTA	érythrocyte	1q21	(Sahr, K.E.,Laurila, P. <i>et al.</i> 1990)
$\alpha I\Sigma^*$ SPTA	cerveau	1q21	(Clark, M.B.,Ma, Y. <i>et al.</i> 1994)
$\alpha II\Sigma 1$ SPTNA1	cellule non érythroïde	9q33	(Moon, R.T. et McMahon, A.P. 1990)
$\alpha II\Sigma 2$ SPTNA1	cellule non érythroïde	9q33	(Moon, R.T. et McMahon, A.P. 1990)
$\alpha II\Sigma 3$ SPTNA1	cerveau, cœur, muscle	9q33	(Cianci, C.D.,Zhang, Z. <i>et al.</i> 1999)
$\alpha II\Sigma 4$ SPTNA1	cerveau, muscle	9q33	(Cianci, C.D.,Zhang, Z. <i>et al.</i> 1999)
$\beta I\Sigma 1$ SPTB	érythrocyte	14q23	(Winkelmann, J.C.,Chang, J.G. <i>et al.</i> 1990)
$\beta I\Sigma 2$ SPTB	cerveau, cœur, muscle	14q23	(Prchal, J.T.,Papayannopoulou, T. <i>et al.</i> 1990)
$\beta II\Sigma 1$ SPTNB1	cellule non érythroïde	2p21	(Hu, R.J.,Watanabe, M. <i>et al.</i> 1992)
$\beta II\Sigma 2$ SPTNB1	cœur, muscle	2p21	(Hayes, N.V.,Scott, C. <i>et al.</i> 2000)
ELF	????	cerveau, foie embryonnaire	(Tang, Y.,Katuri, V. <i>et al.</i> 2002)
$\beta III\Sigma 1$ SPTBN2	cerveau, rein, placenta, pancréas, foie, poumon	11q13	(Stankewich, M.C.,Tse, W.T. <i>et al.</i> 1998)
$\beta III\Sigma 2$ SPTBN2	cerveau	11q13	(Ohara, O.,Ohara, R. <i>et al.</i> 1998)
$\beta IV\Sigma 1$ SPTBN3	cerveau	19q13.3	(Berghs, S.,Aggujaro, D. <i>et al.</i> 2000)
$\beta IV\Sigma 2$ SPTBN3	cerveau	19q13.3	(Berghs, S.,Aggujaro, D. <i>et al.</i> 2000)
$\beta IV\Sigma 3$ SPTBN3	cerveau	19q13.3	(Berghs, S.,Aggujaro, D. <i>et al.</i> 2000)
$\beta IV\Sigma 4$ SPTBN3	cerveau	19q13.3	(Berghs, S.,Aggujaro, D. <i>et al.</i> 2000)
$\beta IV\Sigma 5$ SPTBN3	cerveau	19q13.3	(Berghs, S.,Aggujaro, D. <i>et al.</i> 2000)
βV SPTBN4	cervelet, corde spinale, rétine	15q21	(Stabach, P.R. et Morrow, J.S. 2000)

Tableau 1 : Les isoformes connues de la spectrine érythroïde et non érythroïde

III.1.2.2 Chez le poisson *Danio rerio*

Comme chez les oiseaux, les poissons possèdent un seul gène codant pour la sous unité α (spna2) et plusieurs gènes pour la sous unité β . Ce poisson est utilisé comme modèle d'étude de la différenciation érythroïde.

III.1.2.3 Chez la Drosophile *Drosophila melanogaster*

La chaîne α chez la drosophile est codée par un seul gène I(3) dre3. La protéine α possède 64 % d'identité avec la spectrine α II humaine.

En ce qui concerne les chaînes β , elles sont codées par deux gènes :

- un gène β -G codant pour une spectrine β de 265 kDa qui partage 55% d'identité avec la spectrine β II humaine.

- un gène Karst qui code pour une β de très grande taille de 430 kDa appelée aussi β -H (β heavy) qui est l'homologue de la chaîne β V.

Dans les cellules épithéliales de la drosophile, la chaîne β -G (β II) a une localisation basolatérale et la chaîne β -H est apicale (Thomas, G.H. et Kiehart, D.P. 1994).

III.1.2.4 Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

La chaîne α est codée par le gène spc-1, cette spectrine est similaire à la spectrine α II et comme chez la drosophile, le nématode possède deux gènes codant pour la spectrine β .

- le gène unc-70 ou bgs-1 qui code pour une protéine très similaire à la spectrine β II.

- le gène sma-1 qui code pour la spectrine β -H.

La chaîne β -H chez le nématode est, comme chez la drosophile, localisée au pôle apical de la plupart des cellules épithéliales. Elle est bien observée dans l'épiderme de l'embryon et durant la morphogénèse de différents tissus épithéliaux de l'embryon de *C.elegans*: comme par exemple dans les cellules du pharynx, de l'intestin au cours du développement (McKeown, C., Praitis, V. *et al.* 1998).

III.2 L'architecture des sous-unités de la spectrine

III.2.1 L'aspect structural de la spectrine : structure et domaines

III.2.1.1 Structure de la spectrine: l'unité répétitive ou « spectrin repeat »

Malgré la grande diversité des sous-unités α et β , toutes les isoformes partagent la même architecture : les sous-unités α sont constituées de 22 régions avec 20 régions structurellement très semblables appelées unités répétitives. Les sous-unités β possèdent 17 unités répétitives avec une exception pour la spectrine β -H ou β V qui en possède 30.

Ces unités répétitives sont composées d'environ 106 acides aminés, la structure de l'unité répétitive a été établie pour la première fois par rayon X, (Yan, Y., Winograd, E. *et al.* 1993) et ensuite par RMN (Pascual, J., Pfuhl, M. *et al.* 1997). L'unité répétitive contient 3 hélices α , A, B et C séparées par de courtes boucles AB et BC. Chaque hélice α est composée d'environ 30 acides aminés (AA) (figure 4 ci-dessous) avec l'hélice A (28 AA) et l'hélice B (34 AA) antiparallèles, tandis que l'hélice C (30 AA) vient dans le sillon formé par les hélices A et B. L'ensemble de ces trois hélices α forment une structure tri-hélicoïdale d'une longueur de 5 nm et d'une largeur de 2 nm.

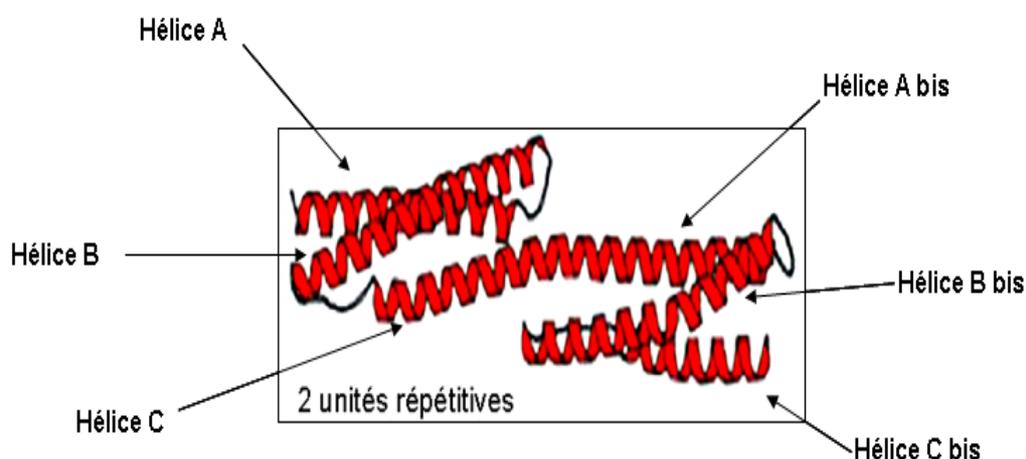


Figure 4: Représentation de 2 sous-unités répétitives constituées des hélices α A, B, C de la première sous-unité et des hélices A bis, B bis, C bis de la seconde sous-unité (image tirée de la revue de Van Bennett et Anthony Baines (2001)).

Les unités répétitives sont connectées les unes aux autres par une longue hélice qui correspond, en fait, à l'hélice C associée à l'hélice A de l'unité répétitive suivante. Cette structure est très stable et résiste à la protéolyse (DeSilva, T.M., Harper, S.L. *et al.* 1997).

La séquence primaire de ces unités répétitives est peu conservée à l'exception de la leucine en position 26 dans l'hélice C et du tryptophane 45 dans l'hélice A (figure 5 ci-dessous).

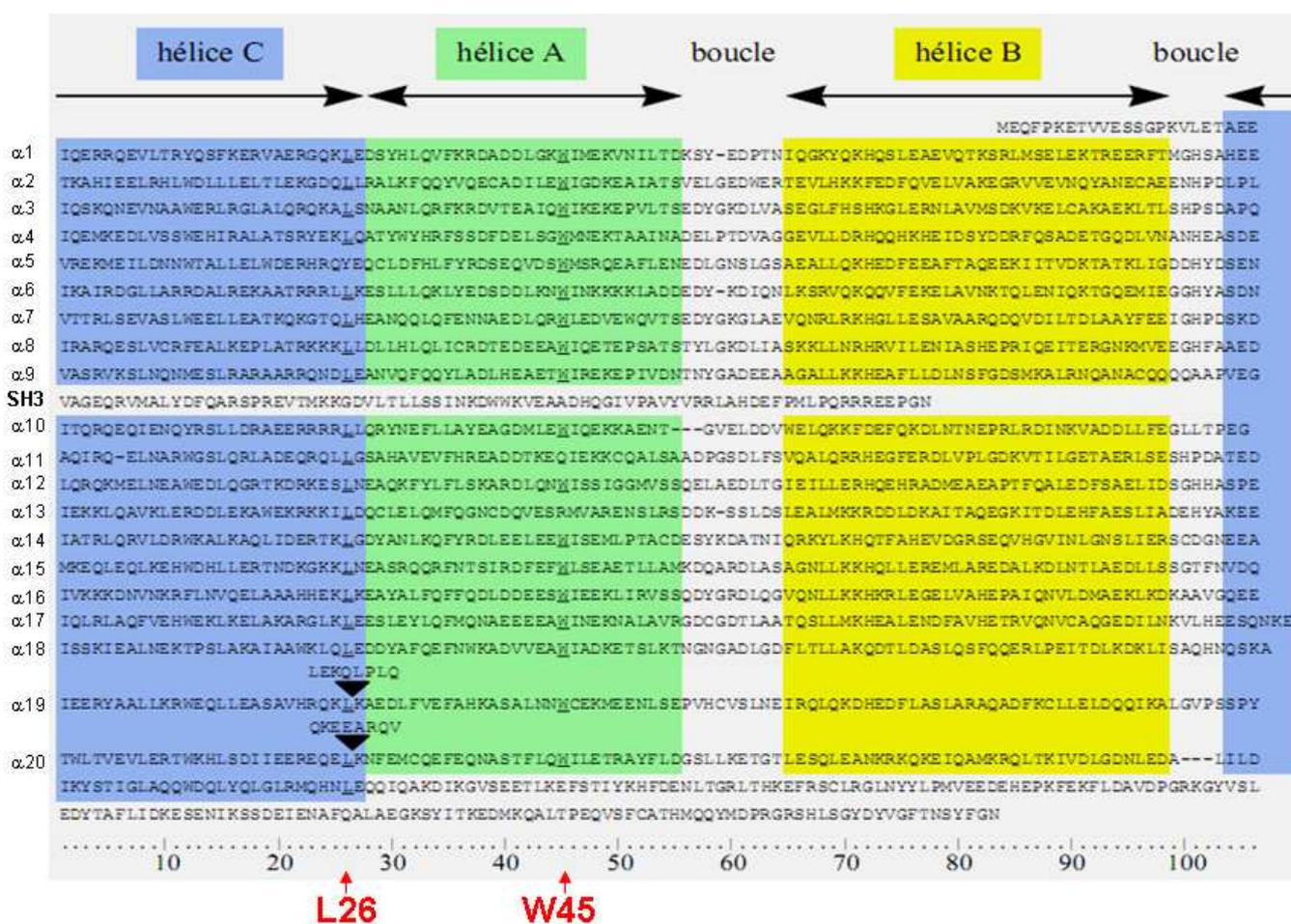


Figure 5: Représentation des alignements de séquences des différentes unités répétitives de la spectrine αI . L'unité répétitive $\alpha 1$ commence à l'hélice A jusqu'à la fin de l'hélice C, puis vient l'unité répétitive $\alpha 2$. Seuls la leucine 26 dans l'hélice C et le tryptophane 45 dans l'hélice A présentent une forte conservation. Les séquences représentées au dessus des flèches noires représentent les insertions de 8 acides aminés qui sont impliqués dans la formation du dimère de spectrine $\alpha\beta$. Alignement obtenu dans la thèse de Gaël NICOLAS, 199 tiré de l'article suivant (Sahr, K.E., Laurila, P. *et al.* 1990).

III.2.2 Les sites et domaines de la spectrine

III.2.2.1 L'interaction des différentes chaînes de spectrine

III.2.2.1.1 Le site de nucléation: formation du dimère $\alpha\beta$

La structure du dimère de la spectrine érythroïde est bien connue : les monomères α et β s'associent de façon antiparallèle pour former un hétéro-dimère $\alpha\beta$. Cette interaction implique les unités répétitives $\alpha 17$ à $\alpha 20$ de l'extrémité C terminale de la chaîne α et les unités répétitives $\beta 1$ à $\beta 4$ de l'extrémité N terminale de la chaîne β , ce domaine d'interaction est appelé: site de nucléation (figure 6 en page 24).

Il est à noter que les hélices A des unités répétitives $\alpha 19$ et $\alpha 20$ ainsi que des unités répétitives $\beta 1$ et $\beta 2$ possèdent une insertion de 8 acides aminés nécessaire à l'interaction inter chaîne (figure 5 en page 22). Lorsque ces huit acides aminés ne sont plus présents sur des peptides recombinants mimant le site d'interaction, ces peptides n'interagissent plus ensemble. Cette interaction est très forte, en particulier entre les unités répétitives $\alpha 20$ et $\beta 1$ avec une constante de dissociation, K_d de 10 nM (Speicher, D.W., Weglarz, L. *et al.* 1992; Ursitti, J.A., Kotula, L. *et al.* 1996). Le rôle des unités répétitives adjacentes $\alpha 17$, $\alpha 18$ et $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ est de renforcer cette interaction entre les chaînes α et β (Viel, A. et Branton, D. 1996).

Le site de nucléation initie la dimérisation des deux chaînes α et β qui se propage sur toute la longueur des deux chaînes pour former le dimère de spectrine. Ce mécanisme, décrit pour la spectrine érythroïde, semble être le même dans les cellules non érythroïdes, puisque l'insertion des huit acides aminés dans les hélices A des unités répétitives $\alpha 19$ et $\alpha 20$, $\beta 1$ et $\beta 2$ est conservée dans les spectrines non érythroïdes.

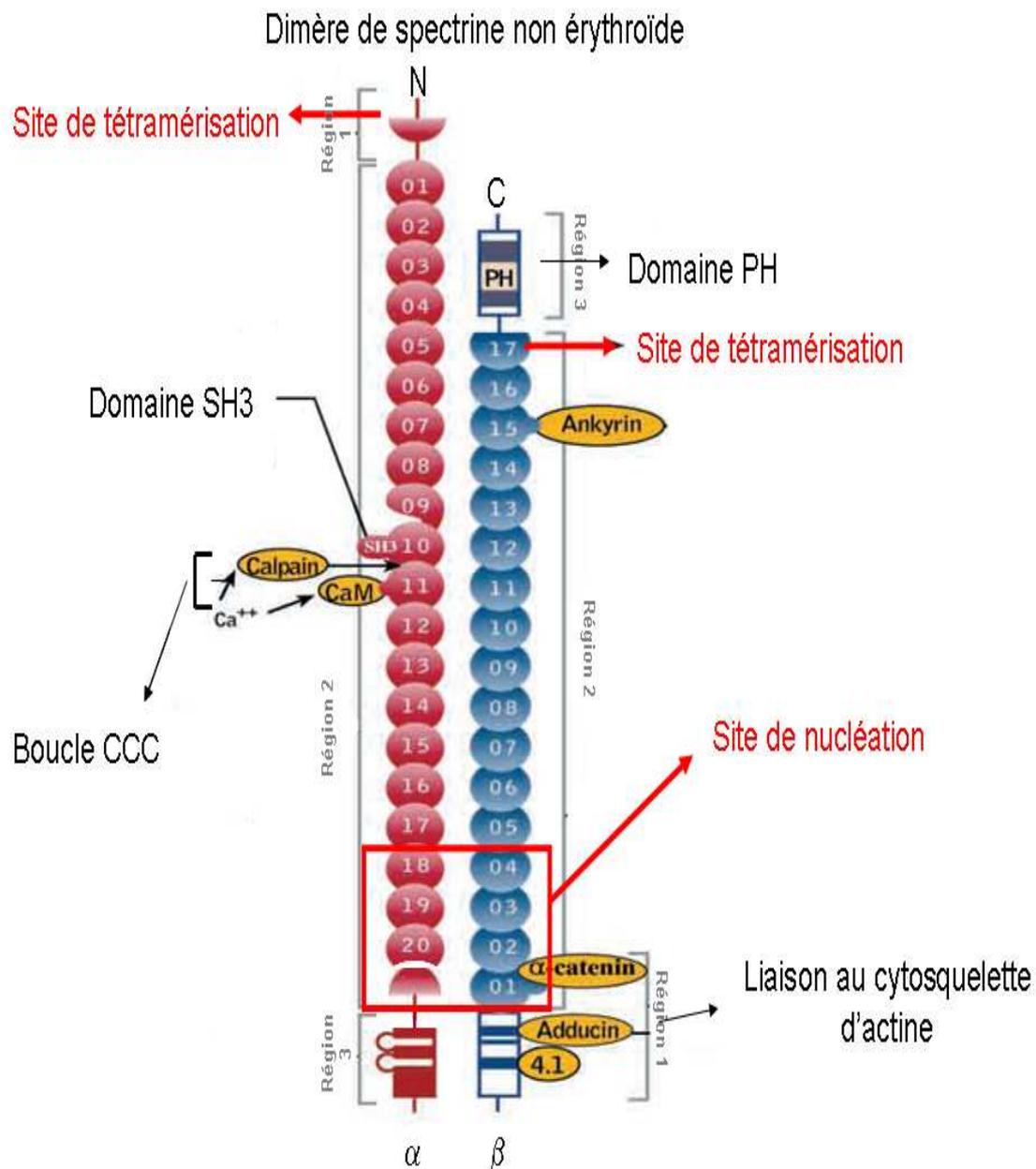


Figure 6: Représentation des différents sites et domaines de la spectrine α II/ β II (image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).

III.2.2.1.2 Le site de tétramérisation

Le squelette membranaire dans le globule rouge est constitué de tétramères de spectrine d'une longueur de 200 nm. La formation du tétramère résulte de l'interaction entre l'extrémité NH_2 de la chaîne α et l'extrémité COOH de la chaîne β (figure 6 ci-dessus). Précisément, cette interaction implique l'hélice C isolée de la chaîne α avant la première unité répétitive $\alpha 1$ et les hélices A et B de la dernière

unité répétitive incomplète $\beta 17$ de la chaîne β . Cette interaction reconstitue une structure triple hélice comme dans les unités répétitives classiques. La constante de dissociation est de l'ordre de $1 \mu\text{M}$.

De nombreuses mutations localisées dans les hélices formant le site de tétramérisation ont été décrites dans des anémies hémolytiques héréditaires comme l'elliptocytose. Ces mutations sont responsables d'un défaut de formation du tétramère et sont associées à une fragilité membranaire. Dans le globule rouge soumis à des forces de cisaillement, il a été montré que des dimères pouvaient changer de partenaire pour reformer un tétramère (An, X., Guo, X. *et al.* 2004). Ces résultats montrent la dynamique du tétramère de spectrine et son rôle dans la résistance et la flexibilité de la membrane plasmique (Ungewickell, E. et Gratzer, W. 1978; Shotton, D.M., Burke, B.E. *et al.* 1979; Liu, S.C. et Palek, J. 1980; Gaetani, M., Mootien, S. *et al.* 2008).

III.2.2.2 L'interaction de la spectrine avec d'autres protéines

III.2.2.2.1 Le complexe Spectrine-Actine

En microscopie électronique, les filaments de la spectrine érythroïde constituent un réseau dont les nœuds correspondent à de courts filaments de F-actine. Ces filaments sont constitués de 12 à 14 monomères d'actine qui interagissent essentiellement avec la chaîne β . Le domaine d'interaction pour l'actine est localisé entre les résidus Alanine 47 et Lysine 186 de la chaîne β , qui contient deux domaines «CH» pour calponin homology domains (Ohanian, V., Wolfe, L.C. *et al.* 1984; Karinch, A.M., Zimmer, W.E. *et al.* 1990; Li, Z., Patil, G.S. *et al.* 1993; Djinovic Carugo, K., Banuelos, S. *et al.* 1997; Banuelos, S., Saraste, M. *et al.* 1998). La première unité répétitive de la chaîne β ($\beta 1$) qui est impliquée dans la formation du dimère joue aussi un rôle dans l'interaction faible avec l'actine (Kd de l'ordre de $250 \mu\text{M}$). Cette interaction est stabilisée par la deuxième unité répétitive de la chaîne β ($\beta 2$) mais aussi par d'autres protéines, en particulier par l'adducine et la protéine 4.1 (Li, X. et Bennett, V. 1996) (figure 6 en page 24).

III.2.2.2.2 Les sites d'ancrages de la spectrine à la membrane plasmique

III.2.2.2.2.1 Le domaine de liaison à la protéine 4.1

La partie N terminale de la chaîne β présente un site de liaison pour la protéine 4.1. Cette protéine joue un rôle de relais entre le squelette membranaire et la protéine p55 et la glycophorine C (Alloisio, N., Dalla Venezia, N. *et al.* 1993; Hemming, N.J., Anstee, D.J. *et al.* 1994).

Outre son rôle de lien vertical avec la membrane plasmique, la protéine 4.1 renforce l'interaction de la spectrine β avec l'actine.

III.2.2.2.2.2 Le domaine de liaison à l'ankyrine

La spectrine interagit de façon indirecte avec des protéines membranaires grâce à l'ankyrine qui est présente sous différentes isoformes (Hryniewicz-Jankowska, A., Czogalla, A. *et al.* 2002). Elle est le lien privilégié de la spectrine à la membrane plasmique car les ankyrines interagissent avec beaucoup de protéines membranaires (figure 7 en page 27) comme par exemple :

- des échangeurs ioniques (AE1 érythroïde, AE2 et AE3 non érythroïde) (Davis, J.Q. et Bennett, V. 1984; Davis, L., Lux, S.E. *et al.* 1989).
- des transporteurs Rh : RhAG (Nicolas, V., Le Van Kim, C. *et al.* 2003), RhBG (Lopez, C., Metral, S. *et al.* 2005).
- une pompe (NA/K ATPase), (Nelson, W.J. et Veshnock, P.J. 1987 ; Davis, L., Lux, S.E. *et al.* 1989 ; Morrow, J.S., Cianci, C.D. *et al.* 1989; Nelson, W.J. et Hammerton, R.W. 1989; Gundersen, D., Orłowski, J. *et al.* 1991; Devarajan, P., Scaramuzzino, D.A. *et al.* 1994).
- des récepteurs (récepteur IP3, ryanodine, NMDA) (Joseph, S.K. et Samanta, S. 1993; Mohler, P.J., Gramolini, A.O. *et al.* 2002).
- des molécules d'adhérence CAM (L1-CAM, CD44, Neurofascine, N-CAM) (Davis, J.Q. et Bennett, V. 1994; Davis, J.Q., Lambert, S. *et al.* 1996).

Les ankyrines possèdent des fonctions très variées suivant l'isoforme et le type cellulaire, allant de la polarisation de protéines membranaires comme les protéines RhBG, NA/K ATPase pour les rendre fonctionnelles, à des fonctions plus structurales

comme la biogénèse des membranes latérales dans les cellules épithéliales (Kizhatil, K. et Bennett, V. 2004).

Il a été démontré, *in vitro*, à l'aide de peptides recombinants que le site de liaison à l'ankyrine se trouve sur la chaîne β et très précisément sur l'hélice B de l'unité répétitive β 15. Cette hélice possède une particularité qui est une absence du résidu tryptophane 45 très conservé dans les autres hélices. L'ankyrine se lie à la chaîne β avec un Kd de 0.25 μ M (Kennedy, S.P., Warren, S.L. *et al.* 1991).

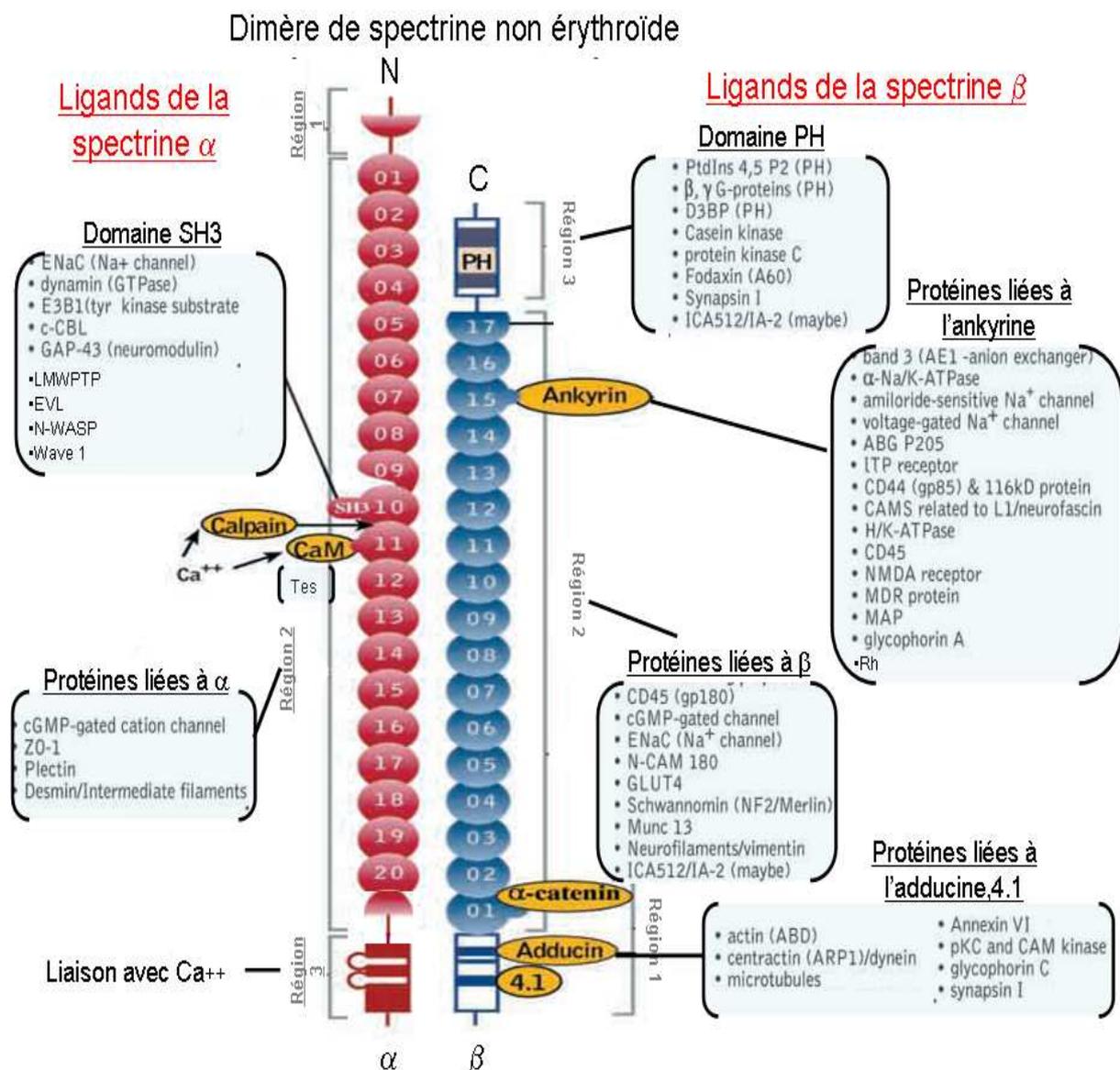


Figure 7: Représentation de quelques protéines interagissant avec le dimère de spectrine α II/ β II (image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000) et complétée par les résultats acquis au laboratoire.

III.2.2.2.3 L'interaction directe de la spectrine à la membrane : le domaine PH

La spectrine interagit avec la membrane plasmique de façon indirecte grâce à des protéines adaptatrices mais elle peut aussi interagir directement avec les phospholipides de la membrane (Lombardo, C.R., Weed, S.A. *et al.* 1994).

L'interaction directe de la spectrine à la membrane est caractérisée par deux domaines MAD1/région1 et MAD2/région3 (Membrane Association Domain) qui sont situés sur la chaîne β (figure 6 en page 274).

Le domaine MAD1/région1 est placé à l'extrémité NH₂ terminale de la chaîne β intégrant la première unité répétitive (β 1) et le domaine MAD2/région3 se trouve dans le domaine PH (Pleckstrin Homology domain) situé à l'extrémité COOH terminale de la chaîne β (figure 8 en page 279). Ce domaine PH constitué d'environ 100 résidus n'est présent que dans certaines isoformes de chaînes β : β I Σ 2 ; β II Σ 1 ; β III Σ 1 ; β V. (Macias, M.J., Musacchio, A. *et al.* 1994). La spectrine β I présente dans le globule rouge ne contient pas de domaine PH. Ces deux domaines sont capables aussi de lier la protéine kinase C (résultats obtenus dans les plaquettes) et d'autres protéines (protéines G, Synapsine I ...) qui jouent un rôle dans la signalisation et l'attachement à la membrane (figure 7 en page 27) (Rebecchi, M.J. et Scarlata, S. 1998).

Chez la Drosophile, une surexpression du domaine PH de la spectrine β ou de l'isoforme entière de la spectrine β avec le domaine PH (β -heavy), provoque une augmentation de la surface de la membrane des cellules de glandes salivaires (Williams, J.A., MacIver, B. *et al.* 2004). Chez le poisson *Danio rerio*, des mutations dans le domaine PH de la spectrine β érythroïde provoquent des défauts d'interaction à la membrane, associés à une sphérocytose (Liao, E.C., Paw, B.H. *et al.* 2000). Cette interaction directe de la spectrine β avec la membrane serait impliquée dans la forme de la cellule.



Figure 8: Représentation en 3 dimensions du domaine PH qui interagit directement à la membrane plasmique (image tirée de la revue de Van Bennett et Anthony Baines (2001)).

III.2.2.2.3 Les domaines EF-hand et la fixation du calcium

L'extrémité COOH terminale de la chaîne α possède deux domaines EF hand (EF-1 et EF-2). Ces domaines sont constitués d'une longue boucle séparant deux hélices α , elles sont associées par paire et fixe le calcium intracellulaire (Wallis, C.J., Wenegieme, E.F. *et al.* 1992). La fixation du calcium provoque une modification structurale (Trave, G., Lacombe, P.J. *et al.* 1995; Trave, G., Pastore, A. *et al.* 1995) (figure 9 en page 30).

Le rôle physiologique des « EF hand domain » de la spectrine n'est pas connu mais les changements de conformation des domaines EF hand engendrés par la fixation du calcium pourrait réguler les interactions se situant à proximité de cette zone, en particulier, la liaison avec l'actine ainsi que l'interaction avec la protéine 4.1 (Fowler, V. et Taylor, D.L. 1980). Cependant cette hypothèse est controversé (Ohanian, V., Wolfe, L.C. *et al.* 1984), il s'avère tout de même que ces EF hand ont un rôle essentiel puisque la délétion de l'extrémité de la chaîne α éliminant le second domaine EF provoque une létalité chez la drosophile (Lee, J.K., Coyne, R.S. *et al.* 1993).

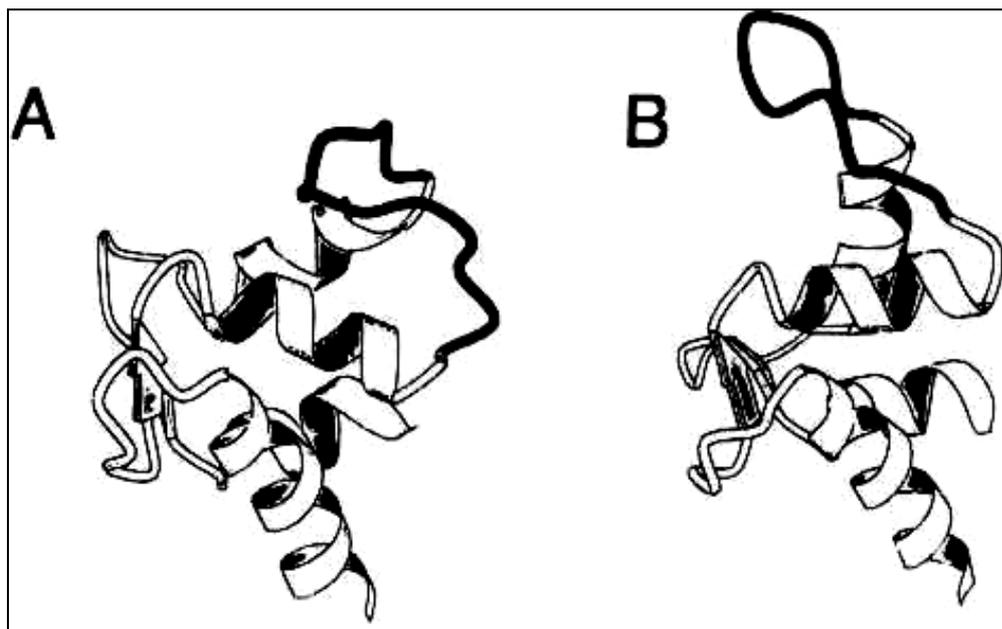


Figure 9: Représentation du domaine EF hand de la spectrine (MOLSCRIPT), sans calcium lié (A) ou avec le calcium (B) (image tirée de l'article de G.Travé (Trave, G.,Lacombe, P.J. *et al.* 1995).

III.2.2.2.4 Le domaine SH3

Les chaînes α possèdent dans la boucle BC de l'unité répétitive $\alpha 9$ un domaine SH3 (Src- Homology domain 3) (Wasenius, V.M.,Saraste, M. *et al.* 1989) (figure 10 en page 31). La chaîne β -H des invertébrés possède également un domaine SH3, les autres chaînes β en sont dépourvues.

Le domaine SH3 des chaînes α II est extrêmement conservé, avec 100% d'identité entre l'humain, le rat, le poulet, le Xénope. Il existe 74 % d'identité entre le domaine SH3 de la chaîne α I et la chaîne α II, chez l'homme, ce qui fait que sa structure tridimensionnelle est bien conservée entre les deux chaînes α .

Les études cristallographiques et en RMN montrent un domaine avec deux feuillets β qui possèdent trois brins β reliés l'un à l'autre de façon antiparallèle (Musacchio, A.,Noble, M. *et al.* 1992; Sadqi, M.,Casares, S. *et al.* 1999). Cette structure forme un sillon hydrophobe bordé de deux boucles RT-Src et N-Src. Le sillon correspond au site d'interaction avec des ligands possédant :

- des séquences riches en proline PXXPX ou RXPXX (avec X correspondant à n'importe quels acides aminés).

- une structure PPII (poly proline helix II) qui est une hélice α avec un enroulement à gauche constituée de 3 résidus par tour.

La spécificité des interactions se fait grâce aux deux boucles variables RT-Src et N-Src, car les acides aminés qui constituent la poche hydrophobe sont conservés. Le K_d de cette liaison peut varier de 5 à 100 μM suivant la composition des boucles (Cowburn, D., Zheng, J. *et al.* 1995).

Cependant des protéines ne possédant pas de motifs riches en proline interagissent avec ce domaine, elles possèdent plutôt un motif tyrosine (Gorina, S. et Pavletich, N.P. 1996; Romero, F., Dargemont, C. *et al.* 1996)

Quelques protéines interagissant avec ce domaine :

- Pour la chaîne αI : Abi-I (Ziemnicka-Kotula, D., Xu, J. *et al.* 1998).
- Pour la chaîne αII : l'échangeur Na^+/H^+ , NHE2 (Chow, C.W. 1999), Synapsin-I (Onofri, F., Giovedi, S. *et al.* 2000), la Tyrosine phosphatase LMW-PTP (Nicolas, G., Fournier, C.M. *et al.* 2002) la tyrosine kinase Src (Nedrelow, J.H., Cianci, C.D. *et al.* 2003), EVL (Bournier, O., Kroviarski, Y. *et al.* 2006), N-WASP (Nicolas, G, thèse de doctorat. 1999), GAP-43 (Riederer, B.M. et Routtenberg, A. 1999), VASP (Benz, P.M., Blume, C. *et al.* 2008).

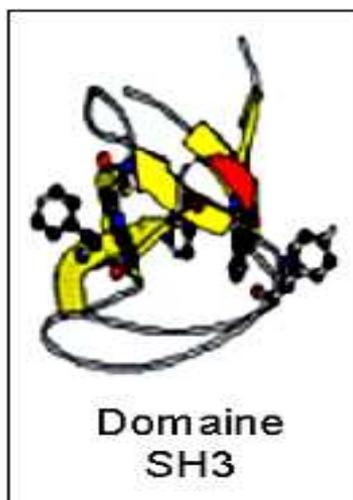


Figure 10: Représentation du domaine SH3 (image tirée de la revue de Van Bennett et Anthony Baines (2001)).

III.2.2.2.5 Le domaine de fixation à la calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine présente dans toutes les cellules, elle change de conformation lorsqu'elle est liée à un ion calcium.

La spectrine possède deux sites de liaison à la calmoduline, le 1^{er} site, de faible affinité est présent dans toutes les isoformes de chaînes α dans la région 3 (figure 7 en page 27), le deuxième n'est présent que sur la chaîne α II, dans l'insertion de 36 acides aminés, au milieu de l'hélice C de l'unité répétitive α 10. Ce deuxième site est situé dans une boucle appelée boucle CCC (Caspase-Calmoduline-Calpain domain), à proximité des deux sites de coupure de protéases : calpaïnes μ et ν et caspases 2 et 3. La calmoduline agit comme une protéine régulatrice sur l'action de ces protéases (négativement pour les caspases, positivement pour les calpaïnes) (Rotter, B., Kroviarski, Y. *et al.* 2004).

III.2.2.2.6 La boucle de la chaîne α II Σ 1

L'isoforme α II Σ 1 présente une insertion de 20 acides aminés au milieu de l'hélice C de l'unité répétitive 9 (α 9) à proximité du domaine SH3. Cette boucle est absente dans l'isoforme α II Σ 2 (figure 11 en page 33). Les taux d'expression de ces deux isoformes varient selon les tissus. Par exemple, dans le cœur ou dans l'aorte, l'isoforme α II Σ 2 est majoritaire (70%) par rapport à α II Σ 1, au contraire, dans le cerveau, les plaquettes ou les lymphocytes, l'isoforme α II Σ 1 est prédominante (plus de 80%), mais pour les tissus épithéliaux, ce ratio est plus proche de 50/50 (Thèse de Gaël Nicolas).

Il a été récemment montré que cette insertion stabiliserait les « jonctions gap » via une interaction avec la connexine 43 et pourrait ainsi moduler l'interconnexion entre les cellules (Ursitti, J.A., Petrich, B.G. *et al.* 2007).

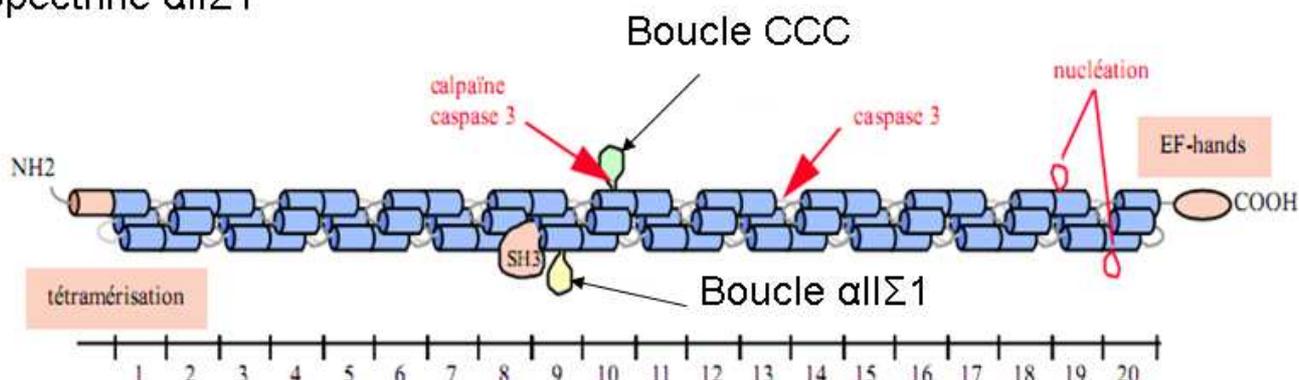
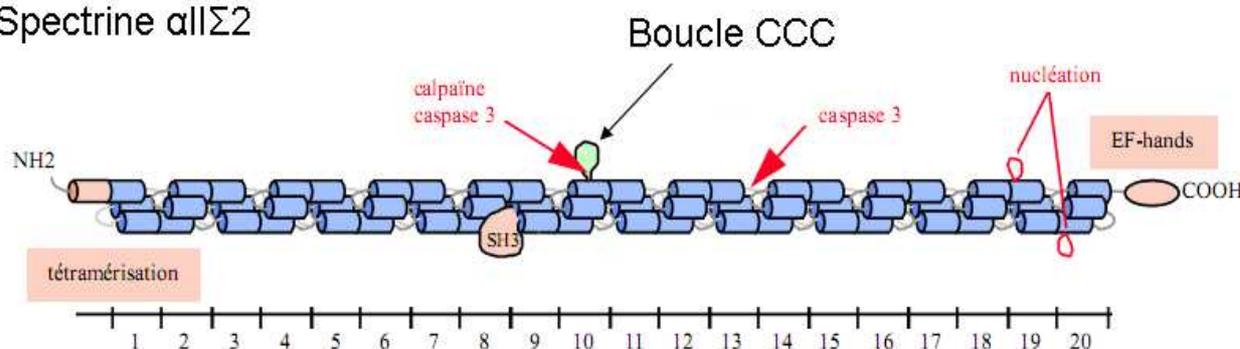
Spectrine $\alpha\text{II}\Sigma 1$ Spectrine $\alpha\text{II}\Sigma 2$ 

Figure 11: Représentation des deux principales isoformes de la spectrine αII , la spectrine $\alpha\text{II}\Sigma 1$ présente une insertion de 20 résidus, localisée dans l'hélice C de l'unité répétitive 9, tandis que cette boucle est épaissée dans l'isoforme du dessous $\alpha\text{II}\Sigma 2$. Image tirée de la thèse de Gaël NICOLAS, 1999.

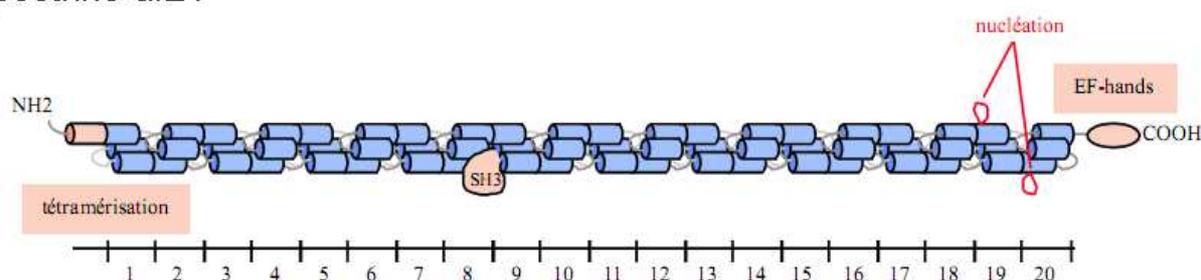
III.2.2.2.7 La boucle CCC (Caspase Calmoduline Calpaïne)

Cette boucle, spécifique de la chaîne αII spectrine, correspond à une insertion de 36 acides aminés dans l'hélice C de l'unité répétitive 10 ($\alpha 10$) (figure 12 en page 34). Cette insertion possède un site de liaison à la calmoduline ainsi que deux sites sensibles à des protéases (Leto, T.L., Pleasic, S. *et al.* 1989; Stabach, P.R., Cianci, C.D. *et al.* 1997; Wang, K.K., Posmantur, R. *et al.* 1998) : l'un pour les calpaïnes m et

μ , activées par le calcium et le second pour les caspases 2 et 3, enzymes impliquées dans l'apoptose (figure 13 en page 35).

Le clivage de la spectrine par les calpaïnes et les caspases dans cette boucle pourrait avoir un rôle important dans le remodelage de la membrane plasmique. Cependant un modèle murin, dépourvu de cette boucle CCC sur la chaîne α II ne présentait pas de phénotypes (Meary, F., Metral, S. *et al.* 2007).

Spectrine α I Σ 1



Spectrine α II Σ 1

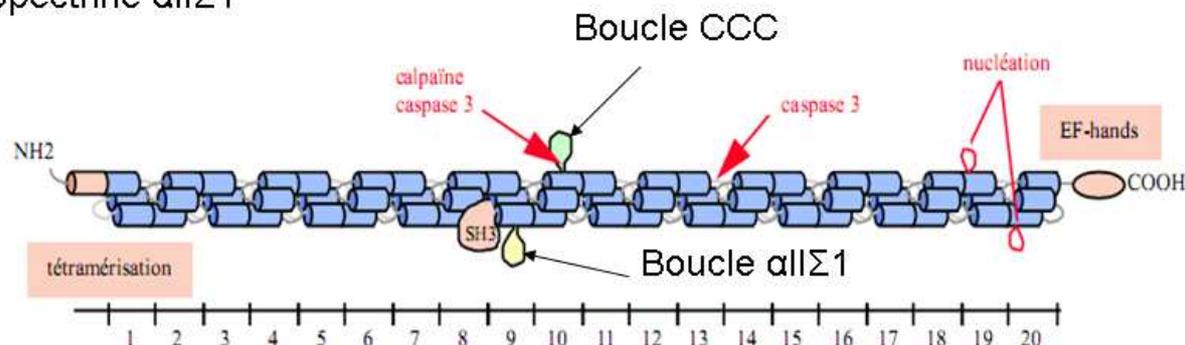


Figure 12: Représentation de la spectrine α I exprimée dans le globule rouge qui ne possède pas la boucle CCC et de la spectrine α II avec cette boucle sensible aux protéases (calpaïnes et caspases). Image tirée de la thèse de Gaël NICOLAS de 1999.

III.2.3 Les modifications post traductionnelles de la spectrine

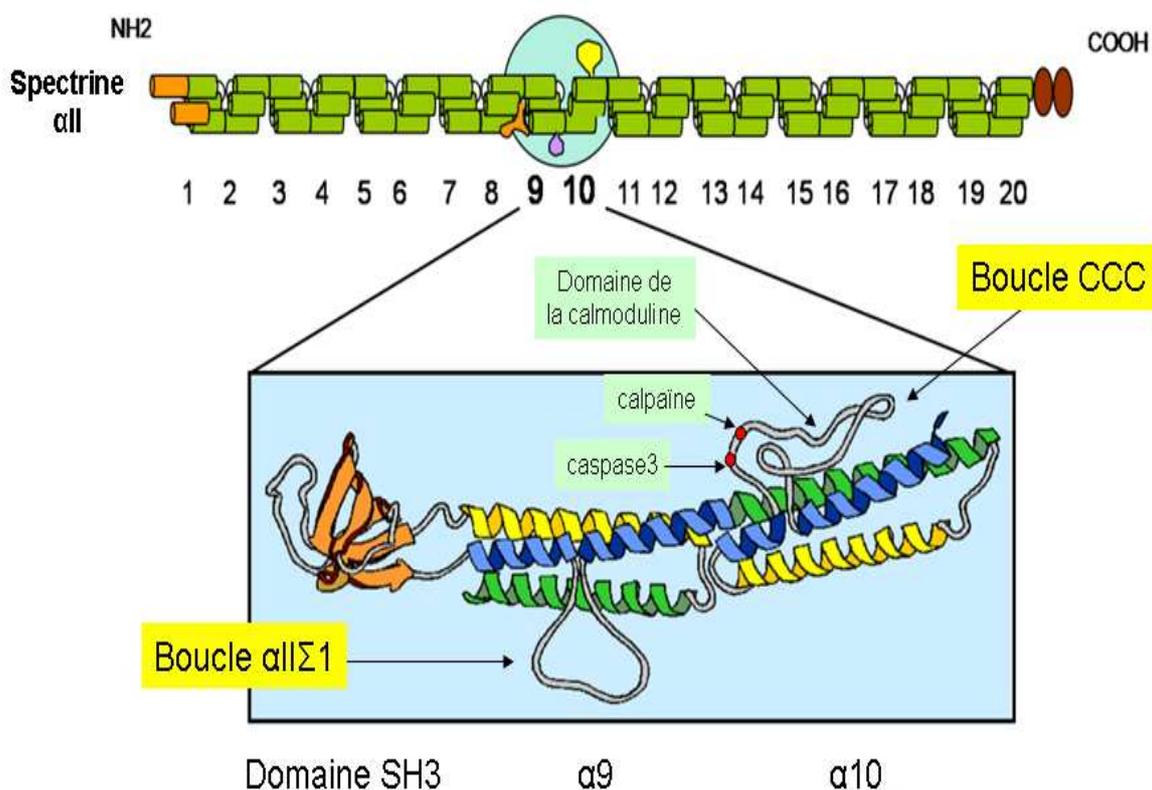


Figure 13 : Représentation de la partie centrale de la spectrine α II à savoir le domaine SH3, et les unités répétitives 9 et 10 dans lesquelles se trouvent la boucle α II Σ 1 et la boucle CCC. Dans la boucle CCC sont représentés par des points rouges les deux sites de coupures des protéases calpaïne et caspase 3. Image tirée de la thèse de Bjorn ROTTER de 2004.

III.2.3.1 Le clivage de la spectrine par des protéases

III.2.3.1.1 Le clivage par des calpaïnes

La spectrine est le substrat des calpaïnes μ et m qui sont des protéases ubiquitaires dont l'activité est dépendante du calcium à des concentrations respectives de μ M et de mM de calcium (Hu, R.J. et Bennett, V. 1991; Lofvenberg, L. et Backman, L. 1999; Goll, D.E., Thompson, V.F. *et al.* 2003).

L'activité des calpaïnes est observée dans beaucoup de processus cellulaires, elles sont impliquées dans les voie de transduction, le remodelage des structures d'adhérence, la migration et la mort cellulaire (Harwood, S.M., Yaqoob, M.M. *et al.* 2005).

Les spectrines présentent plusieurs sites reconnus par les calpaïnes:

Dans la chaîne α II, le site majeur de coupure se trouve dans la boucle CCC entre les résidus Tyrosine 1176 et Glycine 1177, la fixation de la calmoduline dépendante du calcium augmente considérablement la coupure de la spectrine α II (figure 13 en page 35). Cette coupure produit deux fragments stables appelés « α II spectrin break-down product ou SBDP » de 145 et 150 kDa (Huh, G.Y., Glantz, S.B. *et al.* 2001; Glantz, S.B., Cianci, C.D. *et al.* 2007). Ce clivage est aussi régulé par la phosphorylation de la spectrine α II : lorsque la spectrine α II est phosphorylée sur le résidu Tyrosine 1176, la spectrine est moins sensible à l'action des calpaïnes (Nicolas, G., Fournier, C.M. *et al.* 2002).

Sur la chaîne β II, un site majeur est présent au niveau de l'extrémité COOH d'autres sites existent dans d'autres isoformes de β (Lofvenberg, L. et Backman, L. 1999) (Backman, L., Pekrun, A. *et al.* 1991).

Les clivages produisent une déstabilisation du dimère, des interactions inter-chaînes de spectrine et des interactions entre la spectrine et l'actine, ce qui conduirait à une déstabilisation du squelette membranaire (Harris, A.S. et Morrow, J.S. 1990).

Un clivage de la spectrine sous contrôle (signalisation qui régule l'activité des protéases) (Glantz, S.B., Cianci, C.D. *et al.* 2007) a lieu dans des processus cellulaires ayant besoin d'une modification de la membrane de la cellule (forme), comme la division cellulaire, la différenciation, l'endocytose ou l'exocytose ; ou dans des modifications de micro domaines spécialisés comme le processus de la dépolarisation des cellules épithéliales ou celui de la plasticité synaptique. Beaucoup d'arguments sont en faveur d'un rôle physiologique important de ce site de clivage. Cependant un modèle murin, obtenu récemment, possédant une chaîne α II dépourvue de la boucle CCC donc ne pouvant être clivée par les calpaïnes dans ce site majeur, remet en question le rôle critique de ce site de clivage de la spectrine. Les souris sont viables et fertiles et ne présentent pas de phénotypes détectables dans des conditions d'élevage standard (Meary, F., Metral, S. *et al.* 2007).

On peut toutefois penser que le clivage de la spectrine non contrôlé (présentant un défaut dans son système de régulation) pourrait être responsable ou impliqué dans des pathologies graves comme l'ischémie, l'hypoxie, l'épilepsie, les accidents cérébraux, la maladie d'Alzheimer (Veeranna, Kaji, T. *et al.* 2004), la schizophrénie

mais cela reste que des hypothèses. Un modèle murin (klotho) qui possède une activité calpaïne augmentée dans lequel on a observé un clivage de la spectrine important, présente un vieillissement prématuré. Ce modèle peut être un lien entre le taux de spectrine clivée et le vieillissement physiologique anormal (Manya, H., Inomata, M. *et al.* 2002) mais il faut savoir que la spectrine n'est pas la seule protéine qui soit clivée par des calpaïnes, d'autres protéines comme des protéines de structure, de signalisation, de membrane, des enzymes, des protéines des points focaux (paxilline, taline, vinculine) sont elles aussi la cible des calpaïnes.

III.2.3.1.2 Le clivage par la caspase3

Il a été montré que lors de stimuli déclenchant l'apoptose (Martin, S.J., O'Brien, G.A. *et al.* 1995; Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I. *et al.* 1996; Janicke, R.U., Ng, P. *et al.* 1998), la spectrine était clivée par la caspase 3 ou CPP32. Il existe deux sites de coupures sur la chaîne α II et trois sur la chaîne β .

Le site principal sur la chaîne α II se trouve dans la boucle CCC entre les résidus Acide Aspartique 1185 et Serine 1186, c'est à dire à neuf résidus du site de coupure par les calpaïnes (Y1176) et à proximité du site de fixation de la calmoduline. Ce site est aussi utilisé par la caspase 2 (Rotter, B., Krowiarski, Y. *et al.* 2004). Cette coupure à ce site génère des fragments de 150 kDa, c'est à dire un fragment de même taille que celui produit par la calpaïne (SBDPs). Un second site de coupure sur la chaîne α II est localisé entre l'acide aspartique 1478 et la sérine 1479 dans l'unité répétitive α 13, il est spécifique de la caspase 3 et génère un fragment de 120 KDa (figure 13 page 26).

La chaîne β II présente un site principal localisé entre l'acide aspartique 1457 et la sérine 1458 à proximité du site de clivage de la calpaïne, les autres sites sont localisés entre l'Acide Aspartique 1254 - Acide Aspartique 1255 et Acide Aspartique 2146 - Thréonine 2147.

La spectrine clivée n'est plus capable d'interagir avec l'actine, cette perte d'interaction pourrait provoquer une déstabilisation du cytosquelette (comme pour le clivage par les calpaïnes) et modifierait la membrane plasmique avec l'apparition de bourgeonnements.

Cette protéolyse intervient très précocement lors de l'apoptose sur les deux chaînes de spectrine mais de façon séquentielle, tout d'abord la chaîne α puis la chaîne β (Greidinger, E.L., Miller, D.K. *et al.* 1996). Il a été montré qu'elle intervenait bien avant les protéolyse d'autres substrats spécifiques à l'apoptose tel que la polymérase poly-ADP-ribose (PARP), la ribonucléoprotéine U1 ou la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN.

III.2.3.1.3 Le clivage pathologique de la spectrine

Une augmentation de la protéolyse de la spectrine par les protéases est observée dans certaines pathologies:

-La toxine Pet sécrétée par une entérobactérie clive la chaîne α II spectrine (au niveau de la boucle CCC entre les résidus Méthionine 1198 et Valine 1199) des cellules intestinales et provoque un remodelage de l'actine. L'infection par cette entérobactérie provoque une exfoliation cellulaire de l'épithélium intestinal associée à de sévères diarrhées (Villaseca, J.M., Navarro-Garcia, F. *et al.* 2000 ; Canizalez-Roman, A. et Navarro-Garcia, F. 2003; Sui, B.Q., Dutta, P.R. *et al.* 2003; Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A. *et al.* 2004).

-La présence de fragments protéolytiques pourrait être impliquée dans des maladies auto-immunes : le Syndrome Sjogren's ou le lupus érythémateux systémique. Les patients atteints de ces maladies développent des auto-anticorps dirigés contre différents fragments résultant de la protéolyse de la spectrine α II et de façon plus rare contre les différents fragments de la spectrine β I Σ 1. Ces patients atteints de ces pathologies présentent une baisse de sécrétion des glandes lacrymales et salivaires.

III.2.3.2 La phosphorylation

La chaîne β du globule rouge est phosphorylée in situ et in vitro par des kinases dépendantes ou indépendantes de l'AMP cyclique, localisées à la membrane ou dans le cytoplasme (Hosey, M.M. et Tao, M. 1976; Fairbanks, G., Avruch, J. *et al.* 1978; Fowler, V.M. et Adam, E.J. 1992). Six phosphates peuvent être intégrés sur les serines/ thréonines au niveau du COOH terminal de la chaîne β I (Pedroni, S., Lecomte, M.C. *et al.* 1993). Le rôle exact de cette phosphorylation n'est pas

clairement défini. La phosphorylation de la spectrine par une caséine kinase de type I diminue la stabilité de la membrane mais cette phosphorylation n'affecte pas la formation du tétramère de spectrine ni la liaison à actine ou à l'ankyrine (Manno, S., Takakuwa, Y. *et al.* 1995).

Les chaînes α II et β II sont phosphorylées *in vivo* (Goodman, S.R. et Zagon, I.S. 1984; Nixon, R.A. 1986). Un site de phosphorylation, a été identifié sur la tyrosine 1176 : il est le substrat de la kinase Src (Nedrelow, J.H., Cianci, C.D. *et al.* 2003) et de la phosphatase LMW-PTP (Nicolas, G., Fournier, C.M. *et al.* 2002). Ce site correspond au site de clivage de la calpaïne. La phosphorylation de ce résidu Tyr module négativement le clivage de la spectrine par les calpaïnes (Nicolas, G., Fournier, C.M. *et al.* 2002).

Au cours de la division cellulaire, la spectrine non érythroïde est redistribuée dans le cytoplasme et cette redistribution est accompagnée d'une phosphorylation de la spectrine β II (Fowler, V.M. et Adam, E.J. 1992). La phosphorylation à l'extrémité COOH de la chaîne β II régulerait la formation du dimère de spectrine (Bignone, P.A., King, M.D. *et al.* 2007). Pour la chaîne β III, sa phosphorylation modulerait sa stabilité à la membrane de l'appareil de Golgi (Siddhanta, A., Radulescu, A. *et al.* 2003).

IV Les fonctions de la spectrine

IV.1 Les fonctions du squelette membranaire

Le squelette membranaire dépendant de la spectrine est présent dans tous les compartiments cellulaires, il interagit avec beaucoup de protéines cytosoliques et membranaires. Il pourrait être impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques potentielles.

-Dans le globule rouge, sa fonction principale est de stabiliser et de maintenir la membrane érythrocytaire. Ce squelette membranaire lui confère sa forme et une certaine rigidité afin qu'il résiste aux forces de cisaillement mais tout en lui laissant la possibilité de se déformer pour passer dans la microcirculation.

-Dans les autres types cellulaires, les fonctions du squelette membranaire qui présente une plus grande complexité dans sa composition, sont encore peu connues.

L'obtention de modèles animaux dépourvus de spectrine ainsi que les outils de biologie cellulaire ont permis de proposer quelques fonctions quant aux rôles des spectrines : renforcement et organisation de la membrane, partitionnement de domaines cellulaires en micro-domaines, maintien des liaisons des jonctions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, établissement de la polarité cellulaire, migration cellulaire, régulation de l'exocytose, trafic intracellulaire...

IV.2 Les modèles animaux déplétés en spectrine: effet sur la viabilité et le développement

Le nématode *C.elegans* ou la drosophile *D.melanogaster* constituent des modèles simples et complets pour l'étude des fonctions de la spectrine dans un contexte animal.

IV.2.1 La drosophile : *D. melanogaster*

Chez la drosophile, la spectrine est présente sous forme d'une chaîne α et de deux chaînes β (β/β -G et β -H).(Adams, M.D.,Celniker, S.E. *et al.* 2000). Dans les cellules épithéliales, la chaîne β -G a une localisation basolatérale tandis que la chaîne β -H est apicale (Thomas, G.H. et Kiehart, D.P. 1994).

-Pour la chaîne β -H :

L'absence de spectrine β -H conduit à une létalité importante des larves, les quelques survivants montrent les phénotypes suivants : des yeux rugueux caractéristiques de l'absence d'un photorécepteur (R7) dans la rétine, des défauts au niveau des ailes ou de la trachée. Ces phénotypes sont dus pour la plupart à une réduction des interactions entre les cellules (Thomas, G.H.,Zarnescu, D.C. *et al.* 1998). Dans les ovocytes, l'absence de la spectrine β -H provoque une rupture des liaisons entre les cellules, ce qui entraîne des défauts de polarisation et une déstabilisation du pôle apical (Zarnescu, D.C. et Thomas, G.H. 1999).

-Pour les chaînes β -G et α :

L'absence de chaînes β (β -G) ou de chaîne α provoque des phénotypes létaux importants : Seulement 50% des embryons n'exprimant pas la spectrine α atteignent l'étape de larve et meurent dans les premières étapes du développement de la larve. L'absence de la spectrine α modifie la forme des cellules, altère les interactions entre les cellules et l'organisation tissulaire (défaut de polarisation des follicules ovariens, interruptions de l'axes antéro-postérieur de l'oocyte). D'après ces données, deux hypothèses ont été émises par Lee et ses collaborateurs (Lee, J.K., Brandin, E. *et al.* 1997) sur le rôle de la spectrine α : la première serait un rôle structural stabilisant la forme de la cellule et/ou l'interaction des cellules entre elles, tandis que la seconde serait un rôle d'échafaudage stable afin de positionner des mécanismes de signalisation (Lee, J.K., Coyne, R.S. *et al.* 1993; Lee, J.K., Brandin, E. *et al.* 1997). En ce qui concerne la chaîne β , le taux de survivants est encore plus réduit, moins de 10 % des animaux mutants sont capables d'atteindre le stade de larve. Donc ces deux gènes possèdent des fonctions essentielles.

Chez les animaux présentant des déficits en chaîne β -G, la morphologie de l'intestin moyen est modifiée, il présente un défaut des sécrétions acides. Dans les cellules épithéliales, l'accumulation de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ à la membrane basolatérale est perturbée. Cette anomalie n'est pas observée chez les drosophiles ayant un défaut de la chaîne α , (Lee, J.K., Coyne, R.S. *et al.* 1993; Zarnescu, D.C. et Thomas, G.H. 1999; Dubreuil, R.R., Wang, P. *et al.* 2000), cela suggère que la spectrine β peut avoir des fonctions indépendantes de la spectrine α .

De plus, deux mutations, l'une identifiée sur la chaîne α « klotzchen » et l'autre sur β « karussell », montrent que ces chaînes jouent un rôle important durant le développement neuronal et dans l'organisation et la stabilité de la synapse (Featherstone, D.E., Davis, W.S. *et al.* 2001; Pielage, J., Fetter, R.D. *et al.* 2005; Garbe, D.S., Das, A. *et al.* 2007; Hulsmeier, J., Pielage, J. *et al.* 2007).

IV.2.2 Le nématode : *C. elegans*

L'organisation de la spectrine chez le nématode est semblable à celle de la drosophile (Bennett, V. et Baines, A.J. 2001).

-Pour la chaîne β -H :

Des mutations de son gène *sma-1* diminuant son expression, ont été identifiées chez des animaux viables et fertiles mais présentant une taille beaucoup plus petite que la normale (Morck, C. et Pilon, M. 2006). Cette élévation anormale de l'embryon sont les conséquences de problèmes structuraux (forme des cellules) dans les tissus épithéliaux comme les cellules de l'épiderme, du pharynx ainsi que des cellules excréteuses (McKeown, C., Praitis, V. *et al.* 1998). La chaîne β -H est indispensable à la morphogénèse correcte de l'embryon.

-Pour la chaîne β -G :

La chaîne β (β -G) est présente au stade deux cellules de l'embryogénèse et localisée aux sites de contact cellule-cellule. Chez l'adulte, elle est exprimée dans les tissus épithéliaux au pôle basolatéral mais aussi de façon importante dans les neurones (dans l'axone et le corps cellulaire) et dans les cellules du muscle strié (aux sites de contact avec la matrice extracellulaire).

Certaines mutations sur le gène *unc-70* sont létales mais quelques individus survivent et peuvent proliférer malgré la perte d'expression de la spectrine β -G sauvage. Ces individus mutants, possédant une spectrine β -G tronquée voir complètement absente ont un ralentissement de leur développement larvaire et une paralysie chez l'adulte; l'absence de la chaîne β entière provoque durant leur développement des cassures des axones avec une perte de motilité et un manque de coordination. Ces observations montrent que la spectrine β joue un rôle important dans la structure physique du neurone ainsi que dans les processus neuronaux (Hammarlund, M., Davis, W.S. *et al.* 2000; Hammarlund, M., Jorgensen, E.M. *et al.* 2007). Des anomalies ont été observées aussi dans le muscle ; le défaut de la chaîne β provoque une désorganisation des myofilaments et une réduction ou la perte du réticulum sarcoplasmique.

Les mêmes résultats ont été observés avec des SiARN dirigés contre cette chaîne β . La baisse de l'expression de la protéine est couplée à des défauts dans la musculature et au niveau du système nerveux du nématode (Moorthy, S., Chen, L. *et al.* 2000).

Mais curieusement, la spectrine β ne joue pas de rôle dans l'établissement de la polarité et de la structure des cellules de l'épiderme et de l'intestin, de plus aucun

défaut de sécrétion n'est relevé dans l'intestin chez le nématode par rapport aux données observées chez la drosophile.

-Pour la chaîne α :

Durant l'embryogénèse la spectrine α est déjà présente au stade d'une cellule, sa localisation à la membrane cellulaire semble être dépendante seulement de la spectrine β (pas de la spectrine β -H).

Des analyses sur des mutants du gène *spc-1* codant pour la chaîne α de *C.elegans* indiquent que la chaîne β a besoin de la spectrine α pour être recrutée de façon stable à la membrane.

Quand la chaîne α n'est pas exprimée, les animaux présentent les phénotypes spécifiques aux défauts d'expression de la chaîne β et de la chaîne β -H (Moorthy, S., Chen, L. *et al.* 2000; Norman, K.R. et Moerman, D.G. 2002). Les phénotypes observés sur ces mutants de la chaîne α sont un défaut d'élongation de l'embryon avec une désorganisation du cytosquelette d'actine apical, nécessaire à une bonne élongation (phénotypes observés pour des organismes présentant des défauts de la spectrine β -H), une mort après l'étape de segmentation de l'embryon, des défauts dans l'organisation du pôle apical, des défauts de différenciation des cellules du muscle (phénotypes retrouvés dans des organismes présentant des défauts de la chaîne β).

IV.2.3 Le poisson : *Danio rerio*

Ce poisson *Danio rerio*, est utilisé comme système d'étude de l'hématopoïèse chez les vertébrés, il possède une spectrine β dans son globule rouge qui est plus proche de la chaîne non-érythroïde que de la chaîne érythroïde de l'humain. Elle a la caractéristique de posséder un domaine PH qui est absent dans la spectrine β érythroïde de l'humain. Une mutation, appelée *riesling* (*ris*), dans l'unité répétitive $\beta 8$ du gène de la spectrine β introduisant un codon stop prématurément et, considérée comme une invalidation de la spectrine β , provoque une diminution du nombre de cellules sanguines (érythrocytes) circulant durant l'embryogénèse chez ce poisson.

De sévères défauts dans la morphogénèse des globules rouges et une instabilité de des membranes des érythrocytes (Liao, E.C., Paw, B.H. *et al.* 2000) sont relevés chez des individus *ris* homozygotes (*ris /ris*) mais certains survivent jusqu'à l'âge

adulte et 5 à 10% peuvent se reproduire. Cette mutation induit une anémie hémolytique (sphérocytose) comme chez l'humain (Liao, E.C., Paw, B.H. *et al.* 2000) (Rôle probable du domaine PH et de la liaison directe de la spectrine à la membrane plasmique).

Une autre mutation introduisant un codon stop dans le gène *st60* codant pour une spectrine α II, ont été observées perturbant fortement l'expression de la spectrine α II. Ce mutant, sans spectrine α II, meurent au bout du 15^{ème} jour après fertilisation, et présente des défauts morphologiques en particulier un défaut d'augmentation de la vessie natatoire. Cette chaîne est présente dans les nœuds de Ranvier dans le système nerveux central et périphérique. La conduction saltatoire de l'axone myélinisé exige une organisation des nœuds de Ranvier où les canaux sodiques dépendants du voltage sont bien localisés et forment des clusters. L'absence de spectrine α II provoque des anomalies de développement de l'axone myélinisé et des problèmes de stabilisation/localisation des clusters de canaux.

La chaîne α II pourrait s'associer à la chaîne β IV présente dans les nœuds de Ranvier pour former des clusters de canaux sodique via l'ankyrine G, et l'ankyrine G via d'autres protéines (NF186 et glioméline) interagirait avec les microvilli des cellules de schwann, ce mécanisme intervenant dans la formation du nœud de Ranvier. Elle pourrait également s'associer avec la chaîne β II en vue de stabiliser le nœud de Ranvier dans la partie paranodale via l'ankyrine B et faire un lien avec la myéline compacte via les protéines NF155, contactine, caspr1 et 4.1B (Voas, M.G., Lyons, D.A. *et al.* 2007).

IV.2.4 Chez les mammifères : l'homme, la souris...

Plusieurs rôles ont été potentiellement donnés à la spectrine :

- Maintien de la forme et de l'intégrité membranaire des érythrocytes (Lux, S.E. et John, K.M. 1977).
- Recrutement et stabilité des protéines dans des domaines spécialisés des membranes cellulaires (De Matteis, M.A. et Morrow, J.S. 2000).
- Etablissement et maintien de la polarisation cellulaire (Pinder, J.C. et Baines, A.J. 2000).
- Transport intracellulaire (Holleran, E.A., Ligon, L.A. *et al.* 2001).

IV.2.4.1 La spectrine et la stabilité membranaire

Dans le globule rouge, le squelette membranaire dépendant de la spectrine constitué exclusivement de chaînes α I et β I donne à l'érythrocyte sa forme biconcave. Son rôle structural dans la membrane est très important et confère au globule rouge :

- une résistance aux forces de cisaillement de la circulation sanguine.
- une flexibilité membranaire lui permettant de se déformer et de passer les petits vaisseaux sanguins.

Les mutations sur les chaînes de spectrine érythroïde sont associées à des anomalies de forme des globules rouges et une fragilité de leur membrane, conduisant à des anémies hémolytiques héréditaires, comme la sphérocytose et l'elliptocytose héréditaires.

IV.2.4.2 La Spectrine et l'organisation de la membrane

Le squelette membranaire dépendant de la spectrine participe à l'organisation de la membrane cellulaire en réduisant le mouvement latéral et la diffusion de protéines membranaires. Une étude sur des souris sph/sph, déficientes en spectrine α érythroïde, montre que le marquage des glycoprotéines de la membrane du globule rouge se fait très rapidement, et il est plus concentré par rapport à des cellules érythroleucémiques, ce qui pourrait faire penser que la spectrine α joue un rôle important dans l'organisation structurale de la membrane en limitant la diffusion latérale des protéines de la membrane dans des cellules autres que l'érythrocyte mature (Dahl, S.C., Geib, R.W. *et al.* 1994). Les concepts présentés par M.A De Matteis et J.S Morrow dans leur revue de 2000 sont dans sont dans la lignée des observations faites en 1994 par S.C Dahl.

La spectrine participe à l'organisation de la membrane plasmique

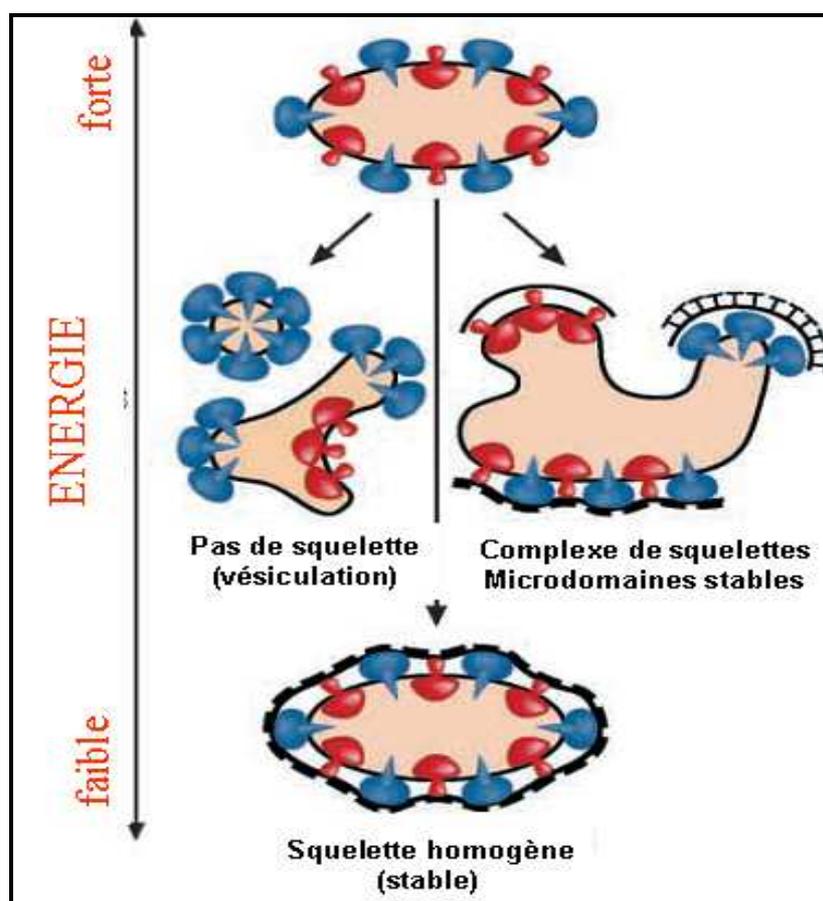


Figure 14: Représentation du rôle du squelette membranaire dans la forme de la membrane. (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).

Ce concept d'organisation des protéines membranaires par le squelette membranaire stabilise cette membrane (abaisse l'énergie du système) (figure 14 ci-dessus).

Les protéines peuvent spontanément déformer la bicouche lipidique vers un état de plus faible énergie et former des vésicules en absence de squelette membranaire ou constituer des micro-domaines grâce à des squelettes membranaires différents. On peut observer dans ce concept, que la forme de la membrane obtenue par l'organisation des protéines membranaires (protéine rouge dans la figure 14 ci-dessus) sans la présence de squelette peut être totalement inverse à celle des mêmes protéines interagissant avec un squelette membranaire.

L'état du système en énergie peut être abaissé lorsque le squelette membranaire est homogène. Ce concept expliquerait le rôle du squelette membranaire dans la forme de la cellule ainsi que dans la déformabilité de la membrane via la distribution des protéines membranaires.

D'autres concepts expliquent le rôle que pourrait jouer la spectrine dans la diffusion de protéines de membrane qui interagissent ou n'interagissent pas avec le squelette membranaire dépendant de la spectrine.

Le « FENCE » et « TETHER »

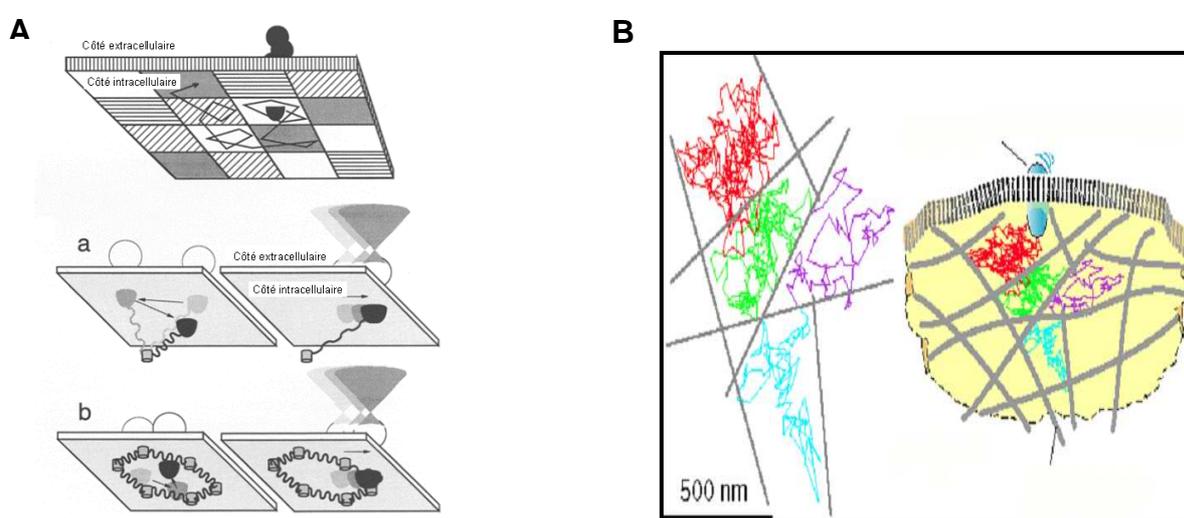


Figure 15: Représentation des deux concepts de Sako et Kusumi expliquant le rôle du squelette membranaire dans la diffusion des protéines de membrane. A : le modèle de lien « tether » avec la spectrine. B : le modèle de clôture sous membranaire (image tirée de l'article de Sako et Kusumi de 1995 (Sako, Y. et Kusumi, A. 1995)).

Sako et Kusumi en 1995 proposent un modèle de squelette membranaire jouant le rôle de clôture sous membranaire, ceci limitant la diffusion latérale de protéines non associées à la spectrine (figure 15 b ci-dessus) et le modèle de lien « tether » pour les protéines liées à la spectrine (figure 15 a en page 147). En suivant le chemin de diffusion des protéines de membrane, ils ont observé que la diffusion de la bande 3 (non associée à la spectrine) dans le globule rouge est limitée à une aire de 110 nm, cela corrèle avec le maillage créé par le réseau de spectrine. Occasionnellement la protéine part de cette aire pour aller dans l'aire adjacente comme le montre la figure 15 b, ceci est observé en moyenne toute les 350 ms. D'autres protéines bandes 3

ont des mouvements oscillatoires similaires à ceux de la spectrine, cela suggère qu'elles sont accrochées au réseau de spectrine. L'effet « clôture » du squelette membranaire dépendant de la spectrine est aussi impliqué dans la sélection de protéines membranaires durant la formation de vésicules de recyclage, un important mécanisme pour l'homéostasie sanguine. Des effets similaires ont été observés dans des cellules non érythroïdes (Sako, Y., Nagafuchi, A. *et al.* 1998) avec l'étude du mouvement de l'E-cadhérine (protéine qui interagit avec le squelette membranaire dépendant de la spectrine). Les protéines mutantes E-cadhérines déléetées d'une partie du domaine cytoplasmique et ne pouvant plus interagir avec le squelette membranaire, possèdent une grande moyenne de diffusion comparée à celle observée aux E-cadhérine normales. Ces concepts peuvent expliquer les mouvements des protéines membranaires mais il faut tenir compte également que le réseau de spectrine est lui aussi déformable (figure 16 ci-dessous).

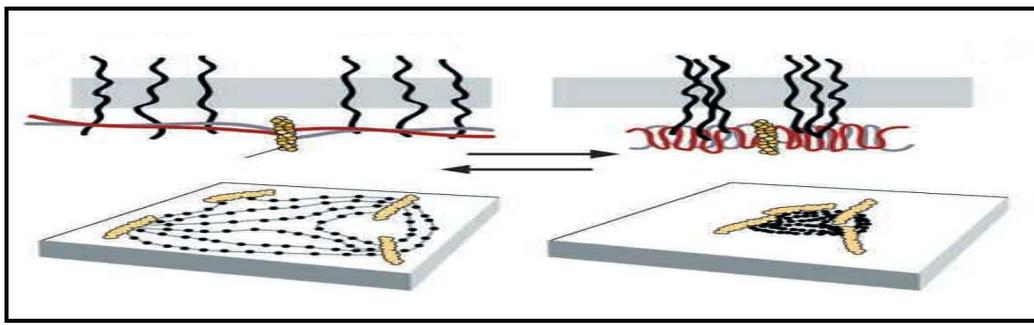


Figure 16 : Le modèle de mosaïque montre l'aspect dynamique de la spectrine sur les protéines membranaires. Le rôle du squelette de spectrine est d'organiser la bicouche lipidique et de contrôler la diffusion des protéines membranaires. Ce modèle souligne la flexibilité du réseau de spectrine. (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).

De Matteis et Morrow décrivent le squelette membranaire dépendant de la spectrine comme un réseau dynamique contrôlant les mouvements des protéines membranaires, cytosoliques, ainsi que certains phospholipides liés à la spectrine. Il limite la déformabilité de la membrane et la diffusion latéral des protéines membranaires, et contrôle leur espacement dans des variations de longueur du tétramère de spectrine (figure 16 ci-dessus).

La spectrine lie un certain nombre de protéines de façon directe ou indirectement: le monomère β de la spectrine interagit avec des types de protéines très variés et différents du monomère α . Ces protéines liées à la spectrine ont des rôles dans les processus cellulaires comme la polarisation, l'adhérence, la migration, la prolifération, la signalisation

Les interactions avec ces protéines peuvent donc conférer des rôles potentielles multiples à la spectrine sachant que si les interactions entre ces protéines sont bien connues et établies, les fonctions multiples de la spectrine, elles, restent encore à être déterminées dans la plupart de ces processus cellulaires.

IV.2.4.3 La spectrine et le remodelage de la membrane

Le remodelage du squelette membranaire dépendant de la spectrine par clivage dans la boucle CCC de la spectrine par des protéases constitue un point supplémentaire dans la dynamique de ce squelette membranaire. Des processus comme l'exocytose, l'endocytose, la migration font appel à des modifications de la membrane et des structures sous-jacentes donc au remodelage du réseau de spectrine.

Il apparaît que le clivage de la spectrine non érythroïde par des calpaïnes (chaîne α et β) affecte la tétramérisation des dimères de spectrine et entraîne une dissociation des complexes d'actine (Harris, A.S. et Morrow, J.S. 1990). De plus l'association entre la spectrine et la membrane est diminuée après clivage de la spectrine β (Hu, R.J. et Bennett, V. 1991). Le clivage de la chaîne α se produit lors de la stimulation du récepteur NMDA mais ne conduit pas à la mort cellulaire (Di Stasi, A.M., Gallo, V. *et al.* 1991), il serait plutôt un processus physiologique associé à la plasticité du squelette membranaire.

Le clivage anormal de la spectrine non érythroïde pourrait s'avérer pathologique (Di Stasi, A.M., Gallo, V. *et al.* 1991; Seubert, P., Peterson, C. *et al.* 1990). Dans des maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux ou le syndrome de Sjogren (Watanabe, T., Tsuchida, T. *et al.* 1999; Hayashi, Y., Yayagi, K. *et al.* 2000), les patients développent des anticorps dirigés contre les parties clivées de la spectrine. Ces patients présentent un tarissement des sécrétions exocrines

spécialement lacrymale et salivaire, avec des rhumatismes inflammatoires chroniques.

D'autres études montrent une possible implication de la dégradation de la spectrine dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Fernandez-Shaw, C., Marina, A. *et al.* 1997). La dégradation de la spectrine non érythroïde pourrait être également impliquée dans l'ischémie (Doctor, R.B., Bennett, V. *et al.* 1993). La protéolyse de la spectrine pourrait contribuer au changement morphologique des cellules accompagnant l'hypoxie des cellules neuronales et épithéliales et la dégénérescence des neurones (Seubert, P., Peterson, C. *et al.* 1990).

Cependant, malgré les nombreux travaux suggérant un rôle important du clivage de la spectrine dans des processus impliqués dans de nombreux phénomènes cellulaires, notre étude très récente sur des souris transgéniques exprimant une chaîne de spectrine α délétée de son site hypersensible aux protéases (cette délétion de la boucle CCC de la spectrine α II) montre que ces souris sont viables, en excellente santé ; elles ne possèdent aucun phénotype dans des conditions standards d'élevage (Meary, F., Metral, S. *et al.* 2007).

IV.2.4.4 La spectrine et l'adhérence cellulaire

La spectrine pourrait être impliquée dans différentes structures d'adhérence de type cellule-cellule comme les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les 'jonctions gap ' ou dans les contacts cellule-matrice extracellulaire.

IV.2.4.4.1 Les interactions cellule-cellule

Les jonctions adhérentes : Les cadhérines sont les protéines majoritaires dans les jonctions adhérentes, elles sont les premières recrutées dans ces structures avant le recrutement d'autres protéines comme la β -caténine, l' α -caténine, la spectrine, l'adducine, l'actine et la protéine 4.1. La spectrine β II via son extrémité N terminale interagit avec l' α -caténine (Tepass, U. 2002) et facilite l'assemblage de la spectrine à la membrane (Pradhan, D., Lombardo, C.R. *et al.* 2001). Par ailleurs, il a été montré

que la spectrine β II joue un rôle dans la biogénèse de la membrane latérale (Kizhatil, K., Yoon, W. *et al.* 2007).

Les jonctions serrées : elles définissent une barrière entre la membrane apicale et la membrane basale. Elles sont présentes dans certains épithéliums (épithéliums étanches) et dans l'endothélium cérébral. Ces structures sont des complexes multiprotéiques qui contiennent entre autres, la protéine ZO1 qui lie la spectrine, (Bennett, V. 1990) (Beck, K.A. et Nelson, W.J. 1996; Tsukamoto, T. et Nigam, S.K. 1997), la protéine ZO2 qui est en interaction avec la protéine 4.1R (Mattagajasingh, S.N., Huang, S.C. *et al.* 2000). Les interactions entre les protéines des jonctions serrées et les protéines du cytosquelette comme la spectrine ou la protéine 4.1R constituent des processus dynamiques (lien avec le cytosquelette d'actine) impliquées aussi dans la morphologie des cellules épithéliales (Bennett, V. 1990; Beck, K.A. et Nelson, W.J. 1996).

Les jonctions gap : la protéine constitutive des 'jonctions gap' est la connexine. Dans le muscle cardiaque, cette protéine interagit avec la spectrine α II par l'insertion de 20 résidus localisé dans l'unité répétitive α 9 à proximité du domaine SH3 (isoforme de α II Σ 1). La spectrine stabilise la connexine 43 dans les jonctions gap et pourrait intervenir dans la signalisation cellulaire en modulant les interconnexions entre les cellules (Ursitti, J.A., Petrich, B.G. *et al.* 2007).

La spectrine interagit (directement ou indirectement via l'ankyrine) avec des molécules d'adhérence et pourrait jouer un rôle dans l'adhérence. La spectrine β I, par les unités répétitives β 2 et β 3, lie les isoformes 140 et 180 de N-CAM (neural cell adhesion molecule). Ces protéines sont impliquées dans les contacts cellule-cellule. L'interaction de la spectrine avec ces protéines est importante pour l'élongation des neurites (Pollerberg, G.E., Burridge, K. *et al.* 1987; Leshchyn's'ka, I., Sytnyk, V. *et al.* 2003).

D'autres protéines s'associent indirectement à la spectrine via l'ankyrine, comme les protéines de la famille des L1CAM : L1CAM, Neurofascine, NgCAM, NrCAM et Neurogliane (Davis, J.Q. et Bennett, V. 1994 ; Davis, J.Q., Lambert, S. *et al.* 1996). Ces protéines exprimées dans le système nerveux, et, comme les N-CAM, sont impliquées dans les contacts cellule-cellule. Elles jouent des rôles importants dans le développement du système nerveux, et des mutations dans ces protéines sont responsables de pathologies comme le syndrome L1 causé par des mutations dans

le gène de L1CAM avec comme manifestations cliniques l'hydrocéphalie, le retard mental, une tonicité augmentée des muscles des jambes (spasticité).

IV.2.4.4.2 Les interactions cellule matrice extra-cellulaire

Le squelette membranaire dépendant de la spectrine interagit directement avec des protéines dont la fonction est d'adhérer à la matrice extracellulaire, par exemple la protéine B-CAM Luthéran. Cette interaction directe a été décrite dans le globule rouge (Kroviarski, Y., El Nemer, W. *et al.* 2004). Il a été montré que cette interaction avec la spectrine érythroïde, module l'adhérence de l'érythrocyte sur la laminine $\alpha 5$ (substrat de la protéine B-CAM) : quand l'interaction entre la spectrine $\alpha 1$ (unité répétitive $\alpha 4$) et B-CAM est annihilée, le globule rouge adhère beaucoup plus à la laminine (An, X., Gauthier, E. *et al.* 2008).

Des études en immunofluorescence montre une co-localisation entre le domaine SH3 de la spectrine $\alpha 11$ et une molécule d'adhérence à la matrice extracellulaire, l'intégrine $\beta 3$. Il a été montré la présence du domaine SH3 de la spectrine $\alpha 11$ lors de la formation des clusters d'intégrines $\beta 3$. Sachant que ces regroupements d'intégrines sont connus comme initiant l'adhérence des cellules et leur étalement (Bialkowska, K., Saido, T.C. *et al.* 2005), la spectrine $\alpha 11$ pourrait jouer un rôle dans l'adhérence de la cellule non érythroïde à la matrice extracellulaire en contrôlant la formation de certaines structures d'adhérence.

L'interaction entre les structures d'adhérence comme les points focaux et la spectrine $\alpha 11$ pourrait se faire directement mais aussi indirectement grâce à une protéine intracellulaire : la plectine. Cette protéine joue le rôle de liaison entre les microtubules, les filaments intermédiaires et le cytosquelette d'actine et est présente surtout dans des structures d'adhérence mais aussi dans les desmosomes et les hemidesmosomes des cellules épithéliales (Leung, C.L., Green, K.J. *et al.* 2002). Une étude in vitro montre une interaction de la plectine avec la spectrine α (Herrmann, H. et Wiche, G. 1987). On peut imaginer que la plectine peut faire le lien entre la spectrine α et des molécules présentes dans les structures d'adhérence comme les intégrines et ainsi elle pourrait contrôler la dynamique de ces structures (Geerts, D., Fontao, L. *et al.* 1999).

IV.2.4.5 La spectrine et la polarisation

La polarité est une fonction essentielle pour la cellule, elle se définit par la répartition asymétrique et le maintien de certains organites, de certaines protéines membranaires. L'établissement de la polarité cellulaire peut être un processus transitoire lors de certains événements cellulaires comme la migration, la division cellulaire, mais elle est aussi définitive comme dans les neurones ou les cellules épithéliales. Le squelette membranaire dépendant de la spectrine pourrait être impliqué dans l'établissement ou le maintien de cette polarité cellulaire.

-Etablissement de la polarité

Il a été montré récemment le rôle de la spectrine β II dans la biogénèse de la membrane latérale de cellules de bronche humaine. La perte de l'expression de la spectrine β II provoque un défaut de la membrane latérale (Kizhatil, K., Yoon, W. *et al.* 2007). D'autres observations indiquent que les distributions spécifiques de la spectrine, au pôle basolatéral ou en apical suivant le type cellulaire, induisent des localisations membranaires différentes de la Na/K/ATPase. Dans la cellule rénale polarisée, la spectrine est localisée dans la partie basolatérale de la cellule et est liée à la Na/K/ATPase via l'ankyrine (Nelson, W.J. et Veshnock, P.J. 1986 ; Nelson, W.J. et Veshnock, P.J. 1987 ; Kashgarian, M., Morrow, J.S. *et al.* 1988; Davis, L., Lux, S.E. *et al.* 1989 ; Morrow, J.S., Cianci, C.D. *et al.* 1989; Nelson, W.J. et Hammerton, R.W. 1989; Gundersen, D., Orłowski, J. *et al.* 1991; Devarajan, P., Scaramuzzino, D.A. *et al.* 1994; Piepenhagen, P.A., Peters, L.L. *et al.* 1995). Par contre dans l'épithélium rétinale pigmentaire ou le squelette membranaire dépendant de la spectrine est principalement localisé en apical, cette pompe se localise au pôle apical (Alper, S.L., Stuart-Tilley, A. *et al.* 1994 ; Rizzolo, L.J. et Zhou, S. 1995).

Le squelette membranaire dépendant de la spectrine peut intervenir dans l'établissement de la polarité par action directe sur le transport et l'adressage des protéines à la membrane ou bien dans ses multiples interactions avec des protéines membranaires selon la diversité de sa composition. Par exemple dans les cellules neuronales, la spectrine β II Σ 2 (isoforme avec à l'extrémité C-terminal un domaine PH plus court) est localisé dans le corps du neurone et interagit avec la

schwannomine (protéine impliquée dans l'organisation du réseau d'actine) (Chen, Y., Yu, P. *et al.* 2001) tandis que la spectrine β II Σ 1 est présente dans les terminaisons synaptiques de l'axone et interagit avec le récepteur NMDA (la stabilité de ce récepteur via la spectrine à des conséquences sur le morphologie membranaire synaptique). Un autre exemple montre une différence de localisation entre la spectrine β V (latérale) et la spectrine β II (plateau cuticulaire) dans des cellules ciliées externes (Legendre, K., Safieddine, S. *et al.* 2008). La localisation des différentes spectrines pourrait être importante pour la polarisation de la cellule puisque chaque spectrine va interagir avec des protéines membranaires qui lui sont propres et ainsi, et pourrait former des micro-domaines spécialisés au sein de la membrane.

-Maintenance de la polarité des cellules

Dans les cellules épithéliales polarisées le pôle apical est délimité du pôle basolatéral par les jonctions serrées qui assurent la fonction de barrière imperméable entre les deux compartiments. Des études montrent que lorsque l'ATP intracellulaire est diminuée mimant ainsi l'ischémie, la proportion de spectrine interagissant avec les jonctions serrées, et plus précisément avec ZO-1, augmente. Le lien direct ou indirect entre la spectrine et ZO-1 pourrait être régulée par le calcium ou la phosphorylation des protéines (Tsukamoto, T. et Nigam, S.K. 1997).

Beaucoup d'observations montrent une délocalisation de protéines membranaires lorsque l'interaction de ces protéines et le squelette membranaire dépendant de la spectrine est abolie. Cette modification de localisation de ces protéines membranaire entraîne une perte de fonction pouvant être associée avec une pathologie.

Dans les cellules épithéliales de colon CaCo-2, la surexpression du domaine de liaison de l'actine ou du domaine de liaison à l'ankyrine de la spectrine non érythroïde entraîne progressivement au bout de 10 – 14 jours de culture une perte d'expression de la spectrine endogène. Ces cellules perdent leur morphologie épithéliale et deviennent multinucléées. La localisation de la pompe Na/K/ATPase est modifiée (Hu, R.J., Moorthy, S. *et al.* 1995). Comme pour la pompe Na/K/ATPase localisée à la membrane basolatérale grâce à la spectrine, le squelette membranaire dépendant de la spectrine est responsable de l'adressage de l'échangeur Na⁺/H⁺ échangeur (NHE2) mais en apical. Lorsque la spectrine est délétée de la partie qui lie

NHE2, cet échangeur est délocalisé à la membrane basolatérale (Chow, C.W. 1999). Chez des souris présentant un déficit en spectrine β IV, il a été montré une délocalisation du canal potassium dépendant du voltage, KCNA dans le nerf myélinisé ce qui engendre chez ces souris, des tremblements avec des troubles auditifs et moteurs (Parkinson, N.J., Olsson, C.L. *et al.* 2001).

Ces différents exemples montrent que la spectrine est impliquée dans la localisation spécifique de protéines à la membrane. La spectrine joue un rôle dans la polarisation de la cellule mais aussi dans le maintien de cette polarisation par accumulation de protéines de membrane et le maintien de ces protéines dans des structures (complexes de protéines).

IV.2.4.6 La spectrine : une machine accumulatrice

Le squelette membranaire dépendant de la spectrine participe à la localisation de nombreuses protéines membranaires comme par exemple la pompe Na/K/ATPase liée la spectrine β II via l'ankyrine ou le canal KCNA lié à la spectrine β IV. Pinder et Baines (2000) proposent pour la spectrine un rôle de machine accumulatrice de protéines (Pinder, J.C. et Baines, A.J. 2000). Dans les cellules épithéliales, les protéines de l'adhérence, comme les cadhérines, établiraient des contacts cellule-cellule. Une fois ces contacts établis, ces protéines recruteraient dans un premier temps l'ankyrine, qui permettrait ensuite le recrutement de la spectrine à la membrane basolatérale. Par la suite, des protéines comme la Na/K/ATPase seraient stabilisées à la membrane basolatérale (figure 17 en page 56).

Des observations faites par Williams chez la drosophile en 2004, montrent une augmentation de la demi-vie des protéines membranaires liées à la spectrine (Williams, J.A., MacIver, B. *et al.* 2004). Ces données montrent que les protéines liées à la spectrine restent plus longtemps à la membrane plasmique en comparaison avec les protéines non liées qui sont internalisées beaucoup plus rapidement par endocytose, mais un article publié récemment de A.Das de 2008 montre que la formation du squelette membranaire peut être différente suivant le type cellulaire (Das, A., Base, C. *et al.* 2008).

Le rôle de la spectrine et plus spécifiquement ses domaines pourraient avoir des implications dissemblables pour l'assemblage du squelette membranaire dépendant de la spectrine, dans des cellules de glande salivaire, des cellules de l'intestin moyen de l'embryon, ou des cellules du cerveau de larve.

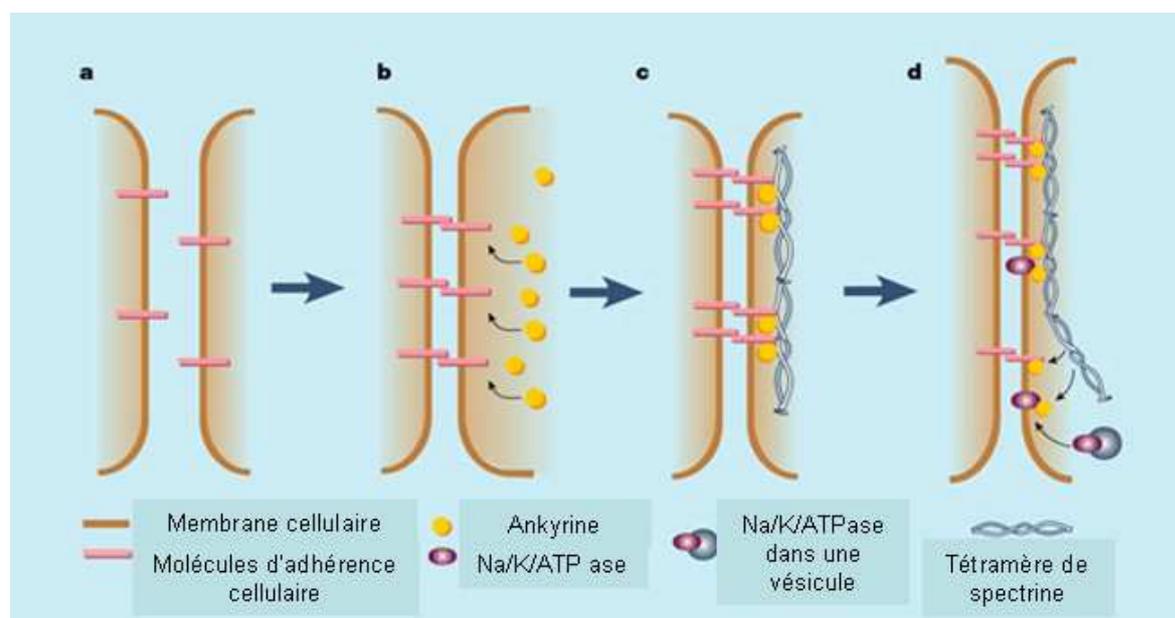


Figure 17 : Représentation du rôle de la spectrine comme accumulateur de protéines. Le premier contact entre les cellules est établi par des molécules d'adhérence (b), les complexes vont recruter l'ankyrine qui ensuite liera les tétramères de spectrine (c) ; Ce complexe stabilisera la membrane latérale, permettant le recrutement et la stabilisation à la membrane de la Na/K/ATPase (d). (Image tirée de l'article de Jennifer C. Pinder et Anthony J. Baines dans Nature (Pinder, J.C. et Baines, A.J. 2000)).

IV.2.4.7 La spectrine et le transport intracellulaire

Il a été montré que le squelette membranaire dépendant de la spectrine pourrait être impliqué dans la polarisation cellulaire du fait des interactions spécifiques observées entre les différents squelettes membranaires de spectrine et les protéines de membrane, mais aussi du fait que, la spectrine pourrait jouer un rôle dans l'adressage des protéines membranaires dans différents compartiments de la membrane plasmique. Ce squelette membranaire dépendant de la spectrine est présent dans un grand nombre de membranes intracellulaires, l'appareil de Golgi

(présence de spectrine β I) (Beck, K.A., Buchanan, J.A. *et al.* 1994) le réticulum endoplasmique (ER) mais aussi dans les granules de cellules chromaffines, dans les vésicules synaptiques, dans la membrane nucléaire, et dans une partie du maillage cytoplasmique liant des vésicules.

Un modèle (figure 18 ci-dessous) propose pour la spectrine des fonctions d'organisatrice et de stabilisation de la membrane golgienne, conférant à celle-ci sa forme et son intégrité structurale. Cet échafaudage pourrait jouer aussi un rôle dynamique dans l'assemblage ou le désassemblage de ce compartiment permettant le trafic de vésicules intracellulaires. Le squelette membranaire dépendant de la spectrine pourrait être impliqué dans le bourgeonnement des extrémités des sacs golgiens afin de former les vésicules golgiennes, dans le processus d'arrimage des vésicules, ou dans la recapture et le remodelage des sous compartiments golgiens.

Modèle de réseau/maillage de la spectrine dans les compartiments golgiens :

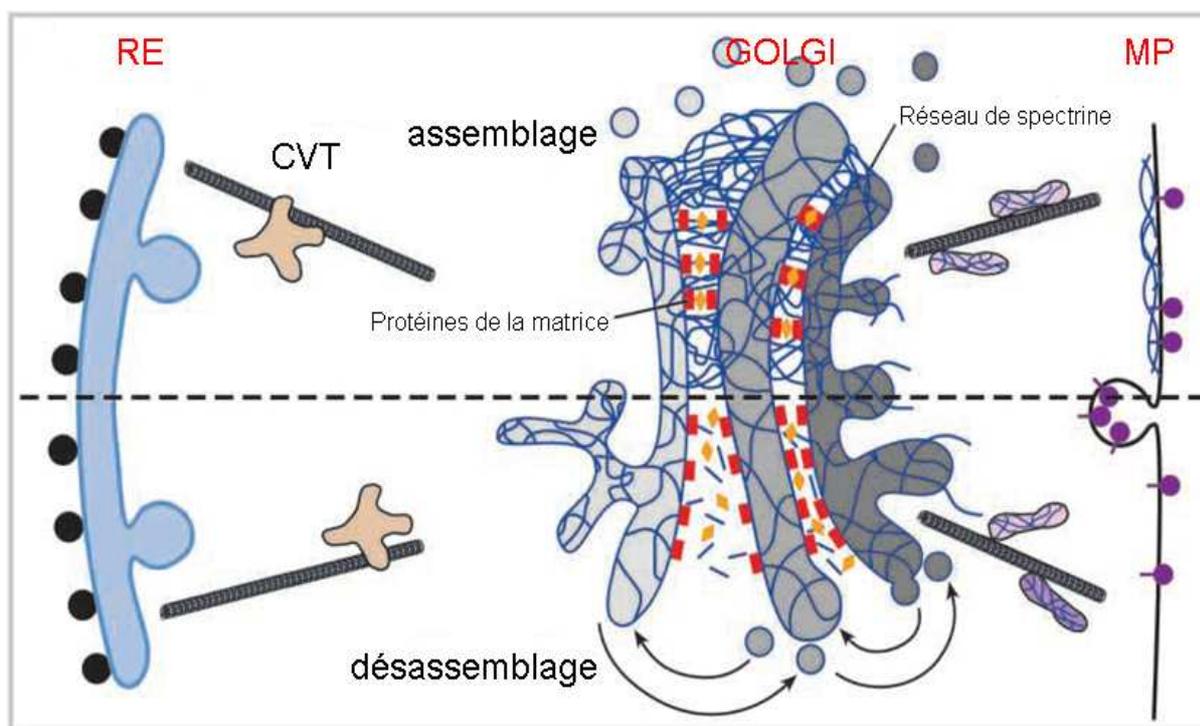


Figure 18: Représentation du modèle du squelette de la spectrine dans l'appareil de golgi proposé par De Matteis et Morrow (2000). ER réticulum endoplasmique, CVT cluster de vésicules tubulaires, MP membrane plasmique. (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).

IV.2.4.7.1 La spectrine dans le trafic intracellulaire du Réticulum Endoplasmique vers le Golgi

Plusieurs études montrent que le squelette membranaire semble être impliqué dans le trafic intracellulaire de vésicules. Une étude surexprimant le domaine N-terminal de la spectrine β I (un peptide recouvrant les domaines « actin binding domain » et « MAD1 ») bloque le transport de la pompe Na/K/ATPase du Réticulum Endoplasmique (ER) vers le Golgi (Devarajan, P., Stabach, P.R. *et al.* 1997) et la présence de cette spectrine serait régulée par la petite protéine G, ARF, (ADP ribosylation factor) qui contrôle l'architecture et la dynamique du Golgi (Godi, A., Santone, I. *et al.* 1998). D'autres travaux montrent que la spectrine β III, présente dans le Golgi, (Stankewich, M.C., Tse, W.T. *et al.* 1998) est co-purifiée et co-précipitée avec la dynactine (protéine moteur). La spectrine se lie directement à la contractine (Arp1), composant du complexe dynactine, par le domaine d'interaction à l'actine (Holleran, E.A., Tokito, M.K. *et al.* 1996). Sachant que la dynactine constitue le complexe dynéine/dynactine impliqué dans le transport de l'ER vers Golgi, la spectrine pourrait jouer un rôle sur le transport de ces vésicules (figure 19 en page 60).

La spectrine interviendrait également dans le transport dépendant de la dynactine des mélanosomes, (étude réalisée dans les mélanophores de Xénope) (Aspengren, S. et Wallin, M. 2004) et le transport rétrograde axonal (Muresan, V., Stankewich, M.C. *et al.* 2001). Une étude sur la spectrine α II montre qu'elle interagit avec des protéines moteur de la superfamille des kinésines, KIF3 par l'intermédiaire de KAP3, (kinesin-associated protein) impliquées dans le transport axonal (Takeda, S., Yamazaki, H. *et al.* 2000).

IV.2.4.7.2 La spectrine dans l'adressage de vésicules du Golgi vers la membrane plasmique

Le trafic des protéines vers la membrane apicale ou basolatérale se fait grâce à des motifs spécifiques que possèdent les protéines (Nelson, W.J. et Yeaman, C. 2001). Le squelette membranaire dépendant de la spectrine pourrait avoir un rôle important dans l'adressage correct de vésicules issues du trans-golgien vers la membrane

plasmique. Cette fonction a été suggérée par l'étude des interactions de protéines SNARES, composants de la machinerie de la fusion membranaire (Chen, Y.A. et Scheller, R.H. 2001). Il existe plusieurs types de SNARE : les SNAREs vésiculaires appelée v-SNARE (compartiment donneur) comme la synaptobrevine, les SNAREs cibles appelée t-SNAREs (compartiment accepteur) comme la syntaxine ou SNAP-25. L'interaction entre v-SNARE et t-SNARE permet l'arrimage des vésicules et leur fusion à la membrane du compartiment accepteur.

Des études montrent un lien entre la spectrine α II et les syntaxines ce qui suggère un rôle de la spectrine dans les processus de transport vésiculaires (Nakano, M., Nogami, S. *et al.* 2001; Teng, F.Y., Wang, Y. *et al.* 2001).

Dans les cellules T, la spectrine β I est impliquée dans l'activité de CD45, une phosphatase nécessaire au développement des thymocytes (activation), et dans la production de l'interleukin-2 (Pradhan, D. et Morrow, J. 2002). Les auteurs proposent que l'accumulation membranaire de CD45 est due au rôle de la spectrine dans le transfert de vésicules.

La spectrine est très exprimée dans le cerveau, constituant entre 2 à 3% des protéines totales (Davis, J. et Bennett, V. 1983; Bennett, V. et Gilligan, D.M. 1993). Dans les neurones, le squelette membranaire pourrait être impliqué dans la polarisation du transport axonal de protéines (Levine, J. et Willard, M. 1981), la spectrine est localisée dans les synapses, et jouerait un rôle dans la connexion de vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique neuronale (Goodman, S.R., Zimmer, W.E. *et al.* 1995) grâce à des interactions avec la synapsine (Sikorski, A.F., Terlecki, G. *et al.* 1991) et MUNC13 (Sakaguchi, G., Orita, S. *et al.* 1998) qui sont deux protéines spécifiques des vésicules synaptiques. L'isoforme de la spectrine β II Σ a été démontrée être une protéine essentielle de la transmission synaptique, elle est présente dans les vésicules synaptiques et participe à l'adhérence de ces vésicules dans les terminaisons nerveuses.

Le modèle SAATS (spectrine ankyrin adapter protein tethering system) montre la spectrine présente dans les vésicules pre- et post- golgiennes et un défaut de spectrine serait accompagné par une interruption des processus de transport (figure 19 en page 60) (Devarajan, P., Stabach, P.R. *et al.* 1997). La spectrine pourrait être impliquée dans la sélection de vésicules cargo du réticulum endoplasmique et dans le maillage de plusieurs vésicules afin de les transporter vers les compartiments

golgiens. Ce transport se ferait grâce à l'action du complexe dynéine/dynactine le long des microtubules du cis golgi. Les vésicules non attachées à la spectrine pourraient entrer dans un transport inverse et réintégrer le RE.

Modèle SAATS impliquant la spectrine dans l'adressage des protéines :

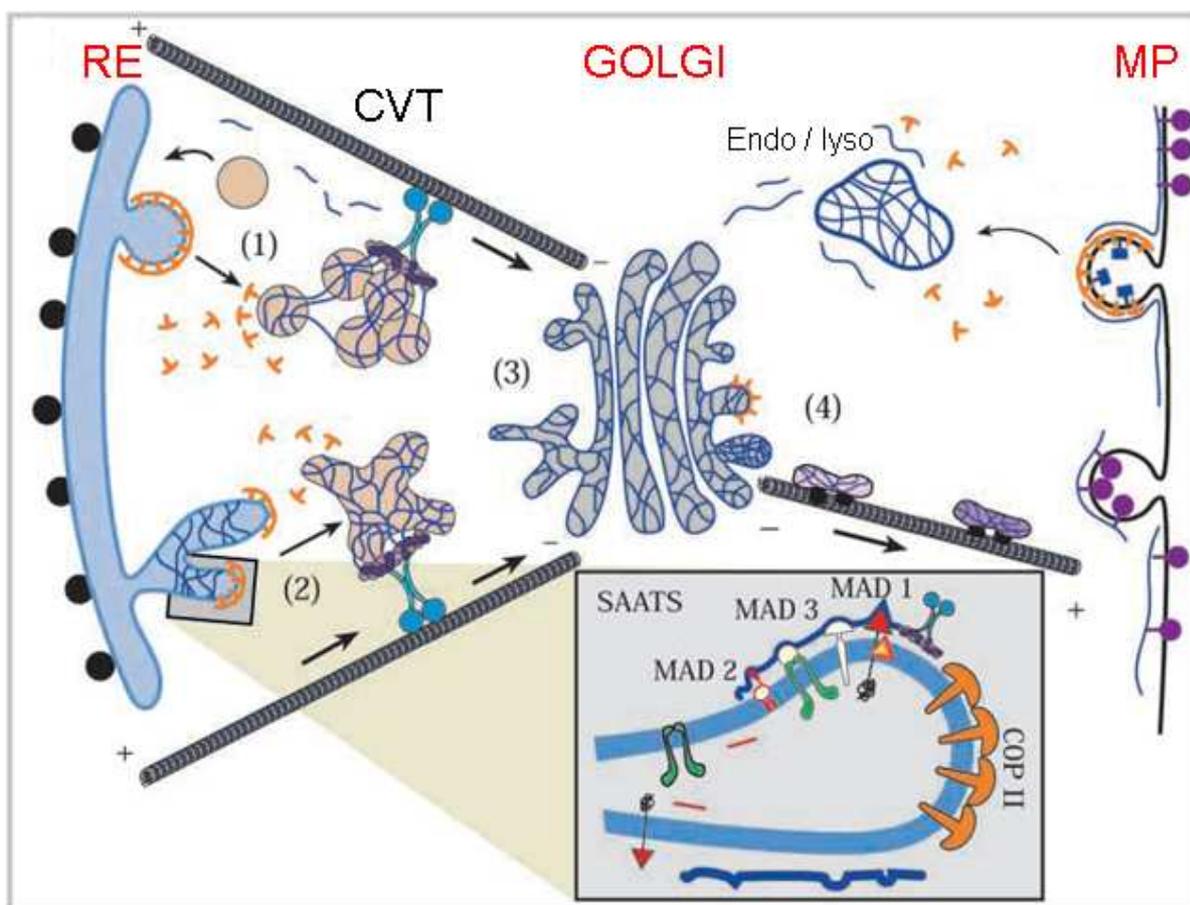


Figure 19: Le modèle SAATS (spectrin ankyrin adapter protein tethering system) pourrait lier et regrouper des vésicules du réticulum endoplasmique (RE) pour effectuer le transport de plusieurs vésicules via les protéines dynéine et dynactine le long des microtubules jusqu'au cis golgi (1,3). Alternativement, SAATS pourrait aussi être un système interne du RE (2). Les vésicules des compartiments intermédiaires qui ne sont pas capturées par le SAATS pourraient retourner au RE. En ce qui concerne le trans-golgi (TGN) et après (4), la spectrine liée à certaines protéines pourrait jouer le rôle de triage des protéines afin de donner le bon chemin, l'adressage des protéines vers la membrane plasmique (MP). (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).

IV.2.4.8 La spectrine et l'endocytose / exocytose

La spectrine pourrait réguler l'exocytose (Fujimoto, T., Lee, K. *et al.* 1991). La stimulation de la sécrétion des cellules chromaffines par la nicotine provoque une réorganisation de la spectrine α (Perrin, D., Moller, K. *et al.* 1992). Lorsque ces cellules sont perméabilisées et traitées avec un anticorps dirigé contre la spectrine α II, la sécrétion est inhibée. Les auteurs émettent l'hypothèse suivante : la spectrine α II jouerait le rôle de barrière dans l'exocytose (Aunis, D. et Bader, M.F. 1988). Par ailleurs comme il a été déjà dit, il a été montré que la spectrine α II interagissait avec des protéines de la famille des syntaxines, protéines cruciales dans les processus de fusion de vésicule dans les voies d'exo et d'endocytose. (Nakano, M., Nogami, S. *et al.* 2001). Des travaux sur des mutants spectrine (α et β) chez la drosophile ont montré des défauts de sécrétion de neurotransmetteurs dans l'espace pré-synaptique (Featherstone, D.E., Davis, W.S. *et al.* 2001). Ainsi la spectrine pourrait réguler ces phénomènes de sécrétion.

IV.2.4.9 La spectrine et le noyau

Plusieurs travaux montrent que la spectrine est présente dans le noyau (McMahon, L.W., Walsh, C.E. *et al.* 1999; McMahon, L.W., Sangerman, J. *et al.* 2001; Tse, W.T., Tang, J. *et al.* 2001; Sridharan, D., Brown, M. *et al.* 2003).

Deux isoformes de la spectrine β IV (Σ 1 et Σ 5) sont observées dans le noyau, l'isoforme Σ 1 aurait un rôle dans la formation du squelette nucléaire tandis que l'isoforme Σ 5 serait plutôt présente dans les corps nucléaires PML 'PML nuclear bodies'. Tse et collaborateurs suggèrent que le squelette nucléaire, formé par la spectrine β IV, pourrait participer au recrutement et à l'organisation de protéines nucléaires comme des facteurs de transcription (comme la protéine du rétinoblastome et p53, qui sont présentes dans les corps PML mais le lien avec la spectrine n'est pas connu), des facteurs d'épissage des ARNs, des enzymes de réparations de l'ADN (Tse, W.T., Tang, J. *et al.* 2001). La spectrine α II a été également observée dans le noyau de cellules humaines. Elle est présente dans des complexes protéiques associés à la chromatine (Sridharan, D., Brown, M. *et al.* 2003). Des expériences de co-immunoprécipitation montrent qu'elle est associée à un grand nombre de protéines présentant des fonctions diverses comme des

protéines de structure, des protéines remodelant la chromatine, des protéines qui jouent un rôle dans la transcription et le développement des ARNs (Sridharan, D.M.,McMahon, L.W. *et al.* 2006),des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme les protéines de la famille « Fanconi Anemia » (FA) avec FANCA ou FANCC (McMahon, L.W.,Walsh, C.E. *et al.* 1999; McMahon, L.W.,Sangerman, J. *et al.* 2001). La nature de ces interactions à savoir s'il s'agissait d'interactions directes ou indirectes, n'est pas définie mais ces observations suggèrent que la spectrine pourrait avoir plusieurs fonctions potentielles dans le noyau.

OBJECTIFS

Beaucoup de fonctions peuvent être allouées à la spectrine non érythroïde. Quelques rôles ont été spécifiquement attribués aux monomères β de la spectrine non érythroïde. En ce qui concerne le monomère α unique de la spectrine non érythroïde, peu d'études lui sont consacrées.

Cette étude a été élaborée pour obtenir des informations sur les fonctions du monomère α , l'implication de la spectrine α II (non érythroïde) dans les processus cellulaires comme la prolifération, l'adhérence, la migration

Pour rechercher les fonctions de la spectrine α II, nous avons modifié le taux d'expression de la spectrine α II par la technique de SiARN et observer les phénotypes engendrés sur un modèle cellulaire.

MATERIELS ET METHODES

I Matériels

I.1 Les anticorps

Les anticorps ont été dilués dans différentes solutions suivant les techniques :

pour le western blot voir III.3 Electrophorèse et Western blot en page 74.

pour la cytométrie en flux voir V Immunomarquage pour une analyse en Cytometrie en Flux en page 76.

pour la microscopie VI Immunomarquage pour une analyse en microscopie en page 77.

pour le blocage fonctionnel voir IX.3 L'expérience d'adhérence en présence d'anticorps bloquants des intégrines en page 85.

I.1.1 Les anticorps primaires

Les anticorps primaires et les dilutions utilisés dans les différentes techniques (western blot, cytométrie en flux, microscopie et blocage fonctionnel) sont répertoriés dans le tableau 2 en page 69.

I.1.2 Les anticorps secondaires

Les anticorps secondaires utilisés dans la technique du western blot sont des anticorps commerciaux (Nordic Immunology) de chèvre dirigés contre les IgG de souris ou de lapin et couplés à la peroxydase. Les dilutions utilisées sont respectivement de 1/10000 et 1/5000. L'anticorps secondaire utilisé en cytométrie en flux, est un anticorps de chèvre dirigé contre la souris ou le lapin couplé à la phycoérythrine (PE) à la concentration finale de 10 µg/mL (Beckman/coulter). Dans les expériences de microscopie ou de blocage fonctionnel, les anticorps secondaires sont des anticorps de chèvre dirigés contre la souris ou le lapin directement couplés à un Alexa 488 (Fluorescence verte) ou un Alexa 568 (Fluorescence rouge) dilués au 1/200 (Molecular Probes).

Nom	ref/Clône	Isotype	Applications				Fournisseur
			Western blot	cytométrie en flux	microscopie	bloccage fonctions	
spectrine α II Sh3		lapin polyclonal	1/100000	1/2000	1/10000	non	Gael Nicolas
Lamine A/C	h-110	lapin polyclonal	1/5000	non	non	non	Santa Cruz
inhibiteur du cycle cellulaire " Cell Cycle Regulation Sampler Kit"	protéine 15	lapin polyclonal	1/1000-1/2000	non	non	non	Cell signaling
	protéine 16	lapin polyclonal		non	non	non	
inhibiteur du cycle cellulaire protéine 21	sx118	souris monoclonal	1/1000-1/500	non	non	non	BD Biosciences
inhibiteur du cycle cellulaire protéine 27	g173-524	souris monoclonal	1-2 μ L/mL	non	non	non	BD Biosciences
rétinoblastome RB	g3-245	souris monoclonal	1-2 μ L/mL	non	non	non	BD Biosciences
Intégrines "Integrins Sampler Kit"	α 5	souris monoclonal		non	non	non	Cell signaling
	β 1	souris monoclonal	1/2500-1/5000	non	non	non	
	β 3	souris monoclonal		non	non	non	
Intégrines	α 3	souris monoclonal	non	5 μ g/mL	non	15-25 μ g/mL	Chemicon
	α 5	souris monoclonal	non	5 μ g/mL	10 μ g/mL	non	Chemicon
	α 5	souris monoclonal	non	non	non	15-25 μ g/mL	BD Biosciences
	β 1	souris monoclonal	non	5 μ g/mL	non	non	Chemicon
	α V β 3	souris monoclonal	non	5 μ g/mL	10 μ g/mL	15-25 μ g/mL	Chemicon
ERK 1/2	ab17942	lapin polyclonal	1/1000	non	non	non	AbCam
paxilline	h-114	lapin polyclonal	non	non	1/200	non	Santa Cruz

Tableau 2 : Répertoire des anticorps utilisés dans les différents travaux.

I.2 Les agents de transfection

Les agents de transfection utilisés sont : Lipofectamine 2000 (Invitrogen), Dharmefect4 (Dharmacon); Siport Amine (Ambion) et JetSi-endo (Polyplus).

I.3 Les SiARN

Les SiARN dirigés contre la spectrine ont été fournis par Dharmacon qui dispose d'une bibliothèque de SiARN. Il a été testé dans les premières expériences un pool de quatre SiARN dirigés contre la spectrine all, puis chacun des SiARN constituant ce pool :

1. siGENOME duplex D-009933-01 dont la séquence est **GCAAAGAUCUUACCAAUGUUU** (position dans l'unité répétitive 6) appelé SiARN 1 dans les expériences.

2. siGENOME duplex D-009933-02 dont la séquence est **GC AAGAAGCUGUCCGAUGAUU** (position dans l'unité répétitive 17) appelé SiARN 2 dans les expériences.

3. siGENOME duplex D-009933-03 dont la séquence est **CAACAGAGGUAAGGAUUUAUU** (position dans l'unité répétitive 7) appelé SiARN 3 dans les expériences.

4. siGENOME duplex D-009933-04 dont la séquence est **CGAGAGGAACUGAUUACAAUU** (position dans l'unité répétitive 2) appelé SiARN 4 dans les expériences.

Les SiARN ciblant la protéine p21 ont été obtenus chez Dharmacon sous forme d'un pool de quatre SiARN (référence siGENOME SMART POOL M-003471, Human CDKN1A).

Un pool de SiARN contrôles, non relevant (NR), c'est à dire des SiARN qui n'ont aucune cible dans la cellule, a été obtenu chez Dharmacon (non targeting SiARN, D-001210-01). Afin de tester l'efficacité des transfections, un SiARN contrôle couplé à un Alexa 488 a été obtenu chez Qiagen (Neg control SiARN AF488).

Principe pour diminuer le taux d'expression d'une protéine par la technique des SiARN :

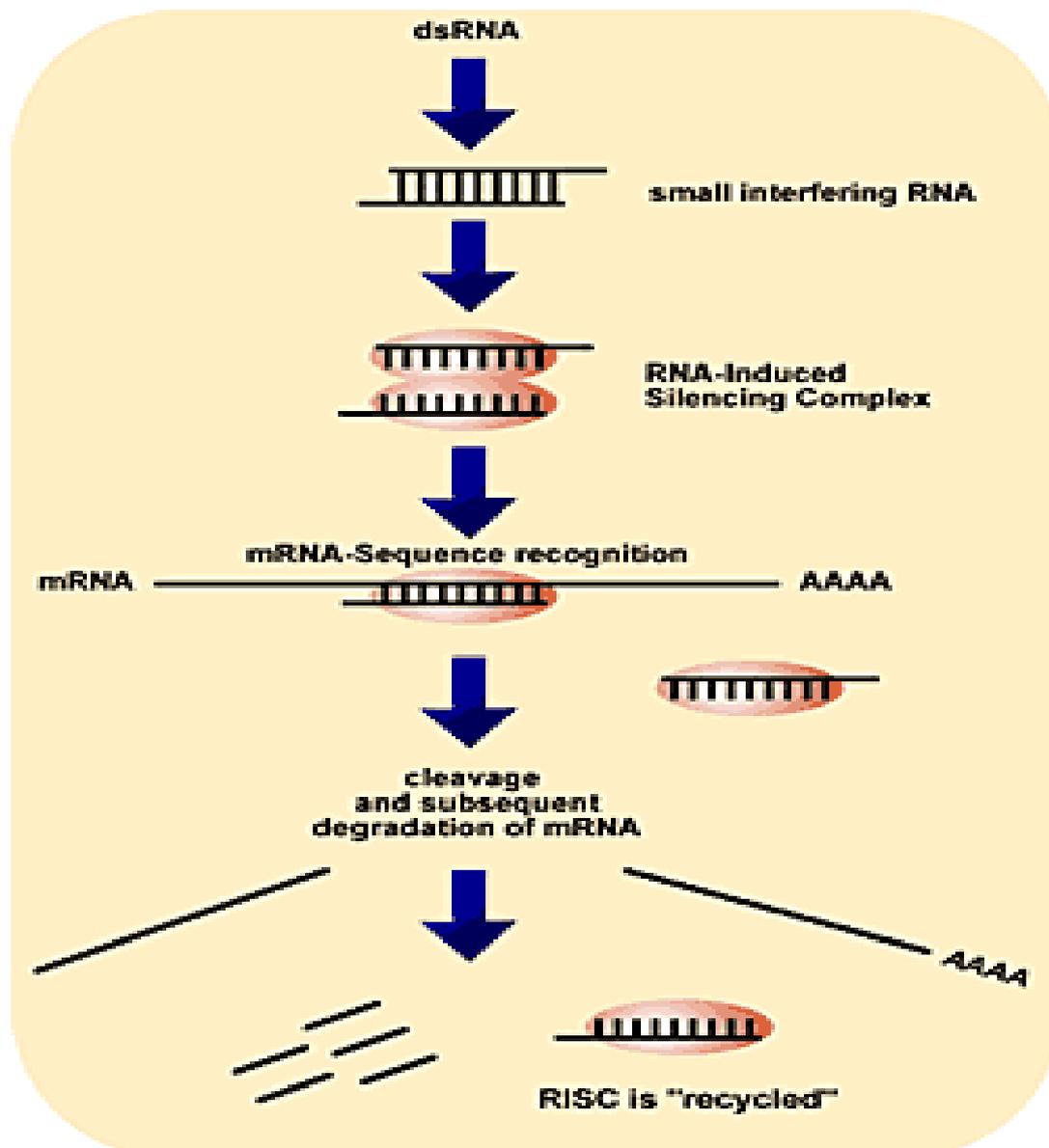


Figure 20: Schéma du principe de diminution de l'expression protéique par l'emploi de SiARN (image tirée du web à l'adresse suivante www.ohsu.edu/research/core/images/SiARN_MWG-biotech.gif). Les SiARN transfectés dans les cellules à l'état de double brin (dsRNA) sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique nommé RISC (RNA induce silencing complex). Ce complexe activé par libération du brin complémentaire de l'ARN, va reconnaître l'ARN messagers spécifique, son transcrite cible. Une fois la cible liée, la protéine Ago endonucléase, faisant partie du complexe RISC, va couper le transcrite au niveau du site de reconnaissance. Les deux morceaux du transcrite clivé par Ago vont être rapidement dégradés via leurs extrémités par des exonucléases. La transfection de SiARN dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARN messagers ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers.

II Méthodes générales de culture cellulaire

II.1 La lignée WM-266

La lignée cellulaire WM-266 isolée d'un mélanome humain au stade métastatique (obtenue chez ATCC) a été cultivée sur plastique, dans le milieu suivant : DMEM Glutamax 2 mM ; 4,5 g glucose ; pyruvate 1 mM (Gibco) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF PAN Biotech GmbH) et d'antibiotiques (pénicilline à 10 000 unit/ml et streptomycine 10 000 µg/ml) en étuve humide à 37°C sous 5% de CO₂.

Toutes les expériences ont été effectuées sur des cellules testées sans mycoplasmes et ayant entre 1 à 10 passages.

II.2 Le passage des cellules

Le passage des cellules effectué deux fois par semaine se fait selon le protocole suivant :

Les cellules sont lavées deux fois avec du D-PBS (DULBECCO'S-PBS ; 1X, Glucose, 1 g/l) (Gibco) sans calcium et sans magnésium, préchauffé à 37°C. Les cellules sont recouvertes d'une solution de trypsine 0,05 % / EDTA (soit 2-5 mL par flacon de 25 - 75 cm², respectivement) et incubées à 37°C le temps nécessaire pour visualiser leur détachement, soit environ 5 minutes pour cette lignée. L'action de la trypsine est ensuite neutralisée par ajout de 10 volumes de milieu de culture complet avec du SVF. Les cellules sont transférées dans un tube puis centrifugées à 360 g pendant 5 minutes. Ce protocole de détachement des cellules par la solution de Trypsine-EDTA est utilisé de façon commune dans les différentes expériences. Après élimination du surnageant, les cellules sont resuspendues dans leur milieu de culture DMEM.

Les cellules sont comptées sur cellule de malassez avant d'êtreensemencées (soit 200 000-600 000 cellules pour des flacons de 25-75 cm², respectivement).

II.3 La congélation et décongélation des cellules

Le culot correspondant à 2-4 millions de cellules est repris dans 1 ml de milieu de culture complet contenant 5% de DMSO. Les cellules sont soumises à une

congélation progressive grâce à un bain d'alcool placé à -80°C pendant 24 heures puis elles sont stockées dans des cuves d'azote liquide.

Les ampoules conservées dans l'azote liquide sont rapidement décongelées dans un bain-marie à 37°C , puis le contenu est rapidement placé dans un flacon de 75 cm^2 contenant 15 ml de milieu de culture préchauffé à 37°C .

III Méthodes générales de biochimie

III.1 La lyse des cellules

La lyse des cellules est réalisée directement dans le flacon de culture. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont lavées deux à trois fois avec du D-PBS (DULBECCO'S-PBS, 1X ; Glucose, 1 g/l ; Mg ; Ca) (Gibco) préchauffé à 37°C . Les cellules sont lysées pendant 5 minutes sous agitation à 4°C dans un tampon D-PBS contenant 1% SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), de l'ADNase OmniCleave™ Endonuclease (diluée au $1/100^{\text{e}}$ EPICENTRE Biotechnologies) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (au $1/100^{\text{e}}$) (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA). 1 mL de tampon de lyse est déposé par flacon de 75 cm^2 . Le lysat obtenu est centrifugé pendant 10 minutes à 360 g, le surnageant récupéré est conservé à -20°C .

III.2 Le dosage protéique

Le contenu en protéines des lysats cellulaires est estimé par la méthode colorimétrique de Lowry à l'aide du kit de quantification de protéine « Micro BC Assay » (Uptima).

Une gamme étalon est préparée avec de l'albumine de sérum bovin (SAB) de 0 à 1000 mg/mL diluée dans le tampon de lyse (PBS-SDS). Chaque échantillon est analysé en triplicate sur une plaque 96 puits.

Chaque puits contient dans l'ordre : 15 μL de l'échantillon, 135 μL D-PBS 1X et 150 μL d'une solution préparée extemporanément à partir des réactifs du kit (25 volumes de réactif A / 25 volumes du réactif B / 1 volume de réactif C). Après incubation une heure à 37°C , la plaque 96 puits est lue à 560 nm grâce à un lecteur de plaque. Les résultats sont analysés par le logiciel Biolyse.

III.3 Electrophorèse et Western blot

- Préparation des échantillons en vue de l'électrophorèse

A quatre volumes de lysat protéique est ajouté un volume de tampon d'échantillon selon Laemmli (5X) contenant du DTT, puis les échantillons sont dénaturés dans un bain marie avec une eau à ébullition, durant deux minutes.

Entre 10 - 40 µg de protéines sont déposés par puits. Le volume déposé est fonction de la concentration protéique.

Les électrophorèses sont réalisées en gels de poly-acrylamide à une concentration de 7 % à 12 % suivant la taille des protéines d'intérêt. La migration verticale se fait en tampon Tris-Glycine-SDS à voltage constant (120-150 V).

- Le transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines s'effectue en conditions semi sèches en tampon Tris-Glycine sur une membrane de nitrocellulose 0.45 µM (PROTAN) à voltage constant (25 V) pendant 90 à 120 minutes. Pour l'étude de protéines de faible poids moléculaire (<30-25 kDa), le transfert se fait en présence de méthanol (20%) sur une membrane de nitrocellulose 0.1 µM pendant 80 min.

Après électrophorèse, la qualité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau pendant cinq minutes à température ambiante sous agitation. La qualité du transfert peut être également vérifiée par coloration des protéines restées sur le gel d'acrylamide au bleu de Coomassie et décoloration à l'acide acétique 10%.

- Le blocage et l'incubation des anticorps

La membrane est saturée afin d'éviter le bruit de fond (interactions non spécifiques des anticorps) par incubation dans du lait écrémé à 5% dans du PBS 1X, contenant 0.05% Tween-20 (PBS-T) pendant une heure à 37°C. Après saturation, la membrane est incubée dans la solution lait/PBS-T contenant les anticorps primaires à la concentration adéquate, pendant une nuit à 4°C ou une à deux heures à 37°C.

Après trois lavages de 10 minutes avec du PBS-T, la membrane est incubée une heure à température ambiante sous agitation avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase diluée à la concentration adéquate dans la solution Lait/ PBS-T. La membrane est lavée trois fois en PBS-T pendant 10 minutes.

- La révélation des membranes par chemiluminescence

L'activité de la peroxydase sur son substrat (solution d'ECL « Enhanced Chemi Luminescence » Supersignal West Pico chemiluminescence's substrate de chez Pierce) émet un signal lumineux durant la réaction enzymatique dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine présente sur la membrane. Ce signal est détecté par une camera placée dans une chambre noire (système « Chemidoc » de BioRad), et est accumulé en fonction du temps. L'image obtenue par la camera est numérisée et sera analysée à l'aide du logiciel Quantity one (BioRad). Ce logiciel permet une analyse semi-quantitative des protéines, les signaux dégagés par l'activité de la peroxydase, qui dépendent de la quantité de protéine reconnue par l'anticorps primaire peuvent être comparés entre les pistes de la même membrane.

IV La transfection des cellules WM266 par les SiARN

Les paramètres techniques de transfection en suspension des WM-266 par les SiARN dirigés contre la spectrine avec l'agent jetSi-ENDO sont décrits dans ce chapitre, pour les transfusions effectuées avec d'autres agents de transfection comme Dharmafect 4, Lipofectamine 2000, ou Siport Amine, nous avons suivi les recommandations du fabricant.

IV.1 La préparation du mélange de transfection

Deux solutions sont préparées pour la transfection des cellules:

- Les SiARN sont dilués à la concentration désirée dans 25 μ L d'Opti-MEM (Gibco).

- L'agent de transfection jetSI-ENDO (Polyplus), dilué au 1/25ème dans de l'Opti-MEM est mélangé vigoureusement.

Après une incubation de 10 minutes, la solution d'agent de transfection est ajoutée et mélangée délicatement volume à volume à la solution de SiARN. Le mélange (agent de transfection dilué/SiARN) est incubé 30 minutes à température ambiante.

IV.2 La préparation des cellules à transférer

Les transfections ont été réalisées sur les cellules en suspension. Après récupération de cellules par la solution de trypsine-EDTA, ces cellules sont remises en suspension dans du milieu DMEM complet sans antibiotique, elles sont comptées, puis diluées à la concentration de 100 000 cellules/mL dans le milieu sans antibiotiques.

La transfection se fait par addition du mélange de transfection (un volume) avec 5 volumes de la solution contenant les cellules WM-266 (100 000 cellules par mL). Après un mélange à la pipette, les cellules sont immédiatement déposées dans des chambres de culture en respectant le rapport de 10 000-12 000 cellules par cm². Le milieu est remplacé 12 heures après la transfection par un milieu DMEM complet avec antibiotiques.

V Immunomarquage pour une analyse en Cytométrie en Flux

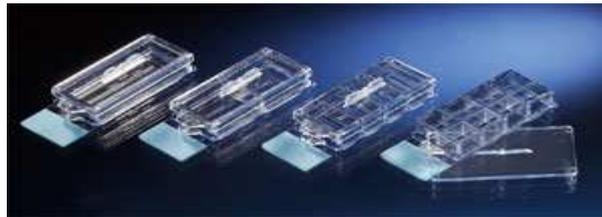
Le marquage se fait sur des cellules non fixées pour l'analyse des protéines transmembranaires et sur des cellules perméabilisées par l'éthanol pour l'étude de protéines intracellulaires ou lorsque l'épitope de la protéine d'intérêt reconnu par l'anticorps se trouve dans la cellule.

Cette expérience nécessite 2×10^6 cellules. Les cellules en suspension sont lavées trois fois avec du PBS froid, puis 1,5 mL d'éthanol à 60% sont ajoutés très doucement en deux fois au culot cellulaire. Après 15 minutes d'incubation dans de la glace, le culot est lavé trois fois, puis les cellules sont resuspendues dans un volume de 200 μ L de PBS, contenant 1% d'albumine de sérum bovin (PBS- BSA) et 4 μ L de sérum normal d'âne (NDS : normal donkey serum D9663 de chez Sigma). Après mélange, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à la température ambiante. Les cellules (50 μ L) sont incubés avec 100 μ L d'une solution d'anticorps primaires dilués dans du PBS-BSA pendant 45 minutes à température ambiante. Après deux lavages en PBS, le culot de cellules est resuspendu dans 100 μ L d'une solution d'un anticorps secondaire (5 μ g/mL) conjugué à la phyco-érythrine (PE) dans du PBS-BSA. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavées avec 4 mL de PBS. Ces cellules sont resuspendues dans 500 μ L du PBS-BSA.

Les cellules peuvent être analysées au cytomètre en flux afin de quantifier la protéine d'intérêt ciblée (quantification par comparaison de la fluorescence des cellules ayant reçues le même protocole mais en présence d'IgG non-spécifiques).

VI Immunomarquage pour une analyse en microscopie

Les cellules sont cultivées sur lame en verre de chambres de culture de type Lab-Tek™ II CC2™ Chamber Slide™ System (NUNC) comme illustré ci-dessous.



VI.1 Traitement des cellules avant marquage

Après trois lavages très doux avec du D-PBS préchauffé à 37°C (DULBECCO'S-PBS, 1X + Glucose, 1g/l, +Mg, +Ca) et élimination complète du D-PBS, les cellules adhérentes sont fixées par le paraformaldéhyde (PFA), dilué à 4% dans du D-PBS et préchauffé à 37°C) (300 µL par puits) pendant 25 minutes à 37 °C. Les cellules sont lavées ensuite deux fois pendant 5 minutes avec du D-PBS puis elles sont incubées pendant 10 minutes avec du NH₄Cl à 50 mM afin de neutraliser l'action du PFA. De nouveau, les cellules sont lavées deux fois 5 minutes par du D-PBS puis les membranes des cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 à 0.5% pendant 10 minutes et de nouveau trois lavages de 5 minutes sont faits avec du D-PBS pour éliminer toutes les traces résiduelles de Triton X100. Les cellules sont prêtes pour le marquage par les anticorps.

VI.2 Le marquage des cellules

Les cellules sont incubées avec une solution qui sature les sites, Image-iT™ (Invitrogen) pendant 30 minutes à température ambiante. Après lavages par du PBS, les cellules sont incubées pendant une heure à température ambiante en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution « Dako antibody diluant solution »

(Dako Cytomation). Les cellules sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS puis elles sont incubées soit avec l'anticorps secondaire soit avec la phalloïdine conjugués à un Alexa, dilués dans du Dako, pendant une heure à température ambiante à l'abri de la lumière afin de protéger les fluorochromes Alexa (Invitrogen). Les préparations sont ensuite lavées deux fois pendant 5 minutes avec du PBS puis elles sont recouvertes avec une solution de conservation :ProLong Gold (Invitrogen). Le ProLong Gold stabilise l'émission des fluorochromes (=antifading) et permet de sceller une lamelle à la lame. Cette préparation est mise à sécher toute la nuit à température ambiante à l'abri de la lumière, elle peut être conservée quelques semaines à 4°C.

Les analyses des lames se font soit par la microscopie en épi-fluorescence grâce à une lampe à vapeur de mercure ou bien grâce à la microscopie confocale possédant deux lasers, un laser Argon pouvant exciter les Alexa 488 et un Hélium-Néon qui excite les Alexa 568. Les objectifs utilisés dans ces analyses sont des objectifs à immersion de 20X, 40X et 60X.

VII L'étude du cycle cellulaire

VII.1 La préparation des cellules pour l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux

Le culot cellulaire correspondant à $1 - 2 \times 10^6$ cellules est resuspendu dans 500 μ L de PBS. Les cellules sont fixées par du PFA à 1% (5 mL) dans la glace pendant 15 minutes. Le surnageant est retiré après centrifugation (300 g pendant 5 minutes). Les cellules sont lavées trois fois dans du PBS (5 mL) et finalement resuspendues dans 500 μ L de PBS. Les cellules sont perméabilisées par addition de 5 mL d'éthanol 70% frais et incubation dans la glace pendant au moins 30 minutes. Puis les cellules sont conservées à -20°C .

VII.2 Le marquage de l'ADN par l'iodure de propidium et l'analyse en cytométrie en flux

Après avoir éliminé l'éthanol par lavage, les cellules fixées et perméabilisées (comme décrit ci-dessus) sont traitées par de l'iodure de propidium (concentration

finale, 50 µg/mL) et de la ARNase (concentration finale, 0.2 mg/mL) dans du PBS en présence de SAB (0.2 %). Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité à température ambiante, les cellules sont analysées en cytométrie en flux (figure 21 ci-dessous).

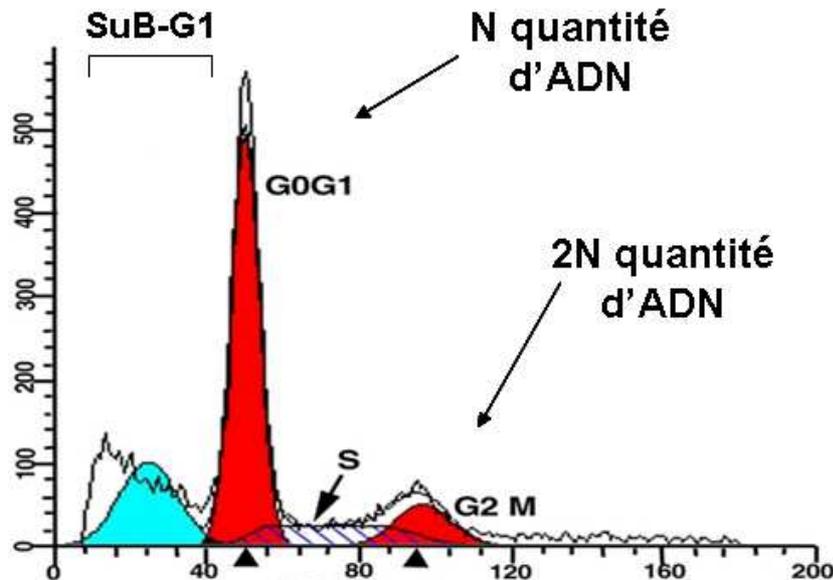


Figure 21 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire (image tirée du web à l'adresse suivante: www.lifespan.org/reslab/flow2final.jpg). Ce spectre du cycle cellulaire montre en ordonnée le nombre de cellules et en abscisse la fluorescence de l'iodure de propidium (marqueur de l'ADN). Les cellules possédant une quantité N d'ADN (X intensité de fluorescence) correspondent à des cellules en phases G0/G1 du cycle cellulaire ; les cellules avec une quantité 2N d'ADN (2X intensité de fluorescence) sont celles en phases G2/M. Les cellules possédant moins de N quantité d'ADN (moins de X intensité de fluorescence) sont des cellules en apoptose ou Sub-G1.

VIII L'étude de l'apoptose

Les différentes phases qui conduisent à l'apoptose, (figure 22 en page 80) induisent des phénomènes cellulaires détectables comme la modification du potentiel de la membrane mitochondriale, la fragmentation de l'ADN génomique, la perte de l'asymétrie membranaire, l'activation de protéases spécifiques. Nous avons choisi de suivre l'apoptose par les approches suivantes : analyse de l'ADN dans la cellule par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium (PI), de la fragmentation

de l'ADN par la technique TUNEL et étude du potentiel de la membrane mitochondriale par le DIOC6.

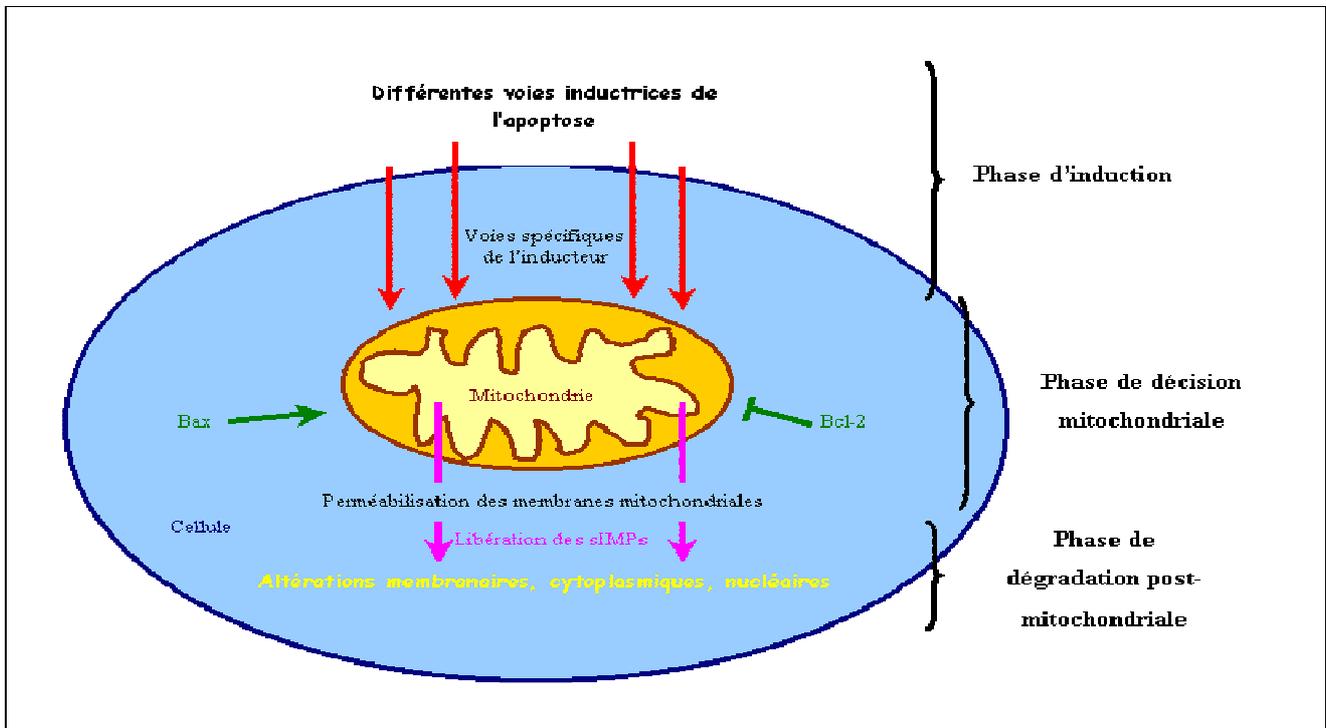


Figure 22: Les différentes phases durant le processus de mort cellulaire. Les conséquences des stimuli apoptotiques provenant de différents inducteurs (différentes voies d'induction) peuvent être suivies séquentiellement dans le temps. Des phénomènes apoptotiques précoces constituent la phase de décision mitochondriale dans lequel les membranes mitochondriales sont très perméables, libérant ainsi les sIMPs (soluble intermembran mitochondrial proteins) puis survient une phase, plus tardivement, la phase de dégradation post-mitochondriale au sein duquel les cellules subissent des modifications morphologiques avec des altérations de la membrane, du cytoplasme et du noyau. La cellule se fragmente en corps apoptotiques.

VIII.1 L'analyse du SubG1 du cycle cellulaire

Lors de l'apoptose, les cellules se fragmentent en corps apoptotiques. L'analyse du cycle cellulaire par un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium, montre des cellules ayant une quantité d'ADN inférieure à N (pic Sub-G1, figure 21 en page 79) caractéristique des corps apoptotiques. Le Sub-G1 représente une détection de l'apoptose tardive.

VIII.2 Analyse de la fragmentation de l'ADN : L'effet TUNEL

Le principe de l'effet TUNEL

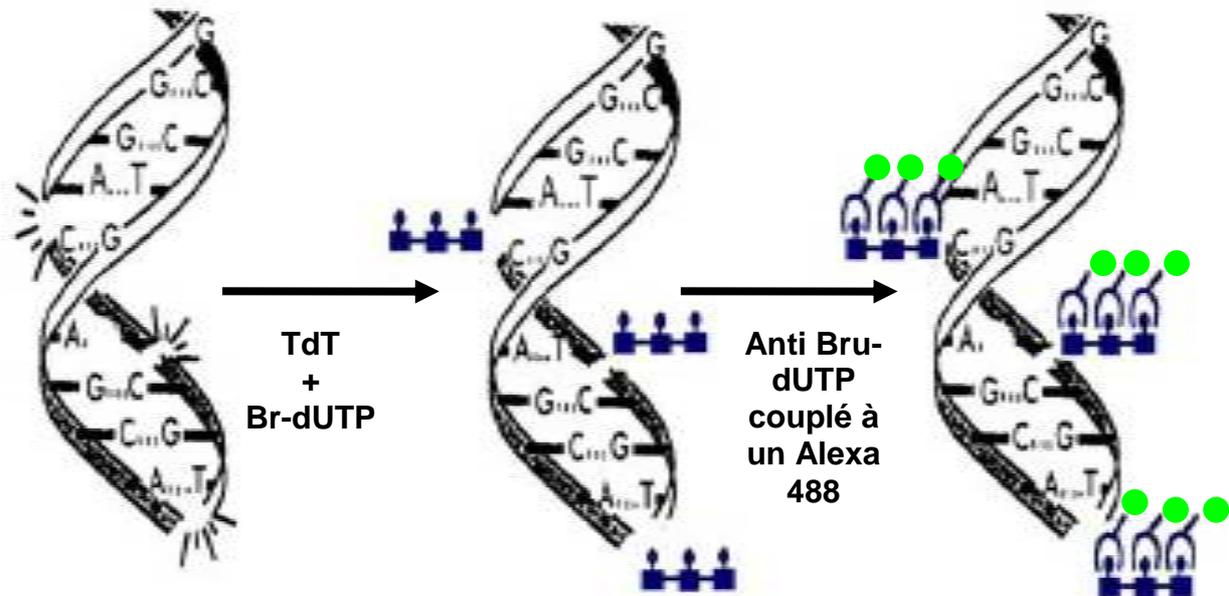


Figure 23: Méthode pour mesurer la fragmentation de l'ADN (Image tirée du protocole du kit APO-BRDU™), TdT : enzyme déoxynucleotidyl transferase, Br-dUTP : desoxythymidine 5 bromo2 desoxyuridine 5 triphosphate.

La fragmentation de l'ADN des cellules apoptotiques est détectée par la méthode TUNEL grâce au kit APO-BrdU TUNEL Assay (Molecular Probes) (figure23 ci-dessus). Le principe de cette analyse repose sur la réparation de l'ADN par une enzyme, la deoxy-nucleotidyl transferase (TdT), qui incorpore les desoxy ribo nucleotides en 3'OH, en présence d'un analogue du desoxy-thymidine, le 5 bromo2 desoxy-uridine 5 triphosphate, Brd-UTP qui stoppe la néo-synthèse de l'ADN. L'incorporation de Brd-UTP est détectée grâce un anticorps dirigé contre le Brd-UTP couplé à une sonde fluorescente (Alexa 488).

Préparation des cellules et réaction enzymatique

Les cellules sont préalablement traitées comme dans l'analyse du cycle cellulaire (fixation par le PFA et perméabilisation par l'éthanol). Après centrifugation (300 g pendant 5 minutes) des cellules dans l'éthanol 70%, l'éthanol est enlevé par aspiration et le culot cellulaire est lavé deux fois par centrifugation (300 g pendant 5 minutes) par la solution de lavage du kit « WASH BUFFER » (1 ml).

Le culot de cellules est resuspendu dans 50 μ L de la solution de marquage de l'ADN (contenant 10 μ L de « buffer green », 0.75 μ L d'enzyme TdT, 8 μ L de BrdUTP et 31.25 μ L d'eau déminéralisée) et est incubé pendant 60 minutes à 37°C sous agitation. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec 1 mL de 'RINSE Buffer' et centrifugées à 300 g pendant 5 minutes.

Le marquage des BrdUTP incorporés

Le culot de cellules est resuspendu dans 100 μ L de la solution de marquage du BrdU (5 μ L de l'anticorps dirigé contre le BrdU couplé avec un Alexa 488 dans 95 μ L de la solution de « RINSE Buffer » du kit) et est incubé 30 minutes à la température ambiante à l'abri de la lumière avant d'être analysé par cytométrie en flux.

Cette analyse de l'apoptose peut être couplée à l'analyse du cycle cellulaire en effectuant un deuxième marquage de l'ADN par l'iodure de propidium. 500 μ L d'une solution, composée d'iodure de propidium et d'ARNase (fournie dans le kit), sont additionnés à l'échantillon après l'incubation précédente. L'échantillon est une nouvelle fois incubé 30 minutes à l'abri de la lumière.

VIII.3 Le DiOC6 : l'analyse du $\Delta\psi$ de la membrane mitochondriale

Le DiOC6 est un colorant cationique lipophile perméant (figure 23 en page 81) qui est stocké à l'intérieur des mitochondries dans les cellules saines. Les cellules rentrant en apoptose, ont leur $\Delta\psi$ de la membrane mitochondriale qui chute, libérant le DiOC6. Les cellules apoptotiques possèdent une fluorescence en DiOC6 beaucoup plus faible. Ce colorant est utilisé pour la détection précoce de l'apoptose.

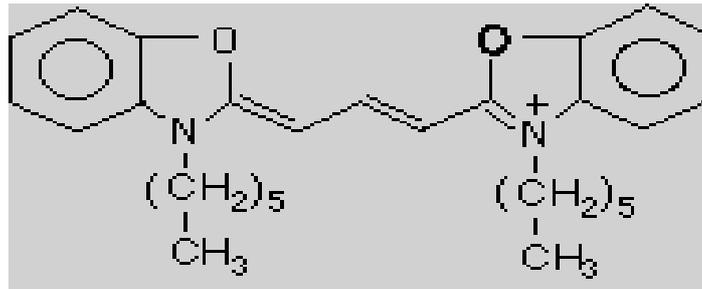


Figure 24 : Structure moléculaire du DiOC 6 (image tirée d'une page web dont l'adresse est la suivante : [www.gla.ac.uk/centres/cellengineering/Teaching-at-CCE/Teaching - MCB - G3 / Fluo_Labs_Support . htm](http://www.gla.ac.uk/centres/cellengineering/Teaching-at-CCE/Teaching-MCB-G3/Fluo_Labs_Support.htm)).

Le culot cellulaire correspondant à 5×10^5 cellules est lavé plusieurs fois par du PBS, puis resuspendu dans 100 μL d'une solution de PBS contenant du DiOC6 (concentration finale, 80 nM), de l'iodure de propidium (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et de SAB (0.2%). Après une incubation de 30 minutes dans l'obscurité à 37°C, 200-300 μL de PBS sont rajoutés dans le tube avant l'analyse au cytométrie en flux.

IX L'adhérence statique des cellules

Dans les expériences d'adhérence, deux groupes de cellules ont été utilisés:

- Des cellules WM-266 qui n'ont pas été traitées par l'agent de transfection, et marquées par le colorant vital Hoechst 33342, ces cellules sont considérées comme un témoin d'adhérence.
- Les cellules transfectées marquées par la calcéïne AM (Molecular Probes).

IX.1 Préparation des cellules

IX.1.1 Le marquage des cellules témoin avec le Hoechst 33342

Les cellules WM-266 sont décollées du flacon de culture par un traitement avec une solution de versène (5 mL pour 10^6 cellules/mL) puis elles sont lavées deux fois en D-PBS, et centrifugées à 360 g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est resuspendu dans un volume de 5 mL de milieu de culture DMEM sans SVF et en présence d'antibiotiques. Après ajout de 10 μL de Hoechst 33342 (correspondant à

une dilution de 500), les cellules sont incubées 30 minutes dans un bain-marie à 37°C.

Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois dans le milieu de culture utilisé pour l'incubation, et sont comptées sur une cellule de Malassez.

IX.1.2 Le marquage des cellules transfectées avec la calcéïne AM

Les cellules transfectées sont récupérées par un traitement semblable aux cellules témoins, lavées 2 fois en D-PBS, après le deuxième lavage elles sont centrifugées à 360 g pendant 5 minutes. Ces cellules ($5 \times 10^5 - 10^6$) sont resuspendues dans 1 mL de D-PBS en présence de calcéïne (10 μ L à 1 μ g/ μ L) et incubées pendant 30 minutes dans un bain marie à 37°C. Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du milieu de culture et sont comptées comme précédemment.

Ces deux marquages se font en même temps. Une fois les concentrations cellulaires connues, les cellules marquées au Hoechst 33342 et les cellules à étudier marquées à la calcéïne sont rassemblées dans un rapport de 1/1.

IX.2 Tests d'adhérence

Les expériences d'adhérence statique sont effectuées sur des plaques 12 puits de 3.5 cm². 200 000 cellules (50 μ L), ce qui correspond à 100 000 cellules témoins marquées au Hoechst 33342 et 100 000 cellules transfectées marquées à la calcéïne, sont déposés par puits qui contiennent du milieu de culture DMEM complet contenant des antibiotiques. La plaque est incubée à 37°C à l'étuve pendant deux heures pour l'analyse de l'adhérence statique ou 4 heures pour observer l'étalement des cellules.

Après incubation, le milieu de culture est enlevé, puis deux lavages sont effectués avec du milieu de culture préchauffé, ceci pour enlever toutes les cellules en suspension qui peuvent gêner l'observation des cellules adhérentes.

Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence (objectif 10X) grâce à la détection de la fluorescence à 478 nm du Hoechst 33342 pour les cellules témoins et à la fluorescence de la calcéïne à 517 nm pour les cellules transfectées.

Pour chaque type d'échantillon, trois puits sont réalisés, et entre 5 à 10 images sont prises par la caméra pour chaque puits et pour chaque fluorescence. Grâce au

logiciel 'Image-PRO plus', les cellules adhérentes marquées au Hoechst ou à la calcéïne sont comptées sur chaque prise de vue. Un rapport est établi entre le nombre de cellules marquées à la calcéïne et celui de cellules marquées au Hoechst 33342.

IX.3 L'expérience d'adhérence en présence d'anticorps bloquants des intégrines

Ces tests d'adhérence avec les anticorps bloquants, sont semblables à ceux décrits ci-dessus avec en plus un traitement des cellules avec un anticorps bloquant ciblant une intégrine avant le marquage à la calcéïne.

Les cellules (5×10^5 à 10^6) sont incubées 90 minutes à température ambiante dans du PBS-BSA à 0,1% contenant un ou plusieurs anticorps bloquants à une concentration finale de 15 - 25 $\mu\text{g/mL}$. Après deux lavages en D-PBS, ces cellules sont marquées par la calcéïne comme ci-dessus mais en présence d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 568 à une concentration finale de 5 $\mu\text{g/mL}$.

X La migration des cellules

Les tests de migration ont été faits sur un système Transwell (chambre de Boyden) avec une membrane présentant des pores de diamètre 0.8 μm d'après l'article de Fagiani et al (Fagiani, E.,Giardina, G. *et al.* 2007).

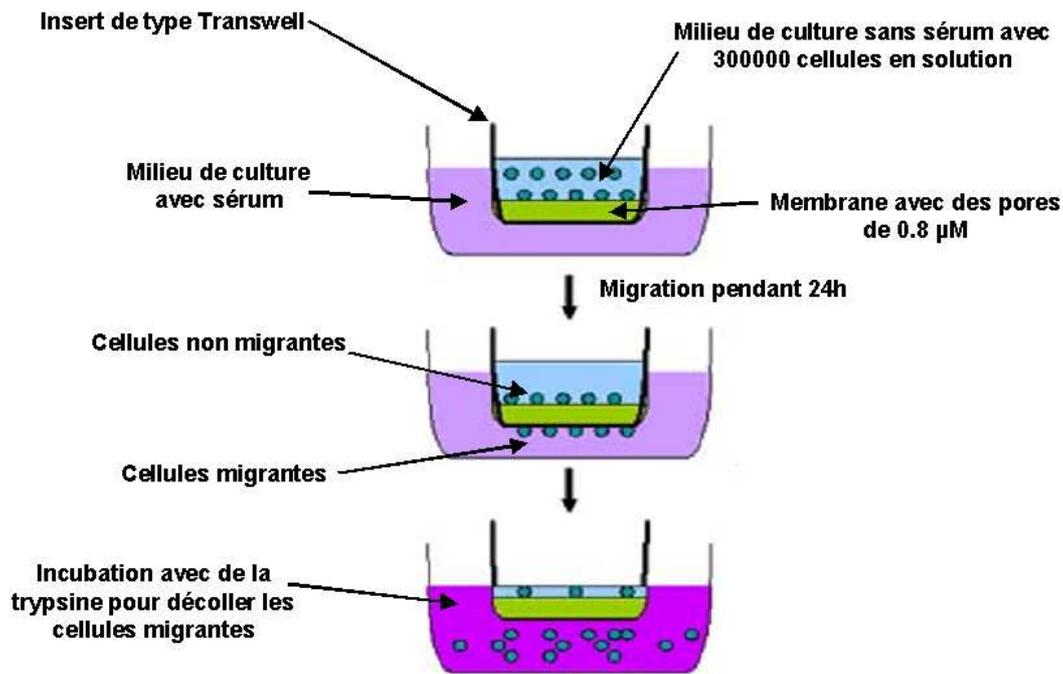


Figure 25 : Schéma montrant le principe de mesure de la migration cellulaire Image tirée de l'internet à l'adresse suivante : [www.biocat.de/bc/pdf/migration% 20fluorometric .pdf](http://www.biocat.de/bc/pdf/migration%20fluorometric.pdf).

X.1 Tests de migration

Les cellules (300 000) sont déposées dans la chambre supérieure dans un volume de 200 µL de milieu DMEM sans SVF contenant des antibiotiques et 0.1 % de BSA. 500 µL du même milieu mais contenant 10% de SVF sont mis dans la chambre inférieure, la plaque est incubée 24 heures dans l'étuve à 37°C.

Les cellules migrantes traversent la membrane et sont présentes dans le puits, soit en suspension dans le milieu, soit adhérentes au fond du puits.

X.2 La récupération des cellules migrantes pour comptage par la cytométrie en flux

Après élimination du milieu de la chambre supérieure, les cellules non migrantes restées à la surface supérieure de la membrane sont éliminées par un coton tige (figure 25 ci-dessus).

Les cellules migrantes non adhérentes sont récupérées par centrifugation du milieu du puits et des liquides de lavage du puits par le D-PBS. Les cellules migrantes

adhérentes au fond du puits sont récupérées après traitement trypsine /EDTA (300 μ L) et inhibition de la trypsine par ajout du milieu de culture complet. Ces différentes fractions de cellules migrantes sont rassemblées et sont centrifugés à 360 g pendant 5 minutes. Après deux lavages en D-PBS, les cellules sont reprises dans 500 μ L de D-PBS avec 0.1 % de SAB et 0.2 μ g/mL d'iodure de propidium (pour évaluer les cellules mortes). Cette suspension de cellules est analysée au cytomètre en flux afin de compter les cellules.

XI Le fractionnement cellulaire : Extraction nucléaire cytoplasme des cellules transfectées

La fraction nucléaire des cellules WM-266 est isolée de la fraction cytosolique grâce au kit BioVision K266. Les cellules (1 à 2 millions) sont collectées par centrifugation à 600 g pendant 5 minutes à 4°C, puis sur le culot de cellules sont ajoutés 200 μ L de la solution du kit CEB-A MIX contenant du DTT et des antiprotéases fournis dans le kit.

Après une agitation vigoureuse (sur Vortex) pendant 15 secondes pour obtenir une solubilisation complète du culot de cellules, le tube est incubé dans la glace pendant 10 minutes. Le tampon d'extraction du cytosol (solution CEB-B) (11 μ L) est ajouté dans le tube resté dans la glace qui est agité pendant 5 secondes puis est laissé une minute dans la glace. Après 5 secondes d'agitation, le tube est centrifugé 5 minutes à la vitesse maximale soit 16 000 g. Le surnageant est récupéré dans un tube propre dans la glace, il correspond à la fraction cytoplasmique des cellules. Le culot est resuspendu vigoureusement (vortex) pendant 15 secondes dans 100 μ L de tampon d'extraction nucléaire (NEB MIX) contenant du DTT et des antiprotéases, puis il est placé dans la glace pendant 10 minutes ; cette opération est répétée trois fois. Après une centrifugation à vitesse maximale de 16 000 g pendant 10 minutes, le surnageant qui correspond à la fraction nucléaire est prélevé dans un tube. Les extraits cytoplasmique et nucléaire sont conservés à -80°C .

XII L'étude de l'expression de protéines membranaires à la surface des cellules

Pour cette étude, les cellules sont détachées de leur support par du versène. Après lavage des cellules (0.5×10^6) par du PBS froid, le culot est resuspendu dans 100 μL de la solution d'anticorps dirigée contre la protéine d'intérêt, dilué à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ dans du PBS-BSA à 0.2%. Après incubation à 4°C pendant 90 minutes, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS en centrifugeant le tube à 480 g pendant 5 minutes.

Le culot de cellules est repris dans 100 μL d'un anticorps secondaire conjugué à un Alexa 488 dilué à 5 $\mu\text{g/mL}$ dans du PBS-BSA à 0.2%. Les cellules sont incubées à température ambiante pendant 45 minutes, puis elles sont lavées en PBS. Au culot de cellules sont ajoutés 500 μL d'une solution de PBS-BSA à 0.2% avec 0.2 $\mu\text{g/mL}$ d'iodure de propidium. Les cellules sont prêtes pour une analyse au cytomètre en flux.

- La détermination du nombre de site à la surface des cellules

L'analyse du nombre de sites à la surface des cellules se fait grâce au kit Dako-QIFIKIT® beads. Ce kit renferme une solution qui contient plusieurs populations de billes, chacune présentant à leur surface, un nombre défini de sites, c'est à dire un nombre connu de molécules d'IgG. Ces billes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine (PE) Par analyse de la fluorescence au cytomètre en flux, on peut déterminer une droite rapportant le nombre de sites à la fluorescence obtenue (figure 26 en page 89)

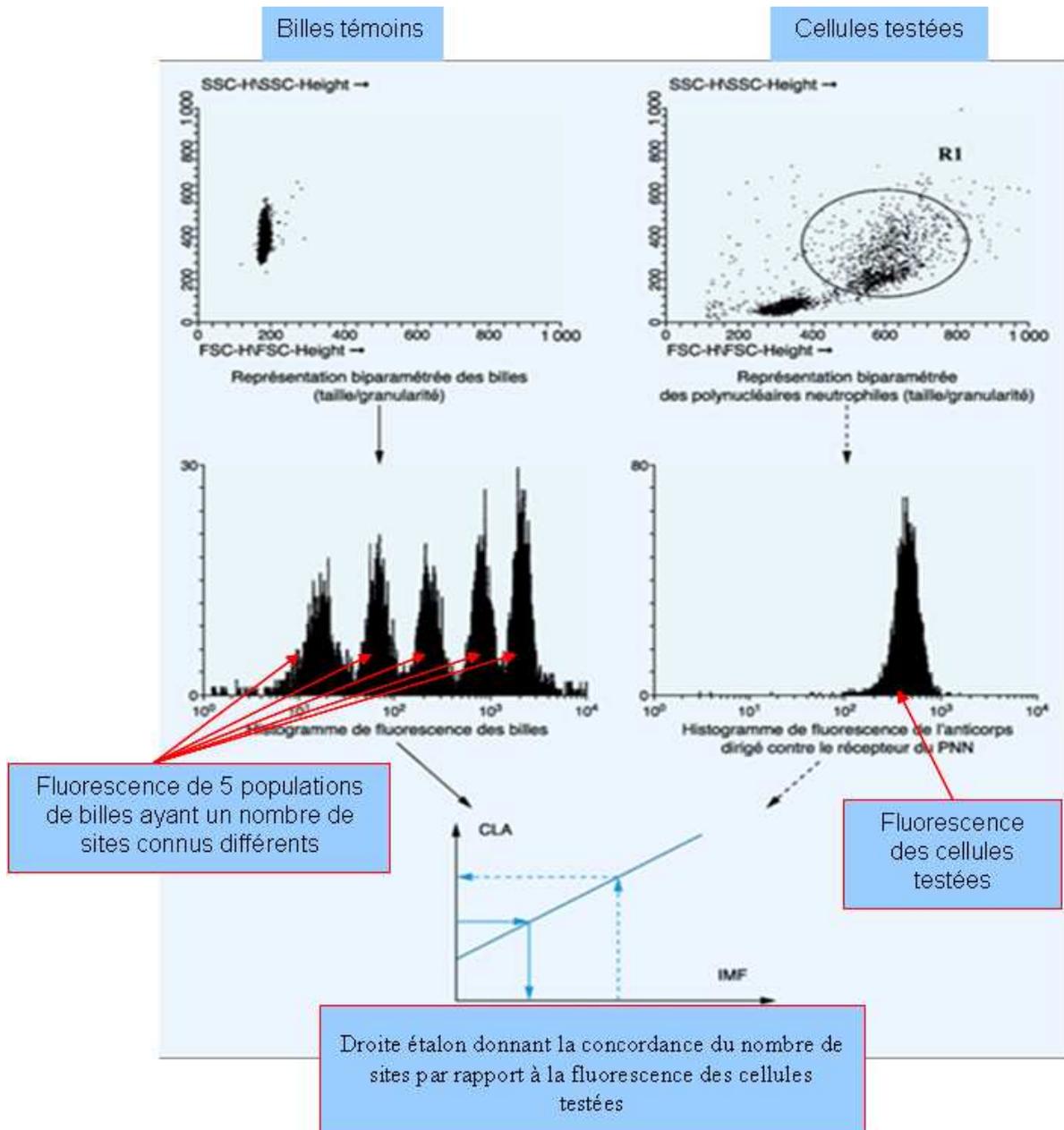


Figure 26 : Schéma montrant l'utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux (image tirée d'Annales de Biologie Clinique. Volume 58, Numéro 3, 337-43, Mai - Juin 2000, De mémoire d'interne).

RESULTATS

I La présentation du modèle utilisé pour l'étude des fonctions de la spectrine α II

Choix du modèle cellulaire : nos données et celles de la littérature révèlent que la spectrine a un rôle dans l'organisation de domaines membranaires spécialisés, et dans la dynamique de l'actine, donc elle pourrait intervenir dans la fonction des domaines spécialisés que sont les structures d'adhérence, entre cellule-cellule ou cellule-matrice. Nous avons choisi de travailler sur une lignée cellulaire adhérente obtenue à partir d'un site métastatique de mélanome humain malin, la lignée WM-266, qui montre un réseau d'actine développé et une bonne expression de la spectrine.

D'après les images obtenues en microscopie confocale, les cellules WM-266 présentent 1) un réseau d'actine dense : L'actine F (marquée par la Phalloïdine couplée à un Alexa 568) est présente à la membrane ainsi que sous la forme de fibres de stress à la base des cellules (figure 27 ci-dessous), 2) un marquage de la spectrine α II au niveau de la membrane mais aussi dans le cytoplasme. Cette localisation particulière de la spectrine α II dans le cytoplasme a déjà été décrite dans des cellules tumorales de certains adénocarcinomes (Sormunen, R., Paakko, P. *et al.* 1994; Tuominen, H., Sormunen, R. *et al.* 1996).

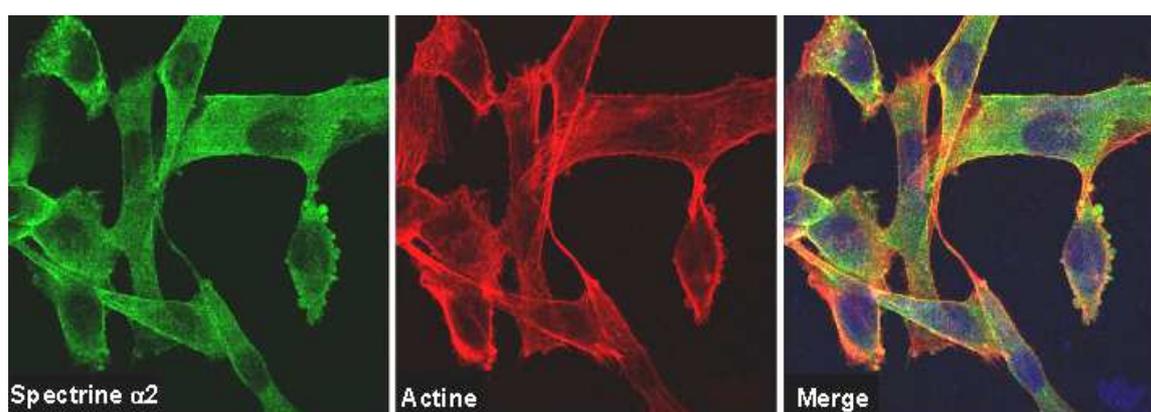


Figure 27 : Localisation par fluorescence, sur le modèle cellulaire WM-266, de la spectrine α II (anticorps polyclonaux dirigé contre le SH3 de la spectrine α II, Alexa 488 en vert), de l'actine F (marquage par la phalloïdine couplé à l'Alexa 568 (en rouge) et du noyau par un marquage de l'ADN (marquage DAPI en bleu).

I.2 La présentation des mises au point concernant la technique des SiARN

I.2.1 Les mises au point des transfections

Afin d'obtenir une efficacité de transfection supérieure à 90% et une bonne viabilité des cellules, nous avons étudié différentes conditions de transfection des SiARN dans les cellules WM-266. La mise au point de la technique de transfection des SiARN a reposé sur le choix des paramètres suivants:

1/ choix du type de transfection (transfection sur cellules adhérentes ou sur cellules en suspension).

2/ choix de l'agent de transfection.

Pour déterminer ces deux paramètres, nous avons réalisé des transfections avec un SiARN non-relevant, n'ayant aucune cible dans les cellules et portant un fluorochrome (Alexa 488). Grâce à ce SiARN, nous avons pu mesurer l'efficacité de transfection par cytométrie en flux pour chaque type d'agent de transfection ainsi que pour chaque type de transfection, 24 h après la transfection.

La toxicité des différents agents de transfection sur les cellules a été évaluée également en cytométrie en flux par l'incorporation d'iodure de propidium dans l'ADN des cellules mortes.

Les premières expériences ont rapidement montré un meilleur taux de transfection sur cellules en suspension que sur cellules adhérentes. Nous avons poursuivi nos essais uniquement sur cellules en suspension.

	Taux de viabilité	Taux de transfection
contrôle	93%	1%
Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	90%	67%
Dharmafect 4 (Dharmacon)	93%	62%
siPORTAmine (Ambion)	80%	86%
JetSi-endo (Poly-plus)	90%	95%

Tableau 3 : Taux de transfection et de viabilité des cellules WM-266 selon l'agent de transfection. Le taux de viabilité des cellules ainsi que le taux de transfusions ont été évalués 24 h après la transfection. Ces transfusions ont été réalisées sur des cellules en suspension en présence de SiARN non-relevant couplé à un Alexa 488 à une concentration de 50 nM.

Les agents de transfection comme « Lipofectamine 2000 » (Invitrogen) ou « Dharmafect 4 » (Dharmacon) montrent un taux de transfection de 60 et 70%, respectivement avec une toxicité modérée, (voir tableau 3 ci-dessus). L'agent de transfection 'siPORT AMINE' (Ambion) est plus efficace mais cet agent montre une certaine toxicité sur ces cellules. Avec l'agent de transfection JetSi-endo (Poly-plus) dans les conditions de transfection que nous avons déterminées, on obtient un bon compromis entre le taux de transfection et le taux de viabilité des cellules en comparaison avec les agents précédemment testés. Avec cet agent, le pourcentage de cellules transfectées est de 95% avec un pourcentage de cellules adhérentes viables de l'ordre de 90%.

Donc nous avons choisi d'utiliser cet agent JetSi-endo pour une transfection sur des cellules WM-266 en suspension.

I.2.2 Choix des SiARN ciblant la spectrine

Après ces mises au point des conditions de transfection des cellules WM-266, nous avons testé l'efficacité des SiARN ciblant la spectrine α II en évaluant l'expression de la spectrine α II en western blot. Dans un premier temps nous avons utilisé un pool de quatre SiARN fournis par l'entreprise Dharmacon.

Les premières expériences ont révélé une efficacité du pool de SiARN comme le montre la diminution de spectrine analysée en Western blot (figure 28 ci-dessous). Nous avons testé ensuite séparément l'efficacité de chacun des SiARN contenu dans ce pool et dirigé contre la spectrine α II à une concentration de 50 nM.

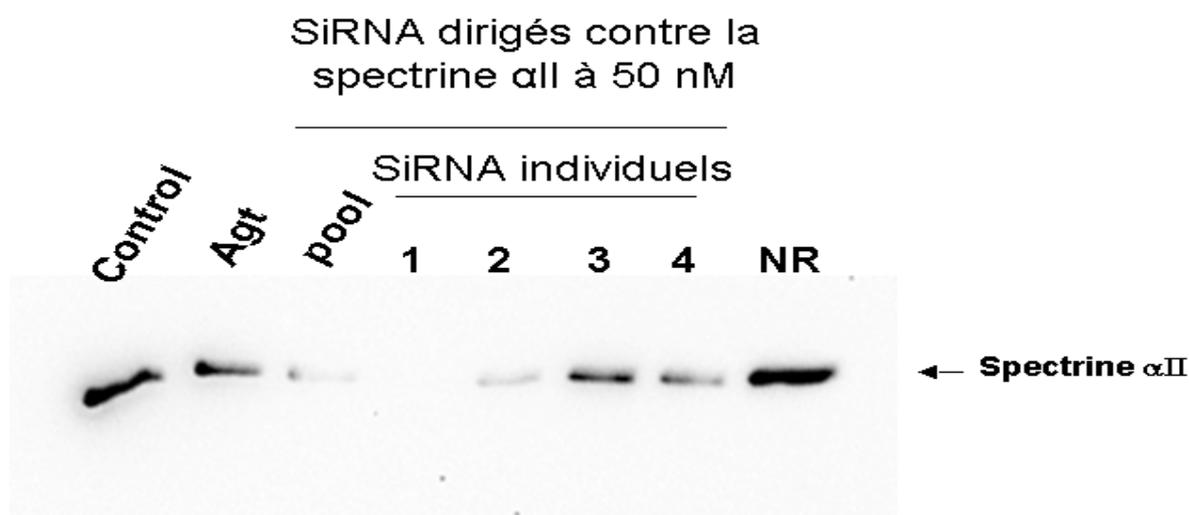


Figure 28 : Analyse par Western blot de l'efficacité des SiARN dirigés contre la spectrine α II : 48 h après la transfection avec l'agent de transfection JetSI-endo, les lysats des cellules WM-266 ont été analysés en Western blot et révélés par un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine SH3 de la spectrine α II. Le premier puits correspond à des cellules WM-266 non transfectées (contrôle), puis les cellules traitées avec l'agent de transfection seul (Agt), les puits suivants correspondent aux lysats des cellules transfectées avec le pool des 4 SiARN, puis les cellules transfectées avec chacun des SiARN 1, 2, 3, 4 et le dernier puits correspond aux lysats des cellules transfectées avec le SiARN non relevant (NR). La concentration des SiARN était de 50 nM. La quantité des protéines totales déposée est de 10 μ g.

L'analyse en western blot des différents lysats cellulaires (figure 28 ci-dessus) révèle une quantité de spectrine équivalente à celle observée dans les cellules contrôles dans les échantillons traités avec l'agent de transfection seul ou avec le

SiARN non relevant (NR). Par contre, les lysats des cellules transfectées par les SiARN ciblant la spectrine α II, que ce soit le pool ou chacun des SiARN 1, 2, 3, 4 (50 nM), contiennent moins de spectrine que les cellules témoins (cellules contrôles). Cependant la diminution de la spectrine est variable selon le SiARN spectrine : Les SiARN 1, 2, 3, 4 n'ont pas la même efficacité sur la déplétion de la spectrine α II. Après quantification du western blot, les SiARN 1 et 2 présentent une efficacité beaucoup plus importante sur l'expression de la spectrine α II. Compte-tenu de ces résultats, les expériences suivantes seront effectuées avec les deux SiARN 1, 2 les plus efficaces, c'est à dire les SiARN 1 et 2.

II Mise en évidence de la déplétion de la spectrine α II par différentes techniques

II.1 Etude cinétique de l'efficacité de SiARN dirigés contre la spectrine α II par western blot

Nous avons suivi le taux de déplétion de la spectrine α II au cours du temps, c'est à dire à 48 h, 72 h et 96 h après les transfections des cellules par le SiARN non relevant NR ou les SiARN 1 et 2 et ceci à différentes doses, 25 nM et 50 nM (figure 29 ci-dessous).

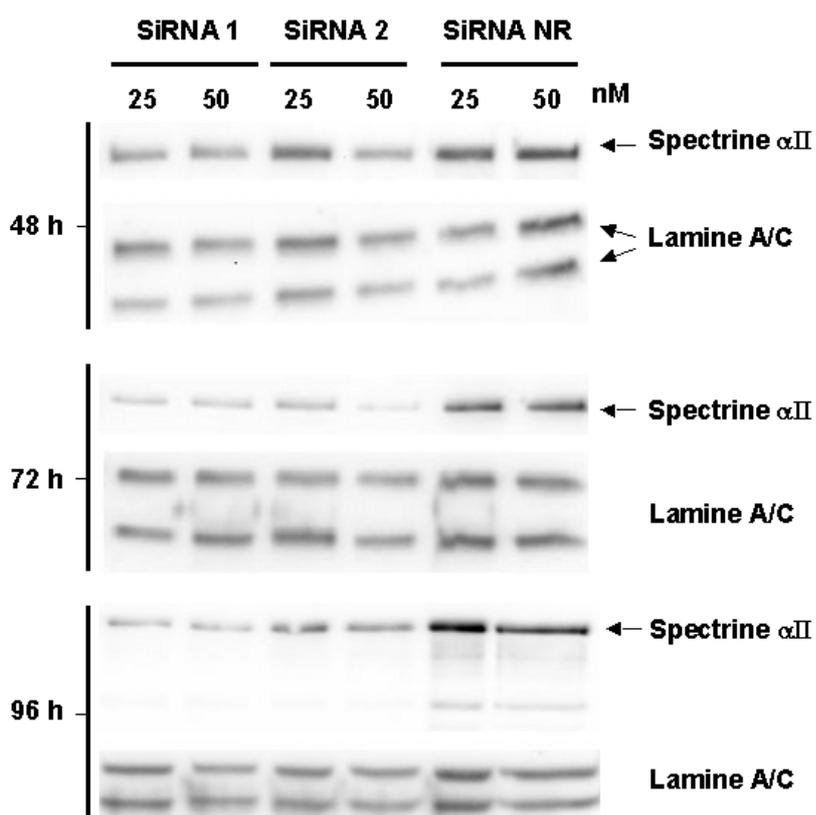


Figure 29 : Efficacité des SiARN ciblant la spectrine α II en fonction du temps et de leur concentration ; Western-blot des lysats réalisés à partir de cellules transfectées avec les SiARN NR, 1, et 2, à 25 et 50 nM, 48, 72 et 96 h après la transfection, révélés par un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine SH3 et un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la lamine A/C qui constitue un contrôle de la charge protéique de chaque puits.

Une déplétion de la spectrine α II est observée pour le SiARN 1 aux deux doses testées (25 nM et 50 nM) dès 48h après la transfection tandis que seule une concentration de 50 nM de SiARN 2 produit un effet sur le taux moyen d'expression de la spectrine α II (diminution de 50% de taux de spectrine α II par rapport aux puits contenant les cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR).

D'après les observations faites à 48 h après la transfection, le SiARN 1 est déjà très efficace, même à 25 nM tandis que le SiARN 2, à cette concentration modifie très modérément le taux de spectrine α II. Ceci montre un effet dose-réponse du SiARN 2 sur le taux de spectrine α II indiquant sa spécificité et on peut aussi dire que l'efficacité du SiARN 1 est plus importante que celle du numéro 2.

Pour les temps de 72 h et 96 h après la transfection, la déplétion en spectrine α II est plus prononcée. A une concentration de SiARN 1 et 2 de 25 nM, la quantité moyenne de spectrine α II résiduelle est de 20 - 30%, respectivement, 72 h après la transfection par rapport à la quantité présente dans les cellules traitées avec les SiARN non relevant NR.

II.2 La diminution du taux de spectrine α II observée par cytométrie en flux

La déplétion apparente de la spectrine α II dans les cellules ayant été transfectées par les SiARN 1 et 2 a été analysée en cytométrie en flux. Cette analyse permet de distinguer les différentes populations de cellules selon leur contenu en spectrine. Les cellules ont été traitées soit avec l'agent de transfection seul, soit avec les SiARN NR, 1, 2 aux concentrations de 25 nM et 50 nM et analysées à 48, 72, 96 h après la transfection tout comme l'analyse faite par western blot.

La spectrine α II étant une protéine intracellulaire, les analyses ont été réalisées sur cellules fixées et perméabilisées avant le marquage de la spectrine α II par un anticorps.

1/ Analyse du taux de la spectrine α II

Pour les cellules traitées avec l'agent seul ou avec les SiARN non relevant NR à 25 ou 50 nM à 48, 72 ou 96 h après la transfection, l'indice de fluorescence

observé est entre 1900 et 2100. Lorsque les cellules sont traitées avec les SiARN 1 et 2, la fluorescence spécifique correspondant à la spectrine α II diminue: les index de fluorescence sont plus faibles, respectivement 1300 et 1400 comme le montre les diagrammes à 48h après la transfection, pour les doses de 25 et 50 nM (figure 30 en page 99). Ces effets sont accentués à 72 et 96 h avec l'apparition d'une population (indiquée par une flèche sur la figure 30 en page 99) qui possède un index de fluorescence très faible, comparé à celui des cellules témoins (AGT ou SiARN NR). Cette population de cellules est observée à la dose de 25 nM, 72 h après transfection, mais elle devient plus importante lorsque l'on augmente la dose de SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine de 25 nM à 50 nM et 96 h après la transfection.

On peut observer que le SiARN 1 est plus efficace sur que le SiARN 2 aux mêmes doses et au même temps après la transfection. Par exemple, 96 h après la transfection avec le SiARN 2 à 25 nM, la population de cellules contenant un faible taux en spectrine α II correspond à 25% de la population totale de cellules tandis que pour le SiARN 1, cette population correspond à 50%.

Lorsque la dose de SiARN 1 et 2 est augmentée (doublée), la déplétion de la spectrine α II sur les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 est accentuée (l'indice de fluorescence est diminué). On retrouve bien l'effet dose réponse que l'on a observé par western blot.

Cette population possédant un taux très faible en spectrine α II peut correspondre :

1. Soit à des cellules ayant un taux bas résiduel de spectrine
2. Soit à des cellules ne possédant plus de spectrine α II

N'ayant pas de témoins négatifs, c'est à dire de cellules déplétées totalement en spectrine α II, il est difficile de conclure pour l'une ou l'autre des hypothèses.

Ces résultats obtenus en cytométrie en flux confirment les résultats des western-blots.

Ces expériences de cytométrie en flux permettent de relier la taille des cellules avec leur contenu en spectrine.

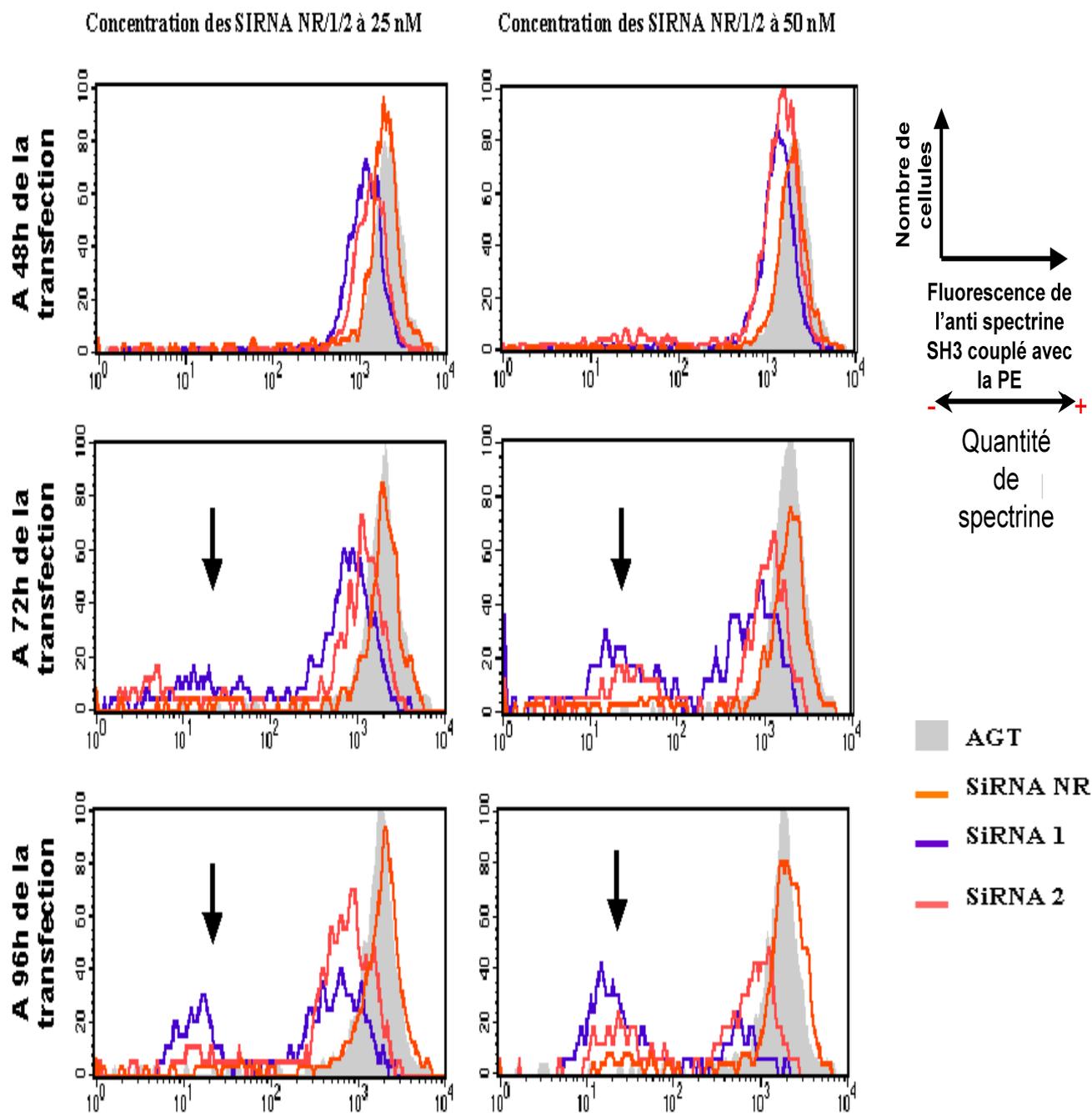


Figure 30 : Détection du taux de spectrine α II en cytométrie en flux après fixation et perméabilisation des cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul (gris) soit avec les SiARN non relevant NR (orange), SiARN 1 (violet) et SiARN 2 (rose) à 25 et 50 nM et à des temps différents après la transfection 48, 72 et 96 h.

2/ Lien entre le contenu cellulaire en spectrine α II et la taille des cellules

Les cellules traitées avec les SiARN non relevant NR se répartissent selon leur taille et leur indice de fluorescence (correspondant à la quantité de spectrine α II) de la même façon que les cellules traitées par l'agent de transfection, et ceci à 72 h et 96 h après la transfection. La majorité de ces cellules (entre 70 et 86%) possèdent une taille supérieure à 100 UA avec un indice de fluorescence compris entre 1900 et 2100 UA (région R1 sur la figure 31 en page 101).

On peut noter que plus le volume des cellules est grand, plus leur contenu en spectrine est élevé, c'est à dire il existerait une corrélation entre le volume des cellules et leur contenu en spectrine. Dans les échantillons traités par les SiARN 1 et 2, cette région R1 ne contient plus que 30 % et 42 % de la population totale de cellules, à 72h après la transfection et 17 % et 27 % après 96 h.

On observe de façon concomitante l'apparition d'une population de cellules de petite taille et possédant un taux de spectrine α II faible (région R2 sur la figure 31 en page 101).

Elle représente respectivement 30% et 21% de l'ensemble des cellules pour les SiARN 1 et 2, 72 h après la transfection. Cette population correspond à 6% et 16% des cellules traitées avec l'agent de transfection et les SiARN non relevant NR à 25 nM. A 96h après de la transfection, la différence est beaucoup plus importante entre les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 et les cellules témoins, on obtient respectivement 55% et 27% des cellules totales dans la région R2 pour les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 tandis que cette population ne change pas entre 72 h et 96 h pour les cellules témoins.

Ces résultats montrent que les cellules déplétées en spectrine α II ont une taille beaucoup plus faible que les cellules témoins.

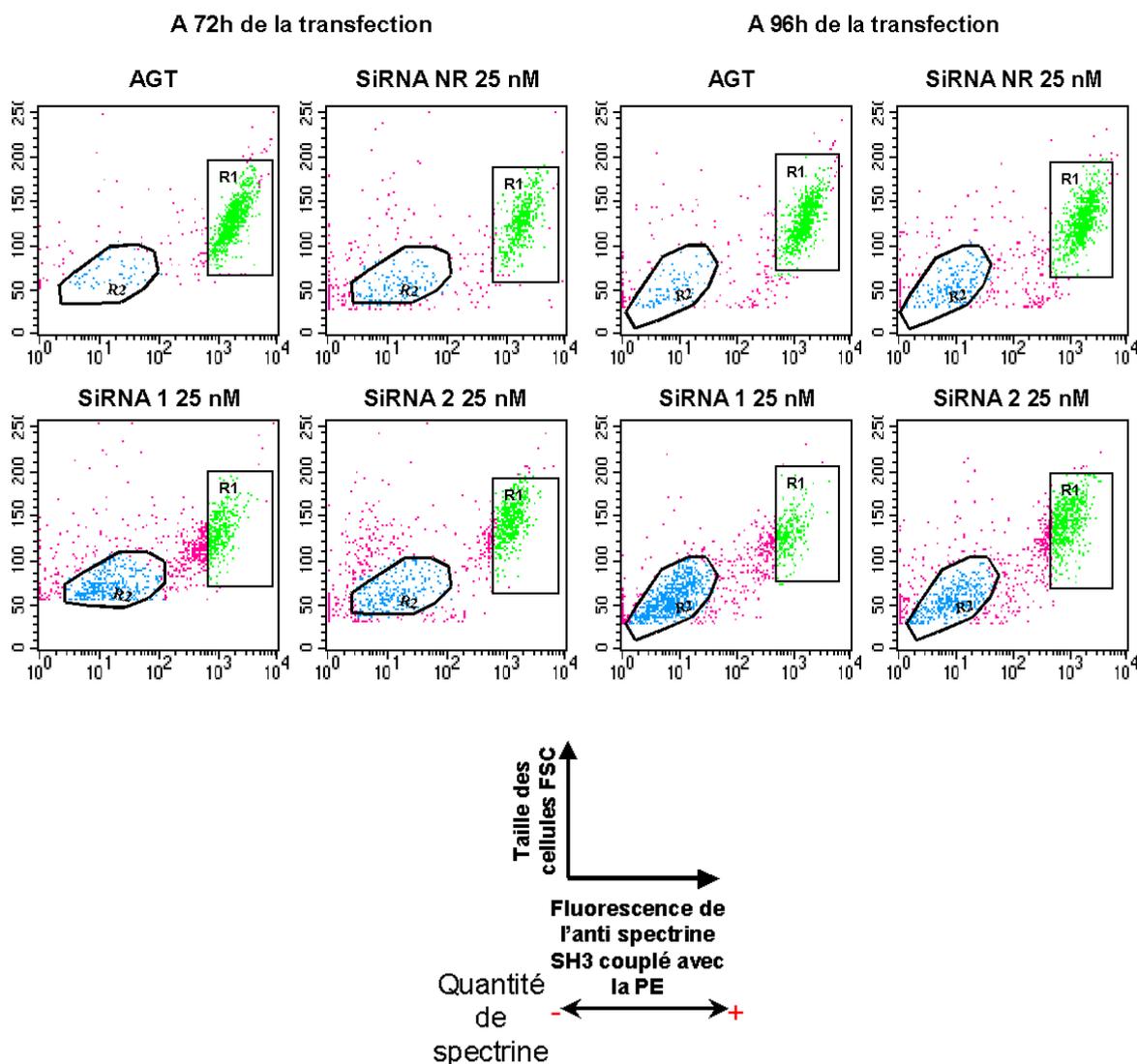


Figure 31 : Analyse de la taille relative des cellules dépletées en spectrine α II par cytométrie en flux. Rapport entre la taille des cellules et le taux de spectrine α II dans les cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul soit avec les SiARN NR, 1 et 2 à 30 nM après 72 et 96 h de la transfection. La région R1 a été définie sur les cellules traitées avec l'agent de transfection et correspond aux cellules qui possèdent un taux de spectrine (indice de fluorescence entre 1900 à 2100 UA, unité arbitraire) et une taille supérieure à 100 UA (unité arbitraire). La région R2 correspond à une population qui possède un taux de spectrine α II très diminué et une taille beaucoup plus petite par rapport à la région R1.

II.3 La diminution du taux de spectrine α II observée par immuno fluorescence

Nous avons observé la spectrine α II et l'actine F (figure 32 en page 103) en microscopie confocale sur des cellules WM-266 transfectées avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II à 72 h de la transfection.

Dans les cellules témoins, (cellules traitées avec l'agent de transfection ou avec les SiARN NR), la localisation de la spectrine α II est identique aux cellules contrôles, c'est à-dire aux cellules non traitées (voir figure 32 en page 103) : la spectrine est répartie entre la membrane et le cytoplasme. Pour l'actine F, elle est présente à la membrane, mais aussi dans la partie basale de la cellule sous forme de fibres de stress. L'observation des cellules traitées par les SiARN 1 et 2 montre une diminution de la fluorescence verte liée au marquage de la spectrine α II, notamment dans le cytoplasme, mais un marquage résiduel très léger reste à la membrane des cellules lié probablement au temps de demi-vie long de la spectrine membranaire par rapport à la spectrine cytoplasmique (Sangerman, J., Gard, A.L. *et al.* 1999). Ces observations mettent bien en évidence la baisse de l'expression de la spectrine α II déjà observée en western blot et en cytométrie en flux.

Le marquage de l'actine F par la phalloïdine montre une désorganisation du cytosquelette d'actine avec une réduction du réseau basal des fibres de stress et une augmentation du marquage cortical.

Il est intéressant de voir dans les échantillons traités avec 15 nM de SiARN dirigés contre la spectrine sur la figure 32 en page 103 quelques cellules avec un taux de spectrine α II important et un réseau d'actine (fibres de stress) bien organisé comparé à d'autres cellules de la prise de vue. Ceci permet de bien visualiser que les cellules déplétées en spectrine α II sont plus petites, rondes, moins bien étalées que les cellules témoins, ces observations viennent corroborer les observations faites en cytométrie en flux à savoir que lorsque le taux de spectrine α II était diminué dans les cellules, la taille de ces cellules était beaucoup plus petite.

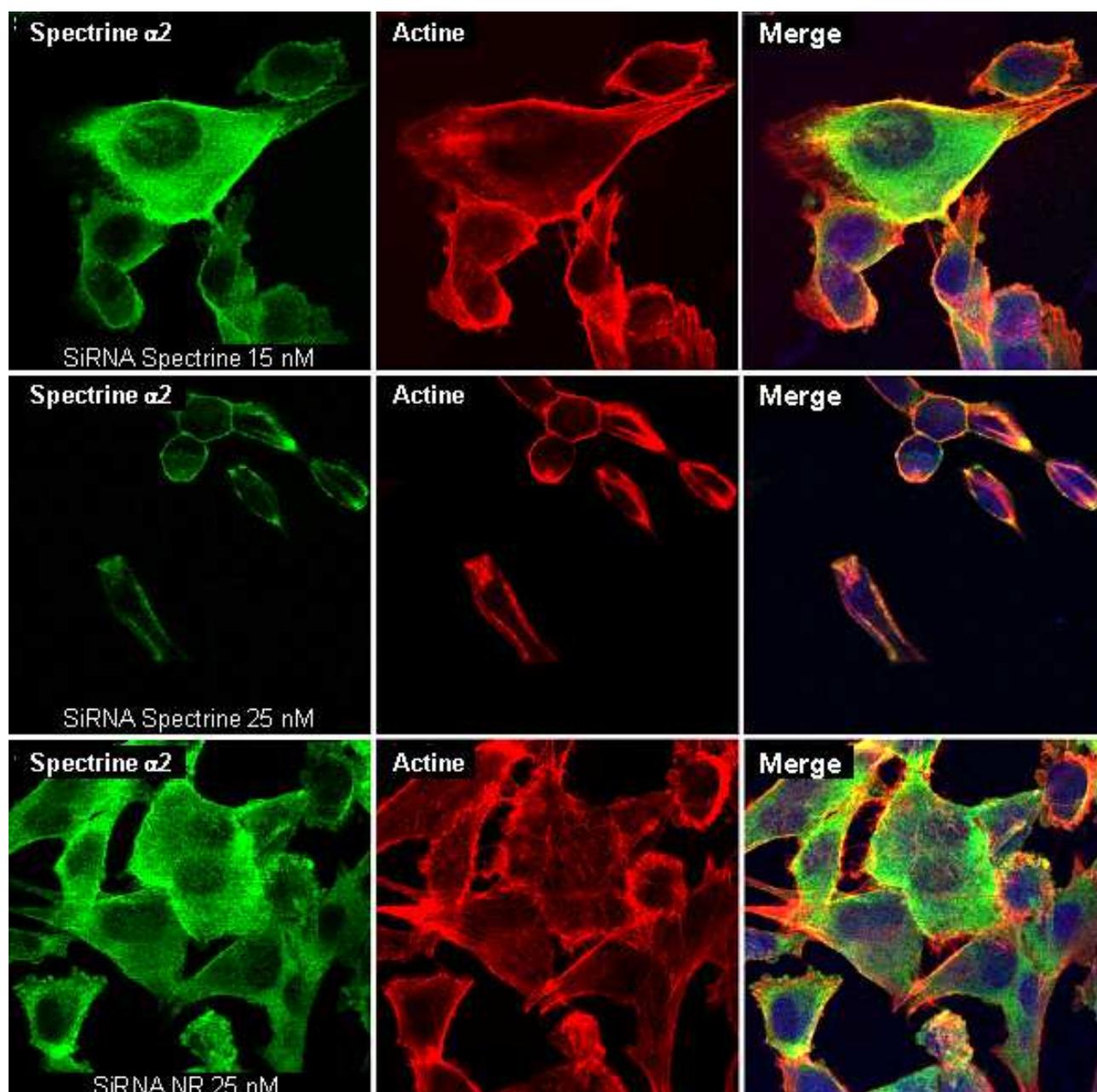


Figure 32 : Détection de la spectrine α II et de l'actine F dans des cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR à 25 nM et les SiARN dirigés contre la spectrine à 15 nM et 25 nM. Les marquages sont faits sur les cellules, 72 h après la transfection.

III Les premiers résultats obtenus lors des mises au point du modèle

Durant la mise au point du modèle, nous avons obtenu les résultats suivants :

- 1) La déplétion de la spectrine α II par les SiARN est obtenue plus facilement avec les SiARN 1 et 2 de chez Dharmacon à une

concentration de 25 nM et 72 h après la transfection. Cette déplétion de la spectrine a été observée par différentes techniques :

Le western blot

La cytométrie en flux

La microscopie confocale

2) La déplétion en spectrine provoque des modifications de la taille des cellules, ceci a été observé par la cytométrie en flux et par microscopie confocale.

3) Le réseau d'actine est désorganisé avec une perte des fibres de stress.

De plus durant la culture des cellules traitées avec les SiARN 1 et 2, nous avons observé une augmentation du nombre de cellules en suspension et un nombre de cellules adhérentes plus faible en comparaison avec les cellules traitées avec l'agent de transfection ou transfectées avec les SiARN non relevant NR. Ces observations ont soulevé deux questions.

La baisse du taux de spectrine α II dans les cellules peut-elle induire 1) une mort cellulaire par apoptose 2) et/ou un défaut dans l'adhérence cellulaire suggéré par les premières observations en microscopie confocale montrant des modifications de la forme des cellules et de leur étalement.

Donc nous avons poursuivi nos investigations sur deux processus cellulaires dans lesquels la spectrine α II pourrait avoir un rôle:

-la prolifération

-l'adhérence

IV L'étude de la prolifération des cellules : l'apoptose et le cycle cellulaire

IV.1 La prolifération cellulaire : Comptage des cellules par cytométrie en flux

Nous avons regardé dans un premier temps, la prolifération des cellules.

Pour cela nous avons étudié les cellules traitées avec l'agent de transfection seul, avec le SiARN non relevant NR (30 nM), et avec les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II. Nous avons comptabilisé par cytométrie en flux, le nombre total de cellules vivantes (cellules adhérentes et en solution) en excluant les cellules mortes identifiées par un marquage à l'iodure de propidium. Ceci a été fait pour chaque transfection à 24, 48, 72 et 96 h après la transfection (figure 33 ci-dessous)

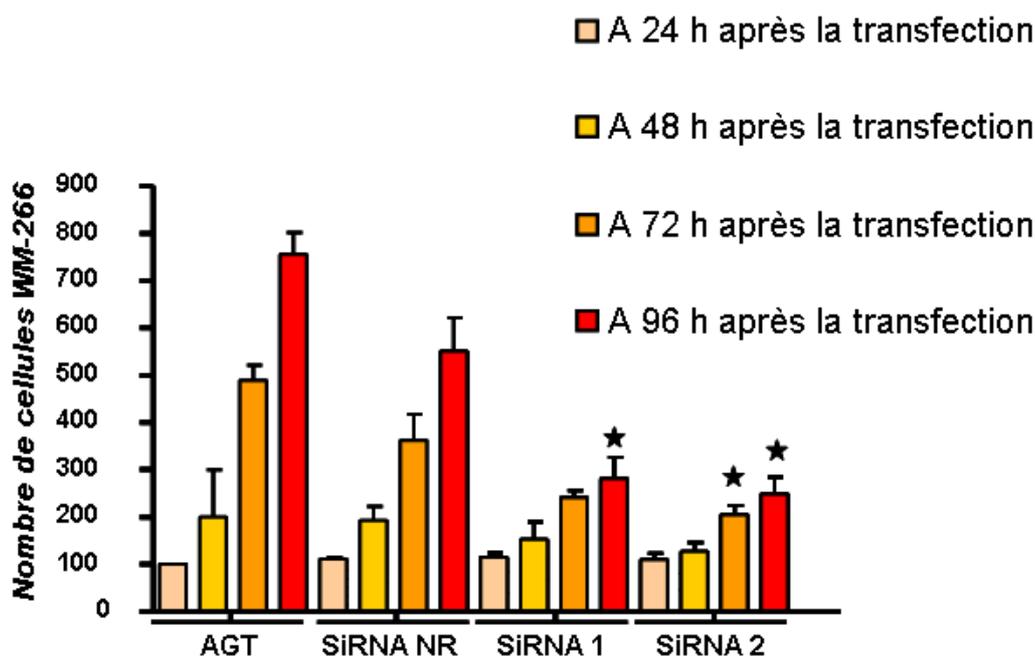


Figure 33: Etude de la prolifération des cellules traitées par l'agent de transfection AGT, par le SiARN non relevant NR (30 nM) et par les SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine (30 nM) à 24 h, 48 h, 72 h, 96 h après la transfection. Ces résultats correspondent à deux transfactions différentes dans lequel on effectue trois points pour chaque condition. L'étoile correspond a une différence significative du nombre de cellules traitées avec le SiARN 1 ou 2 en comparaison avec le nombre de cellules traitées avec les SiARN non relevant (NR) à 72 h et 96 h.

Il apparaît très clairement que le nombre total de cellules vivantes (adhérentes et en solution) dans les échantillons traités avec les SiARN dirigés contre la spectrine est réduit en comparaison aux échantillons traités avec l'agent de transfection seul ou transfectés avec le SiARN non relevant NR en cours du temps comme le montre la figure 33 ci-dessus.

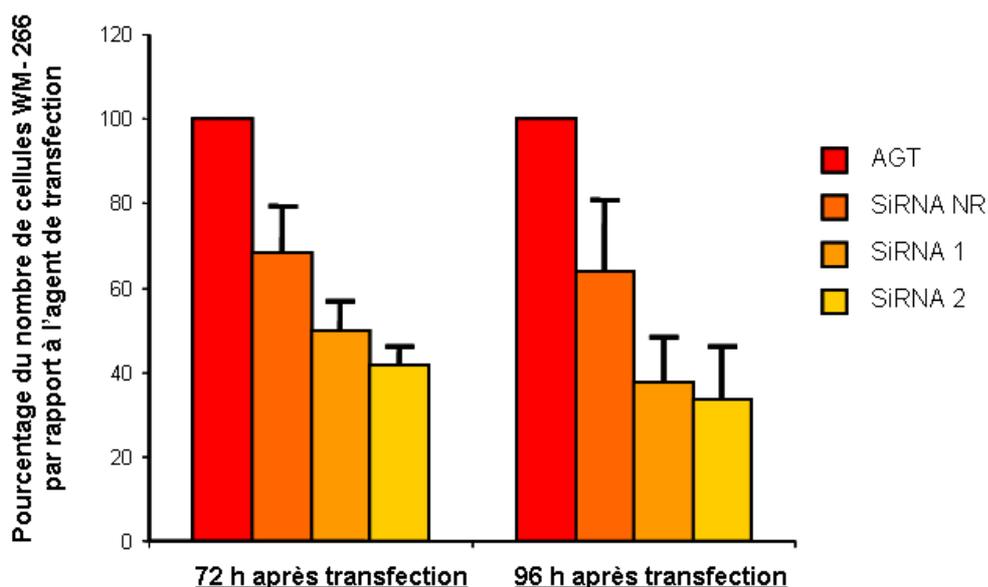


Figure 34: Pourcentage du nombre de cellules totales vivantes comptées sur les échantillons traités avec l'agent de transfection seul, avec le SiARN non relevant NR (30 nM) ou avec les SiARN 1 et 2 (30 nM) à 72 h et 96 h.

La comparaison entre les échantillons traités avec l'agent de transfection (figure 34 ci-dessus), montre une diminution du nombre de cellules de 50% lorsque les cellules sont traitées avec les SiARN 1 et 2 (30 nM) après 72 h et de 60% pour le temps de 96 h quand le nombre de cellules traitées avec le SiARN non relevant NR (30 nM) représente que 30% par rapport au nombre de cellules traitées avec l'agent de transfection seul pour les deux temps.

Ces observations sont encore plus marquées lorsque la concentration de SiARN est augmentée à 50 nM, ceci à 72 h et 96 h après la transfection. Les cellules traitées avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II (les SiARN 1 et 2) représentent 40% à 72 h et 25% à 96 h, du nombre de cellules traitées avec l'agent de transfection seul) entre les cellules témoins (cellules traitées avec le SiARN non relevant NR)

La baisse du nombre de cellules vivantes observée lorsque le taux de spectrine α II est diminué peut être la conséquence de deux phénomènes :

1. une mort cellulaire
2. un ralentissement de la prolifération

Nous avons étudié dans un premier temps la mort des cellules par apoptose (première hypothèse) et dans un second temps le cycle cellulaire pouvant expliquer la deuxième hypothèse.

IV.2 L'étude de l'apoptose par deux analyses différentes: l'effet TUNEL (fragmentation de l'ADN) ou la mesure du potentiel de membrane mitochondriale

IV.2.1 L'effet TUNEL : mesure de la fragmentation de l'ADN

Les premières études de l'apoptose ont été faites par la mesure de la fragmentation de l'ADN en marquant les brins 3'OH de l'ADN par le BrdU (technique TUNEL). Nous avons effectué ce marquage sur des cellules transfectées par le SiARN non relevant NR (30 nM) et les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine, à 72 h et 96 h après la transfection, car comme on l'a vu précédemment, c'est à ces temps que la différence entre le nombre de cellules totales témoins (cellules traitées avec les SiARN non relevant) et de cellules totales traitées avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II est la plus marquée.

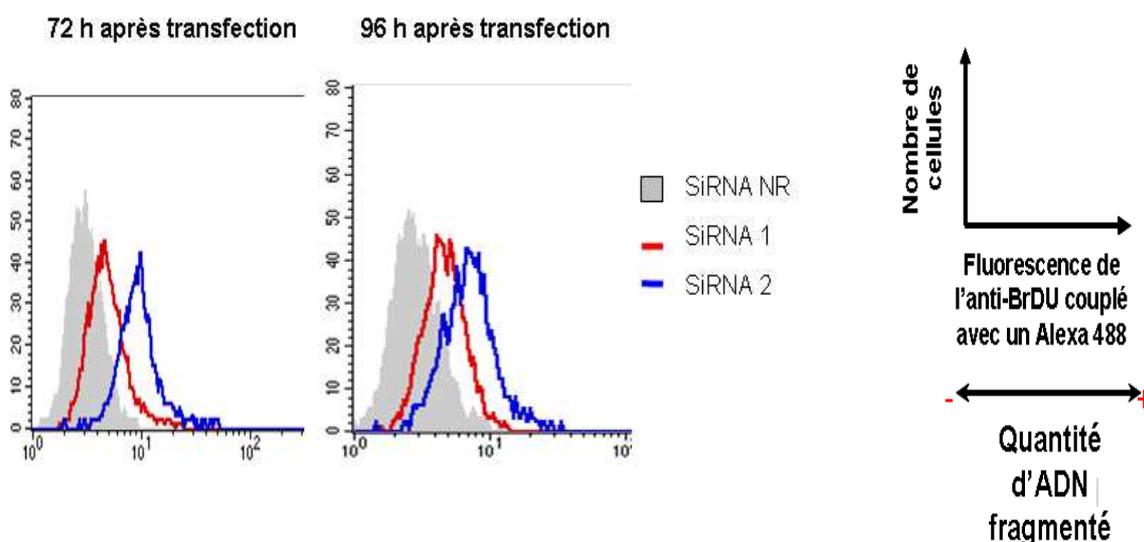


Figure 35 : Etude de la fragmentation de l'ADN par marquage des brins 3'OH sur des cellules traitées soit par le SiARN non relevant NR (30 nM) soit par les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II.

Les résultats obtenue en cytométrie en flux (la figure 35 en page 107) montrent un léger décalage entre le pic de fluorescence des cellules transfectées par les SiARN non relevant NR et le pic de fluorescence des cellules transfectées par les SiARN 1 et 2 après 72 h et 96 h de transfection.

Cependant la différence de fluorescence entre les cellules témoins (cellules traitées avec les SiARN non relevant NR) et les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 n'est pas significative (à comparer avec le décalage de fluorescence observé dans la figure 36 ci-dessous entre les cellules témoins négatives et des cellules témoins positives). Il n'y aurait pas de différence de fragmentation de l'ADN, donc pas d'apoptose visible par cette méthode d'analyse. D'après ces données, le nombre moins élevé de cellules observé à 72 h et 96 h après transfection dans les expériences de prolifération ne peut pas être du à une mort des cellules par apoptose.

Pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré l'apoptose par une autre technique.

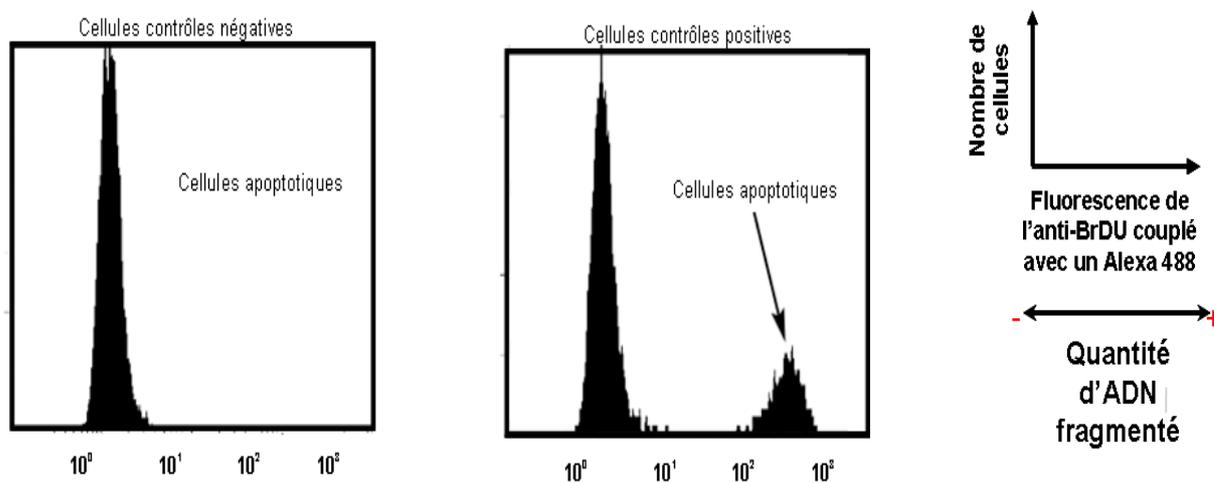


Figure 36: Effet TUNEL sur des cellules témoins. L'histogramme de gauche montre des cellules contrôles négatives et celui de droite des cellules en apoptose. (Image tirée du protocole du kit APO-BRDUTM).

IV.2.2 La mesure du potentiel de membrane mitochondriale $\Delta\Psi$ grâce à un marqueur le DioC6

L'apoptose peut être détectée par les modifications du potentiel de membrane mitochondriale appelée $\Delta\Psi$. Contrairement à la mesure de la fragmentation de l'ADN qui intervient très tardivement dans le processus de l'apoptose, les modifications de la membrane mitochondriale sont des événements précoces. Nous avons utilisé le DioC6 qui est un marqueur membranaire de la mitochondrie, il indique le niveau du potentiel de membrane mitochondriale des cellules.

Le DioC6, reste emprisonné à l'intérieur de la membrane mitochondriale dans la cellule vivante. Lorsque la cellule rentre en apoptose la membrane devient perméable, libérant le DioC6. La fluorescence du DioC6 des cellules qui rentrent en apoptose est alors moins importante.

Dans ces expériences, les cellules transfectées par le SiARN non relevant (NR) (30 nM) et les SiARN 1 et 2 (30 nM) sont traitées avec du DioC6 et l'iodure de propidium (qui marquera les cellules nécrosées) ; la fluorescence des cellules est évaluée par cytométrie en flux, à 72 h et à 96 h après la transfection. Les cellules apoptotiques sont identifiées par l'absence de marquage par le DioC6 et l'iodure de propidium.

A 72 h après la transfection des cellules, nous n'observons pas d'importantes différences entre les cellules transfectées avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II et les cellules traitées avec le SiARN non relevant NR (figure 37 en page 110). Les cellules vivantes (région R3 cellules vertes) représentent 80-85%, les cellules mortes (région R1 cellules rouges) 10-15% et les cellules apoptotiques (région R2 cellules oranges) 2% de nombre total de cellules.

A 96 h après la transfection, il apparaît une apoptose modérée. Les cellules traitées avec les SiARN non relevant NR présente un taux d'apoptose de 3% tandis que pour les échantillons correspondant aux cellules traitées avec les SiARN (1 et 2) dirigés contre la spectrine, le taux d'apoptose mesuré grâce au DIOC6 représente 6% du nombre total des cellules (figure 37 en page 110).

Malgré à une apoptose tardive (96 h après la transfection des SiARN 1 et 2), celle-ci ne peut pas expliquer la diminution du nombre de cellules dans les échantillons traités avec les SiARN dirigés contre la spectrine all. Nous avons poursuivi nos études sur la prolifération par l'analyse du cycle cellulaire.

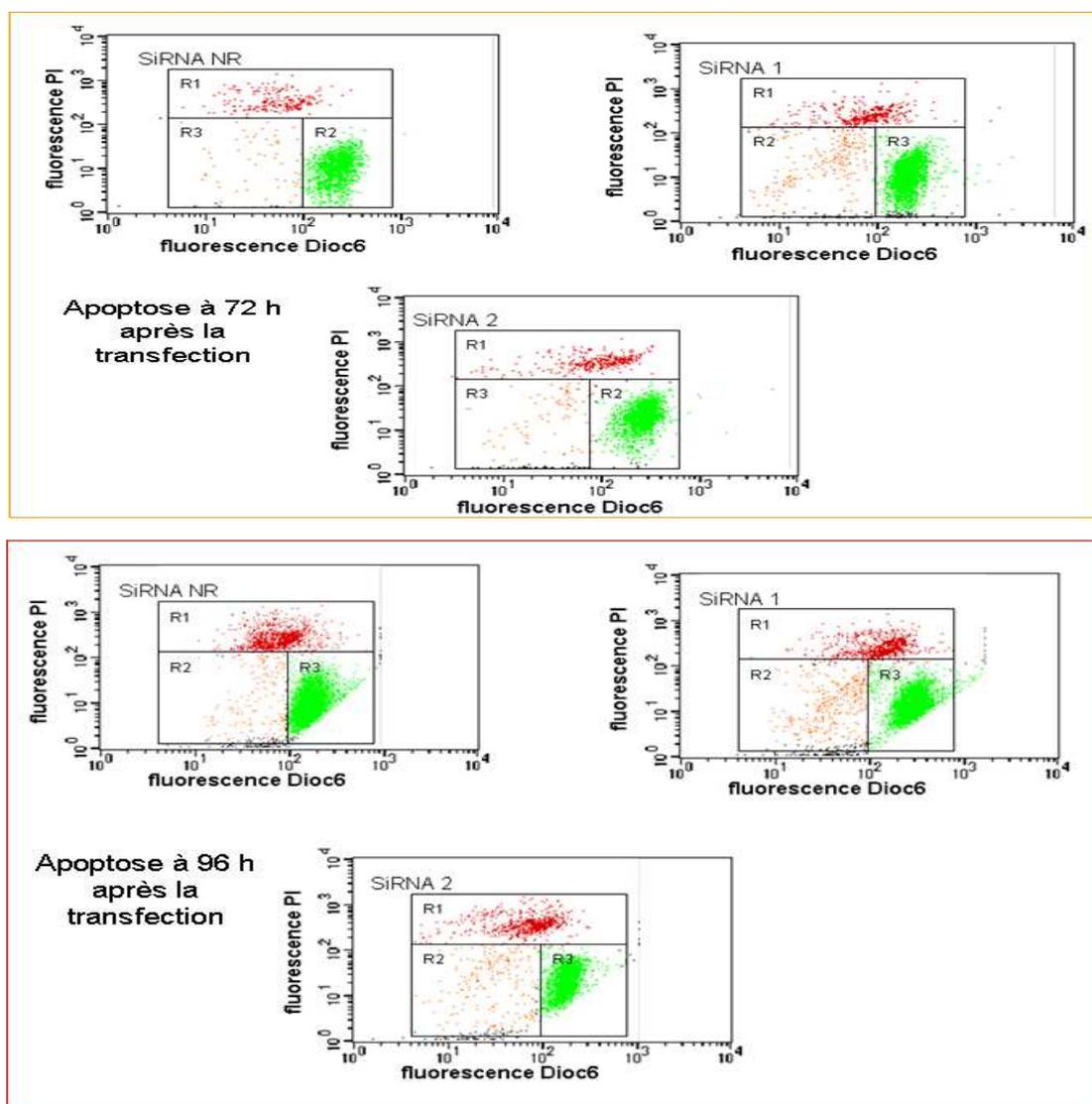


Figure 37 : Etude du potentiel de membrane mitochondriale par cytométrie en flux. Les cellules traitées avec le SiARN non relevant (30 nM) et les SiARN 1 et 2 (30 nM) sont marquées avec le DioC6 et l'iodure de propidium. Cette analyse montre trois types de cellules : pour la région R1, les cellules (en rouge) représentent les cellules nécrosées, positives à l'iodure de propidium, les régions R2 et R3 correspondent aux cellules négatives à l'iodure de propidium, la région R2 correspondant aux cellules apoptotiques (en orange) faiblement marquées au DioC6, et la région R3, représentant les cellules vivantes (en vert) fortement marquées au DioC6.

IV.3 L'étude du cycle cellulaire par deux techniques différentes

IV.3.1 L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Le cycle cellulaire a été étudié en analysant le contenu cellulaire en ADN par cytométrie en flux grâce à un marquage par l'iodure de propidium sur des cellules préalablement fixées et perméabilisées. L'iodure de propidium s'intercale aux bases d'ADN, et la quantité d'ADN de chaque cellule peut être évaluée par le niveau de fluorescence de l'iodure de propidium (plus il y a de l'ADN, plus le niveau de fluorescence de la cellule va être important).

Ces expériences ont été faites sur des cellules traitées avec le SiARN non relevant (30 nM), et les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II, à 72 h et 96 h après la transfection.

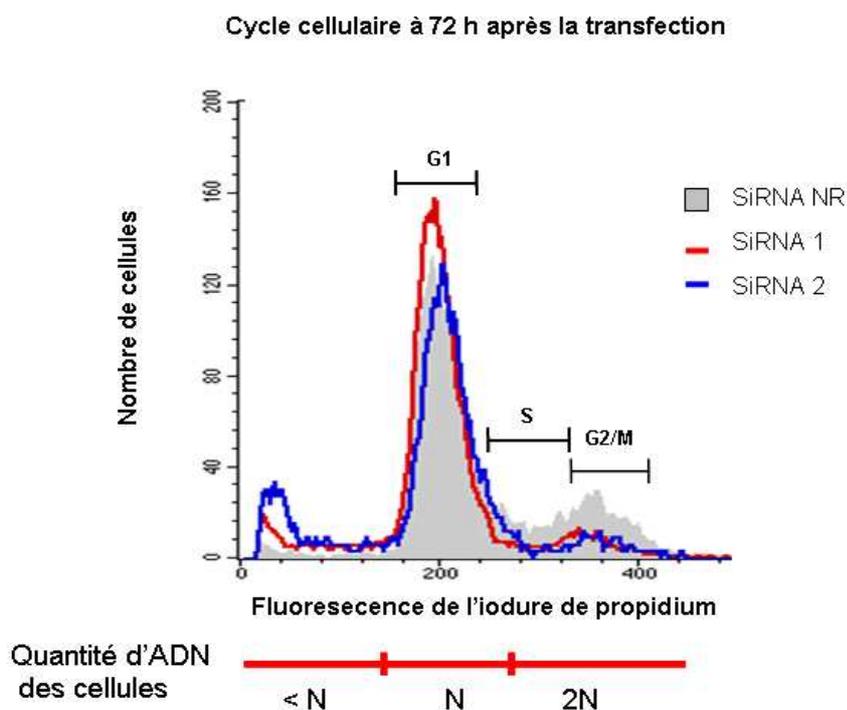
A 72 h après la transfection, le nombre de cellules en phase G2/M et S a clairement baissé dans les échantillons traités avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II (courbes rouge et bleue) par rapport aux cellules traitées avec les SiARN non relevant (fond gris) (figure 38 en page 113). Le pourcentage de cellules dans la phase G2/M est respectivement de 8.2 ± 1.2 % et de 7.36 ± 2.1 % pour les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 tandis que ce pourcentage est de 14.2 ± 1.2 % pour les cellules traitées avec le SiARN non relevant (NR). Ces moyennes ont été obtenues sur 6 expériences réalisées dans les mêmes conditions.

A 96 h après la transfection (figure 38 en page 113), le pourcentage des cellules en phase G2/M est encore plus bas sur les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 (courbes rouge et bleue) par rapport au temps 72 h. On observe aussi une baisse des cellules en G1 avec une augmentation des événements dans la région qui correspond à des éléments possédant une quantité d'ADN inférieure à N. Ces éléments peuvent être des cellules apoptotiques ou des débris cellulaires. Cette analyse en cytométrie en flux n'exclut pas les débris cellulaires par crainte d'éliminer des cellules de petite taille résultant de la déplétion de la spectrine α II. Il s'avère que le nombre d'évènements dans cette région augmente entre 72 h et 96 h. Comme le nombre de débris cellulaires restent constant, l'augmentation des événements dans cette région pourrait être due à des cellules apoptotiques, ce qui correspondrait aux

observations faites lors de l'étude de l'apoptose, à savoir la détection d'une légère apoptose à 96 h de la transfection.

Ces résultats montrent un arrêt ou au moins un ralentissement du cycle cellulaire en phase G1. Le défaut du cycle cellulaire associé à la baisse du taux de spectrine α II peut expliquer la diminution du nombre des cellules transfectées par les SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine α II.

Pour confirmer ces données, nous avons mesuré le degré de phosphorylation de la protéine rétinoblastome (Rb).



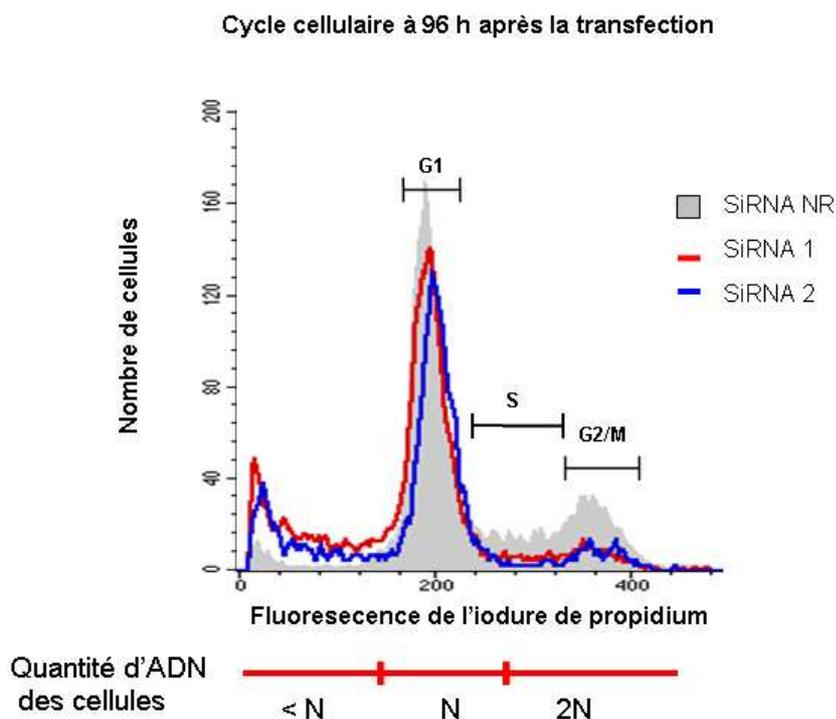


Figure 38 : Etude du cycle cellulaire par marquage de l'ADN à l'iodure de propidium de cellules WM-266 fixées et perméabilisées. Nous avons la courbe en grisé plein les cellules transfectées avec le SiARN non relevant NR (30 nM), les courbes rouge et bleue respectivement sont les cellules traitées par les SiARN 1 et 2 (30 nM). Cette étude a été réalisée sur des cellules à 72 h et 96 h après la transfection.

IV.3.2 L'analyse du cycle cellulaire par western blot et détection de la phosphorylation de la protéine rétinoblastome et ainsi que des protéines comme p21 et p15 16 18

L'état de phosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb régule la progression du cycle cellulaire et joue un rôle dans la transcription.

Au début de la phase G1, la cellule contient le complexe Cycline D / Cdk 4 qui, une fois activé initie la phosphorylation de la protéine Rb (pRB) (figure 39 en page 114).

Phosphorylée, la protéine Rb libère et active le facteur de transcription E2F (figure 40 en page 114) permettant la synthèse de gènes de la phase S. Ce mécanisme permet à la cellule de préparer son entrée en phase S.

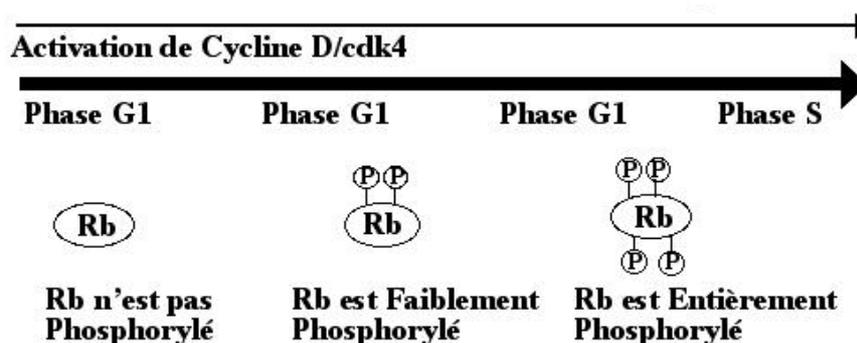


Figure 39 : Régulation de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome, Rb par le complexe cyclineD/cdk4 dans la phase G1. Image obtenue sur internet à l'adresse www.med.univ-angers.fr.

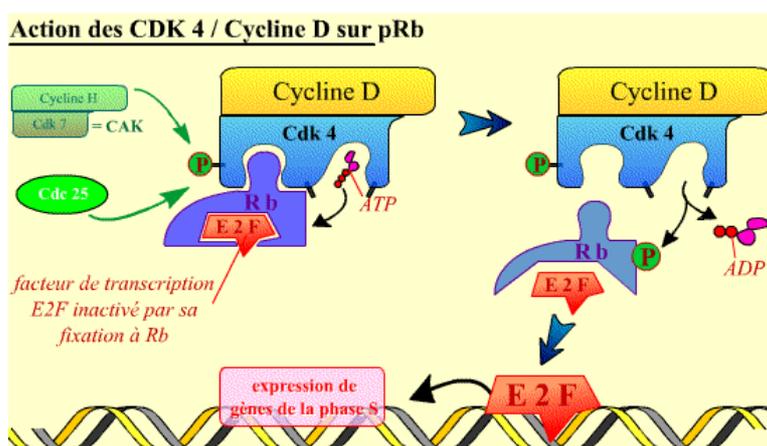


Figure 40 : Rôle de la protéine Rb sur la transcription des gènes pour l'entrée en phase S image obtenue sur internet à l'adresse suivante [www.snv.jussieu.fr /vie/dossiersBM /cyclecellVIE /images /CDK4-D-action-img.gif](http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiersBM/cyclecellVIE/images/CDK4-D-action-img.gif).

Comme le montre le western blot de la figure 41 en page 115, les différentes formes de la protéine Rb peuvent être séparées sous plusieurs bandes suivant le degré de phosphorylation dans des conditions particulières d'électrophorèse.

Comme le montrent les western-blots de la figure 42 en page 115, les cellules traitées avec l'agent de transfection seul ou transfectées avec les SiARN non relevant présentent la protéine Rb essentiellement dans un état d'hyper phosphorylation (forme ppRb). En ce qui concerne les cellules traitées avec les

SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine α II, la forme hyperphosphorylée est très fortement diminuée avec une augmentation concomitante de la forme hypophosphorylée (pRb). Ceci est observé à partir de 48 h et jusqu'à 96 h après la transfection.

Ces résultats révèlent un arrêt de la prolifération en début de cycle et confirment ceux trouvés lors de l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux.

On peut dire que la déplétion en spectrine α II dans les cellules WM-266 provoque un arrêt ou au moins un ralentissement du cycle cellulaire.

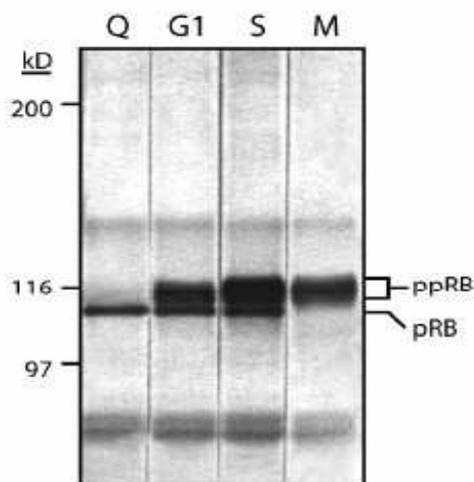


Figure 41: Etat de phosphorylation la protéine Rb dans différentes phases du cycle cellulaire reconnu par l'anticorps que l'on a utilisé dans le western blot de la figure 40. Q: quiescence ; G1, S, M : respectivement les phases G1, S et M du cycle cellulaire ; Image obtenue par internet à l'adresse suivante www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/14001A_554136.pdf.

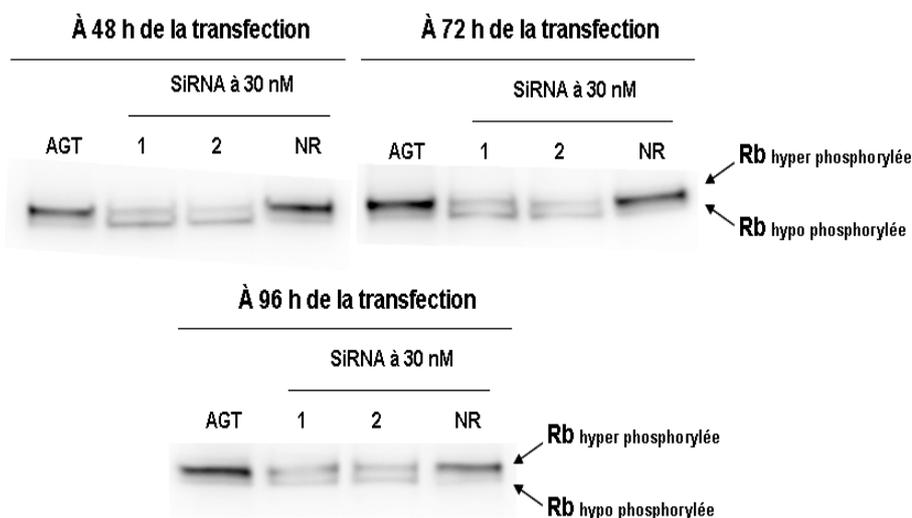


Figure 42: Détection du niveau de phosphorylation de la protéine Rb en western blot, sur des cellules traitées avec l'agent de transfection seul AGT, traitées avec le SiARN non relevant NR (30 nM) et les SiARN 1 et 2 (30 nM) à 48 h, 72 h et 96 h de la transfection. La protéine Rb est détectée grâce à un anticorps qui reconnaît toutes les formes phosphorylées de cette protéine comme le montre la figure 42.

-Etude des inhibiteurs du cycle cellulaire

Nous avons étudié plus en détail l'arrêt du cycle cellulaire en analysant par western blot l'expression de certaines protéines importantes dans la phase G1 ou G1/S, et en particulier, les inhibiteurs du cycle cellulaire tels que les protéines p21, p27, p16, p15.

Nous n'avons pas eu de signal pour la protéine p16 malgré l'utilisation de différents anticorps dirigés contre cette protéine. Cette protéine dans ce type de cellules est fréquemment mutée, ce qui peut expliquer l'absence de détection (ce qui ne signifie pas que cette protéine n'est pas présente).

La détection de la protéine p27 était très faible, il se peut que son expression soit très abaissée dans les cellules de mélanomes.

Pour la protéine p15, nous n'avons pas relevé de modifications d'expression entre les cellules témoins (traitées seulement avec l'agent de transfection ou transfectées avec les SiARN non relevant à 30 nM) et les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II.

En ce qui concerne la protéine p21, nous observons une augmentation de son taux d'expression en western blot (figure 43 en page 117). L'analyse quantitative révèle que les cellules traitées avec le SiARN non relevant, possédait une expression de la p21 augmentée de 1,2 fois par rapport aux cellules traitées avec l'agent de transfection seul. Cette différence n'apparaît pas significative. Par contre le taux de p21 dans les cellules traitées par les SiARN 1 et 2 (30 nM) est significativement plus élevé, respectivement 1,8 et 2,4, par rapport à celui observé dans les cellules traitées par le SiARN non relevant (figure 44 en page 117). L'augmentation de l'expression de p21 est encore observée 96 h après la transfection.

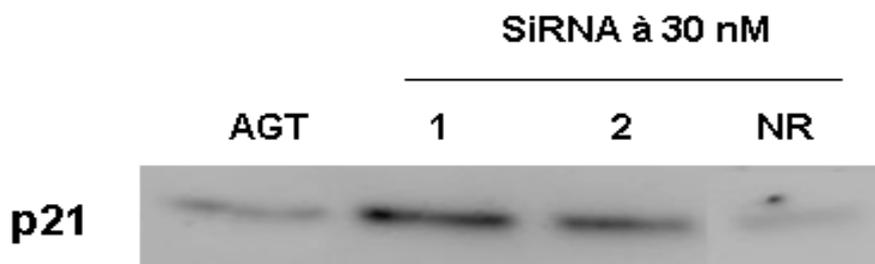


Figure 43 : Détection par western blot de la protéine p21 dans des lysats de cellules traitées avec l'agent de transfection AGT, SiARN non relevant NR (30 nM), ou les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II. Ces lysats ont été obtenus 72 h après la transfection.

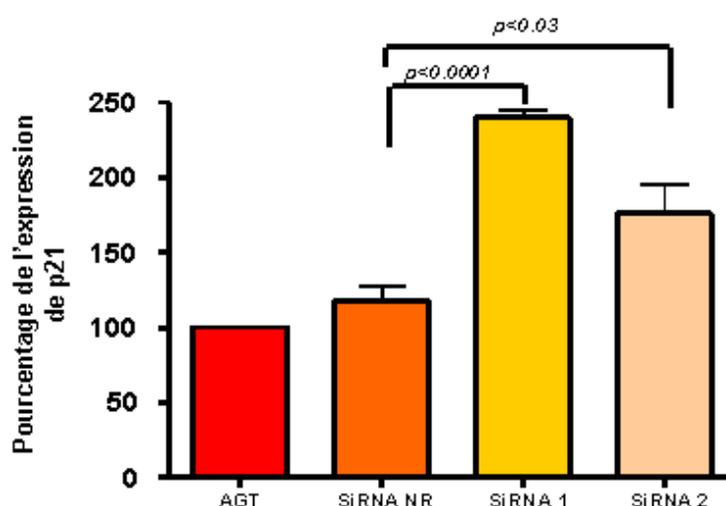


Figure 44 : Quantification du western blot les lysats de cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul AGT (rouge) soit avec les SiARN non relevant NR (orange), 1 (jaune) et 2 (beige) à 30 nM, 72 h après la transfection.

Afin de définir l'implication de la protéine p21 dans le contrôle du cycle cellulaire WM-266, nous avons étudié la prolifération des cellules déplétée en p21 par la technique de SiARN. Comme le montre le western blot (figure 45 en page 118), p21 n'est plus détectable dans les cellules traitées par les SiARN à une concentration de 30 nM. L'analyse de la prolifération à 48 h, 72 h, 96 h de la transfection dans les WM-266 ayant reçu le SiARN non relevant (NR) à 30 nM et le pool de SiARN p21 à 30 nM (figure 46 en page 118) montre que la protéine p21 joue un rôle dans le cycle cellulaire : les cellules WM-266 déplétées en protéine p21 prolifèrent plus que les cellules contrôles (cellules traitées par le SiARN non relevant). Le nombre de

cellules déplétées en p21 est de 5443 ± 306 (n=6), 10470 ± 698 (n=9) et 20020 ± 607 (n=6) à 48 h, 72 h, 96 h, respectivement tandis que le nombre de cellules témoins (traitées avec le SiARN non relevant NR), est de 3782 ± 405 (n=5), 6777 ± 229 (n=9), 10100 ± 383 (n=6) à 48 h, 72 h, 96 h. Les différences sont significatives entre les deux types de cellules traitées pour chacun des temps, pour 48 h après la transfection nous avons $p=0.0087$, pour 72 h et 96 h nous sommes à $p<0.0001$.

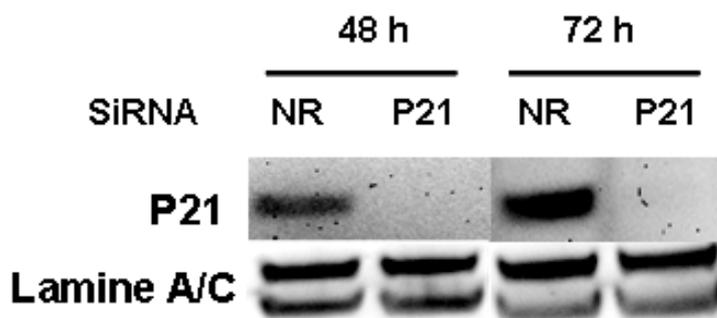


Figure 45 : Détection par western blot de la protéine p21 dans des lysats de cellules traitées avec SiARN non relevant NR (30 nM), et le pool de SiARN (30 nM) dirigé contre la protéine p21. Ces lysats ont été obtenus à 48 h et 72 h après la transfection. La lamine A/C constitue un contrôle de la charge protéique pour chaque puits.

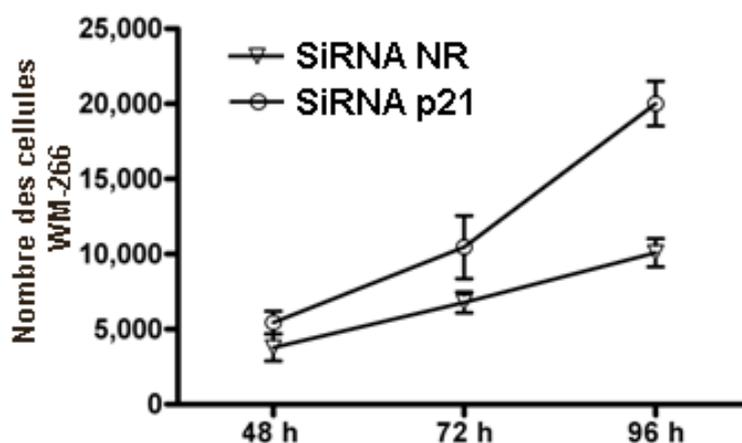


Figure 46 : Etude de la prolifération des cellules WM-266 traitées par le SiARN non relevant NR (30 nM) et par le pool de SiARN dirigé contre la protéine p21 (30 nM) à 48 h, 72 h, 96 h après la transfection. Ces résultats correspondent à deux transfactions différentes dans lesquelles trois points ont été effectués pour chaque condition.

IV.4 Les expériences de la présence de la spectrine α II dans le noyau des cellules WM-266

Il a été montré que la spectrine α II interagit avec différentes protéines nucléaires comme des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, des protéines remodelant la chromatine, les protéines Fanconi Anemia, des protéines qui jouent un rôle dans la transcription et la maturation des ARN. Comme nos résultats montrent une perturbation du cycle cellulaire dans les cellules déplétées en spectrine α II, il se peut que la spectrine α II joue un rôle direct sur le cycle cellulaire.

Nous avons testé l'expression de la spectrine α II dans le noyau par western-blot sur la fraction nucléaire et la fraction cytoplasmique.

Le fractionnement cellulaire a été réalisé sur des cellules traitées avec l'agent de transfection AGT, ou les SiARN non relevant NR (30 nM) ou les SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine α II (30 nM), 72 h après la transfection.

Nous avons analysé la présence de la spectrine α II par western blot, dans les différentes fractions recueillies, mais aussi détecté d'autres protéines comme l'intégrine β 3 (protéines membranaire), ERK1/2 (protéines cytoplasmiques), lamine A/C (protéines nucléaires) afin de vérifier la qualité du fractionnement.

Comme on le voit sur le western blot de la figure 47 en page 120, l'intégrine β 3 ainsi que la protéine ERK1/2 ne sont présentes que dans les fractions cytoplasmiques mais aucunes ne sont détectées dans les fractions nucléaires. Inversement, les lamines A/C ne sont détectées que dans les fractions nucléaires. Une bande de même taille que la lamine C (bande de plus petite taille) est observée tout de même dans la fraction cytoplasmique. Une contamination de la fraction cytoplasmique par la fraction nucléaire est peu probable puisque les deux lamines A et C détectées dans la fraction nucléaire seraient détectées dans cette fraction cytoplasmique (L'anticorps que l'on utilise détecte à la fois la lamine A et la lamine C). Cette bande correspond plutôt à une interaction non spécifique de l'anticorps utilisé ou à la présence d'une forme de lamine dans le cytoplasme.

La spectrine α II est détectée aussi bien dans les fractions cytoplasmiques que dans les fractions nucléaires, mais les effets des SiARN dirigés contre la spectrine

α II après standardisation par ERK1/2 pour les fractions cytoplasmiques et par les lamines A/C pour les fractions nucléaires sont différents. Dans les fractions cytoplasmiques, il ne reste que 30% de spectrine α II dans les échantillons traités avec les SiARN 1 et 2 par rapport aux cellules traitées avec l'agent de transfection ou avec le SiARN non relevant tandis que dans les fractions nucléaires, il reste 50% de spectrine (figure 48 en page 121).

Nous confirmons la présence de la spectrine α II dans le noyau des cellules WM-266. D'après ces premières données, le taux de spectrine diminue dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau après le traitement avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II.

La spectrine α II pourrait jouer un rôle direct sur la prolifération cellulaire.

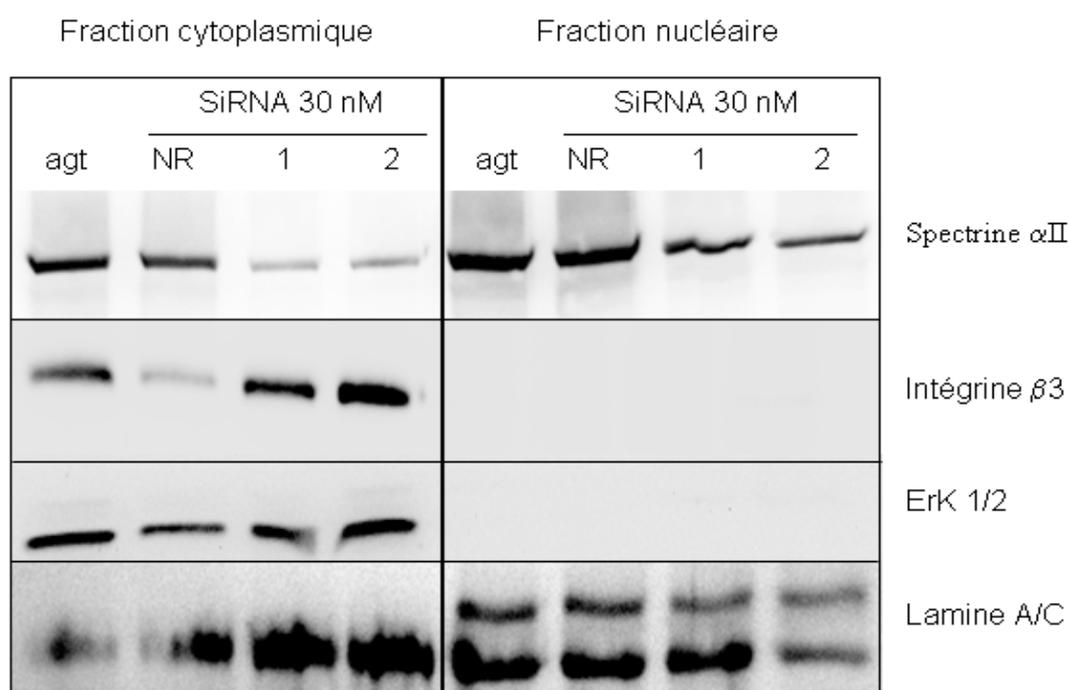


Figure 47 : Détection de la spectrine α II en western blot dans des extraits cytoplasmiques et nucléaires de cellules traitées avec l'agent de transfection AGT, ou les SiARN NR, 1 et 2 à 30 nM. L'intégrine β 3, protéine membranaire, ErK1/2 protéine cytoplasmique, et la lamine A/C protéine nucléaire sont utilisées pour contrôler d'éventuelles contaminations entre les 2 fractions.

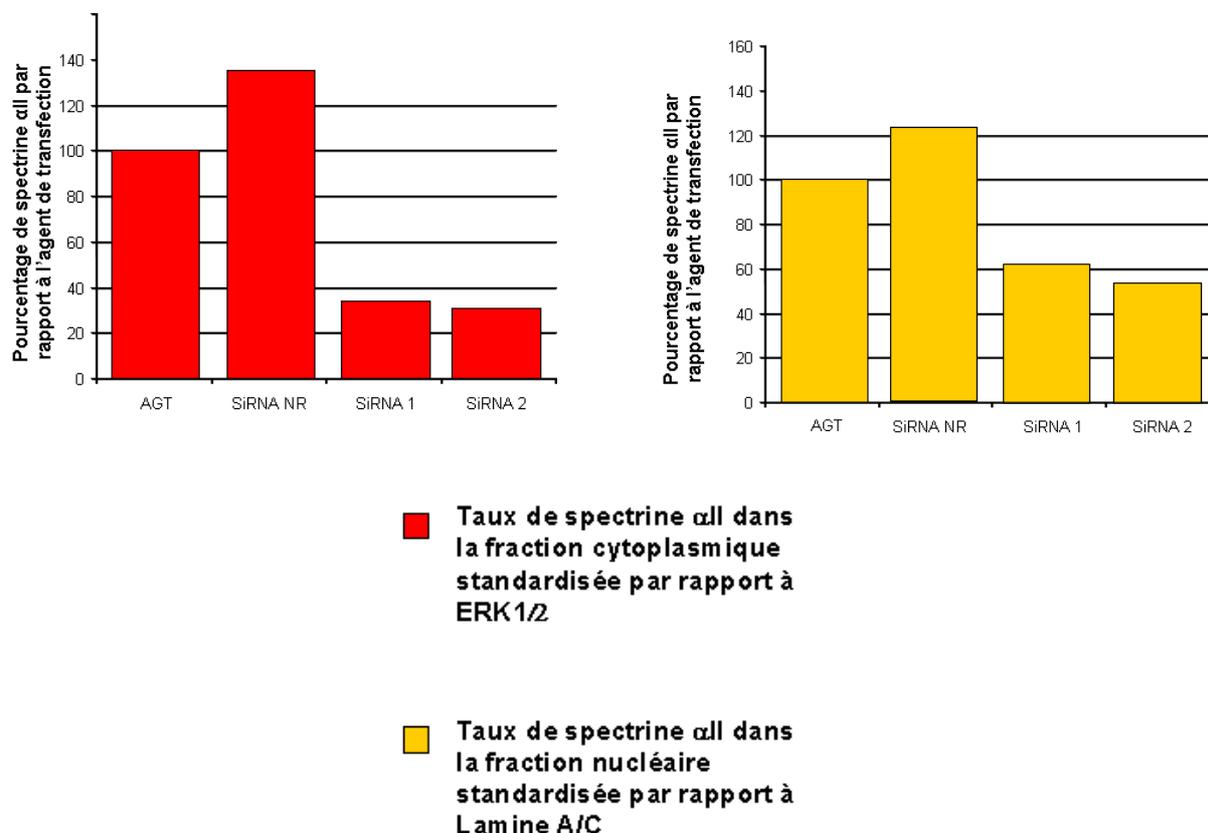


Figure 48 : Pourcentage du taux de spectrine α II présente dans les différentes fractions cellulaires

V L'étude de l'adhérence, de l'étalement ainsi que de la migration des cellules

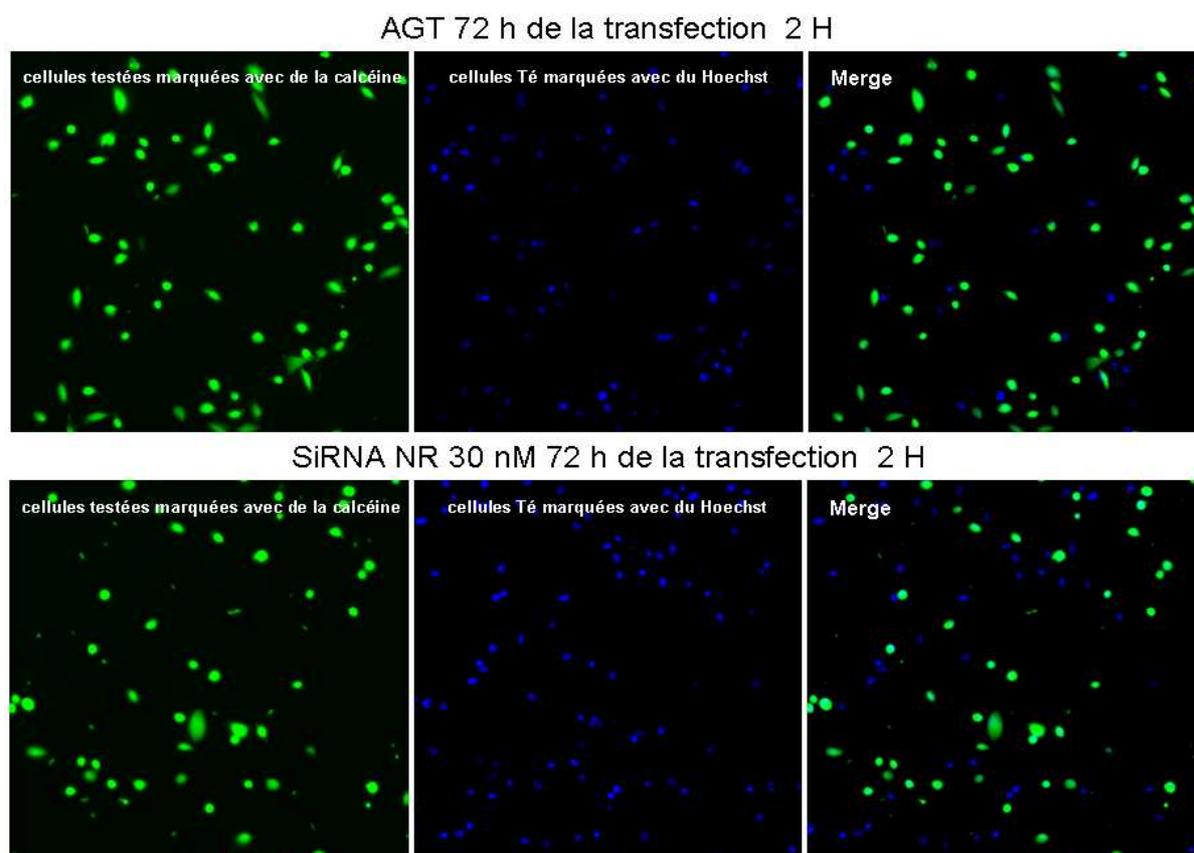
V.1 L'adhérence statique des cellules

Nous avons observé que les cellules traitées par les SiARN dirigés contre la spectrine α II se détachaient plus facilement lors des différentes étapes (marquages /lavages) nécessaires à la préparation des échantillons pour les études en microscopie. Les images obtenues montrent que les cellules restées adhérentes étaient beaucoup plus rondes et moins étalées que les cellules témoins (les cellules traitées soit avec l'agent de transfection, soit avec le SiARN non relevant). Ces observations suggèrent un défaut d'adhérence des cellules. Pour valider cette

hypothèse, nous avons réalisé des tests d'adhérence statique sur plastique traité pour la culture cellulaire (figure 49 en page 123).

L'adhérence a été étudiée sur des cellules, 72 h après la transfection car comme nous l'avons montré, à ce temps, le contenu cellulaire en spectrine α II est très faible, entre 20 et 30 %, de plus il y a peu de cellules apoptotiques contrairement au temps de 96 h.

La mesure de l'adhérence a été faite deux heures après le dépôt des cellules, dans une plaque 12 puits, d'un mélange constitué de cellules marquées à la calcéïne et correspondant aux cellules dont on teste l'adhérence (c'est à dire les cellules traitées avec l'agent de transfection seul ou avec le SiARN non relevant ou les SiARN 1 et 2) et de cellules marquées au Hoechst 33342 (cellules correspondant à un contrôle interne d'adhérence). Grâce à la fluorescence spécifique de chaque groupe de cellules, on peut aisément les détecter et les compter par le logiciel ImagePRO plus.



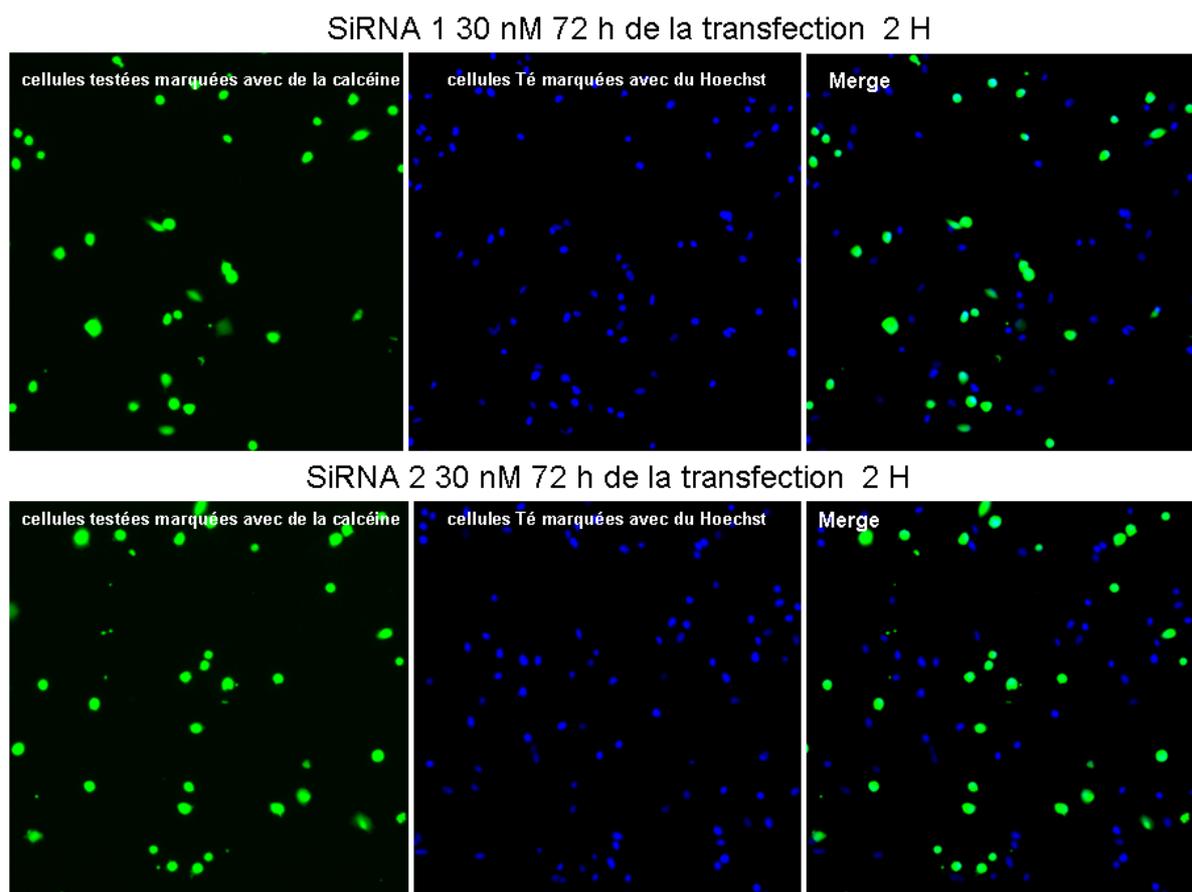


Figure 49 : Détection de la fluorescence des cellules marquées à la calcéïne en vert (cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul, soit avec le SiARN non relevant NR, soit avec les SiARN 1 et 2, à 30 nM 72 h après la transfection), et des cellules témoins marquées au Hoechst 33342 en bleu, 2 h après leur dépôt.

Pour quantifier l'adhérence des différents échantillons, nous avons compté pour chaque prise de vue, le nombre de cellules marquées à la calcéïne et le nombre de cellules marquées au Hoechst 33342. Puis nous avons établi le rapport entre le nombre de cellules marquées à la calcéïne sur le nombre de cellules marquées au Hoechst 33342. Les cellules traitées avec l'agent de transfection correspondent aux 100%.

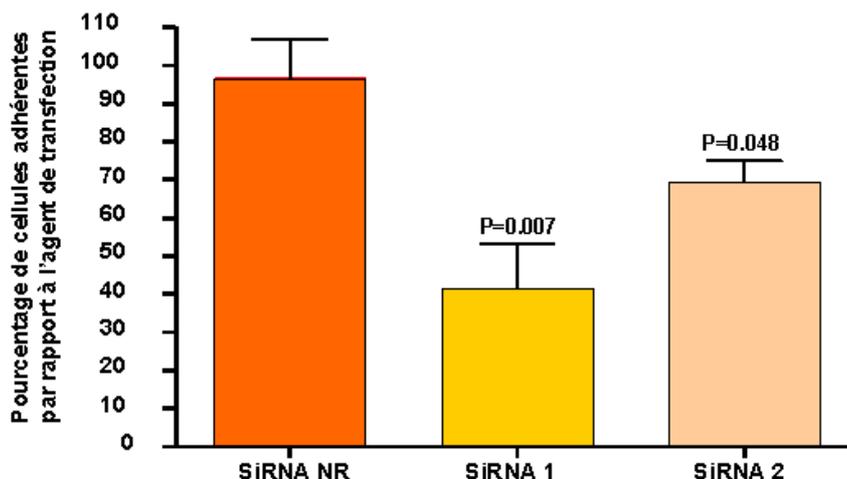


Figure 50 : Etude de l'adhérence statique des cellules traitées avec l'agent de transfection seul (100%), et des cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR (30 nM) en orange, le SiARN 1 (30 nM) en jaune, et le SiARN 2 (30 nM) en beige. Cette expérience a été faite sur des cellules 72 h après la transfection.

Ces expériences montrent que le nombre de cellules adhérentes traitées avec les SiARN 1 et 2 (dirigés contre la spectrine α II) est significativement diminué par rapport aux cellules traitées avec les SiARN non relevant, respectivement 40% et 70% des cellules traitées avec les SiARN 1 et 2 restent adhérentes (figure 50 ci-dessus).

Ces résultats montrent que la perte de spectrine α II provoquant un nombre important de cellules en suspension est du à un défaut d'adhérence.

V.2 L'étalement des cellules

Pour l'étude de l'étalement des cellules, nous avons prolongé le temps d'adhérence : les tests ont été réalisés quatre heures après le dépôt des cellules marquées par la calcéïne. Le marquage à la calcéïne permet de visualiser et quantifier l'étalement des cellules grâce au logiciel Image Pro plus. Le nombre de cellules totales ainsi que le nombre de cellules rondes ont pu être établis selon l'index de fluorescence.

Les cellules étalées montrent un marquage plus diffus que les cellules rondes qui ont une intensité de fluorescence plus importante (figure 51 ci-dessous).

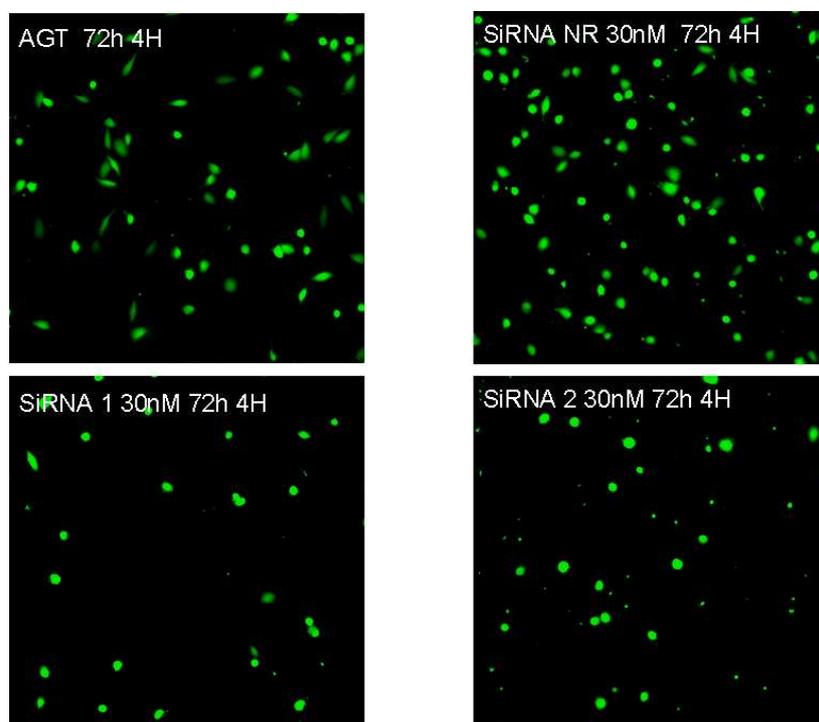


Figure 51 : Détection des cellules marquées à la calcéïne (cellules transfectées soit avec l'agent de transfection seul, soit avec les SiARN non relevant NR, 1 et 2 à 30 nM après 72 h de la transfection) pour visualiser leur étalement après 4 h d'incubation.

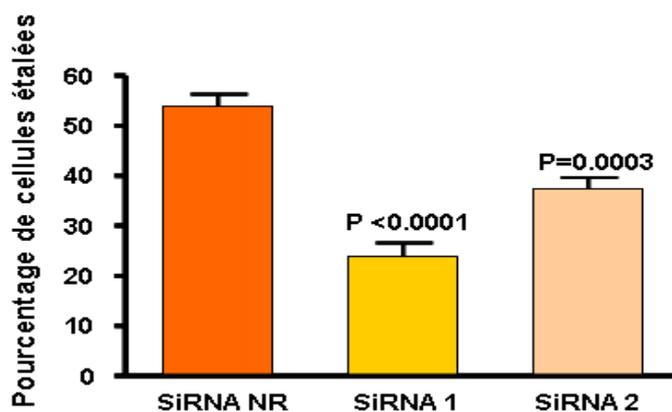


Figure 52 : Etude de l'étalement des cellules traitées avec l'agent transfection seul correspond à 100%, et sur des cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR (30 nM) en orange, le SiARN 1 (30 nM) en jaune, et le SiARN 2 (30 nM) en beige. Cette expérience a été faite sur des cellules à 72 h de la transfection.

Les pourcentages de cellules étalées traitées avec les SiARN 1 et 2 sont respectivement, de 24% et 37% tandis que ces pourcentages pour les cellules traitées avec l'agent de transfection seul et pour les cellules avec le SiARN non relevant sont respectivement de 68% et 54%. Les données de ces expériences montrent bien que la déplétion en spectrine dans les cellules WM-266 est associée à un défaut de la capacité des cellules à adhérer et à s'étaler. Nous avons ensuite analysé le potentiel des cellules à migrer bien que ces processus soient très liés (figure 52 en page 125).

V.3 La migration des cellules

Le défaut d'étalement des cellules et les modifications du cytosquelette d'actine associés à la déplétion en spectrine α II, nous a amené à étudier leur migration. La migration cellulaire a été étudiée sur des membranes de type Transwell possédant des pores de diamètre de 8 μ m perméable aux cellules migrantes (Fagiani, E.,Giardina, G. *et al.* 2007). Nous avons effectué une mise au point pour déterminer le nombre adéquat de cellules à déposer sur la membrane pour obtenir un maximum de cellules migrantes après 24 h de culture.

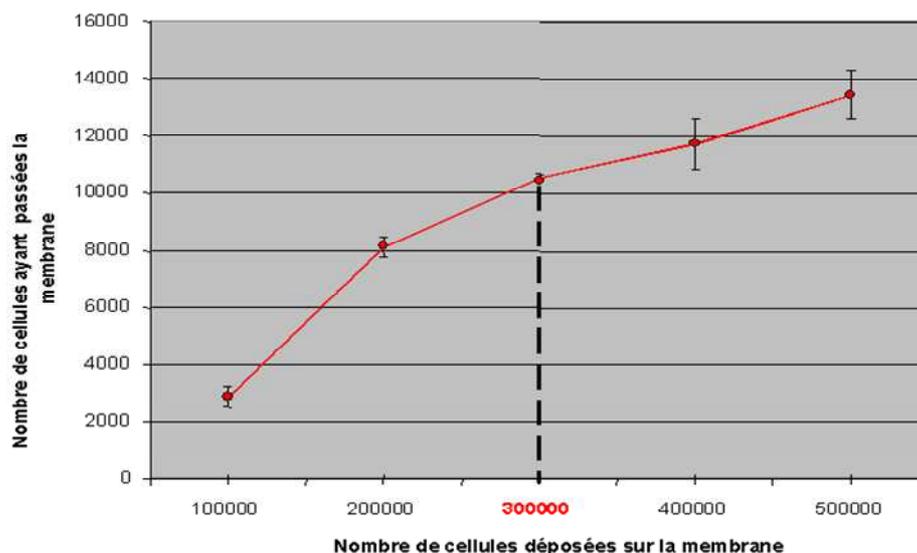


Figure 53 : Graphique des cellules migrantes par rapport au nombre de cellules déposées sur la membrane, ces expériences ont été faites pour déterminer le nombre de cellules à déposer sur la membrane pour avoir le maximum de cellules migrantes.

D'après la courbe du nombre de cellules migrantes par rapport au nombre de cellules déposées sur la membrane Transwell, il apparaît une saturation de la membrane au delà d'un dépôt supérieur à 300 000 cellules WM-266 (figure 53 en page 126).

Les études de la migration ont été réalisées avec 300 000 cellules par puits. Après 24 h de migration, les cellules ayant passé la membrane poreuse sont comptées par cytométrie en flux en excluant les cellules mortes par un marquage au préalable avec l'iodure de propidium.

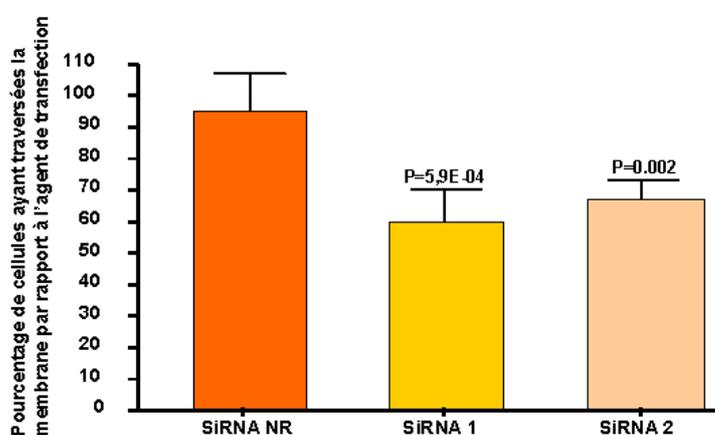


Figure 54 : Quantification de la migration des cellules traitées avec l'agent de transfection seul correspond à 100 %, et sur des cellules transfectées avec les SiARN non relevant (30 nM) NR en orange, le SiARN 1 (30 nM) en jaune, et le SiARN 2 (30 nM) en beige. Cette expérience a été faite sur des cellules à 72 h de la transfection.

Nous avons considéré que le nombre de cellules migrantes traitées avec l'agent de transfection AGT 72 h après la transfection, représentent 100%. Le nombre de cellules migrantes traitées avec le SiARN non relevant NR (30 nM) est très proche de celui des cellules traitées par l'agent de transfection (il correspond à $91 \pm 10\%$). Comme pour l'adhérence cellulaire, les cellules traitées par les SiARN 1 et 2 (30 nM) migrent beaucoup moins, soit respectivement $57.6 \pm 5.8\%$ et $64.76 \pm 8.2\%$ par rapport aux cellules traitées par l'agent de transfection figure 54 ci-dessus.

Afin d'expliquer sur le plan moléculaire les déficits d'adhérence, d'étalement et de migration mis en évidence dans les cellules déplétées en spectrine, nous nous sommes intéressés à l'expression des intégrines.

VI L'étude de l'expression des intégrines présentes dans les cellules WM-266

VI.1 L'expression de différentes intégrines à la surface des cellules en cytométrie en flux et par western blot

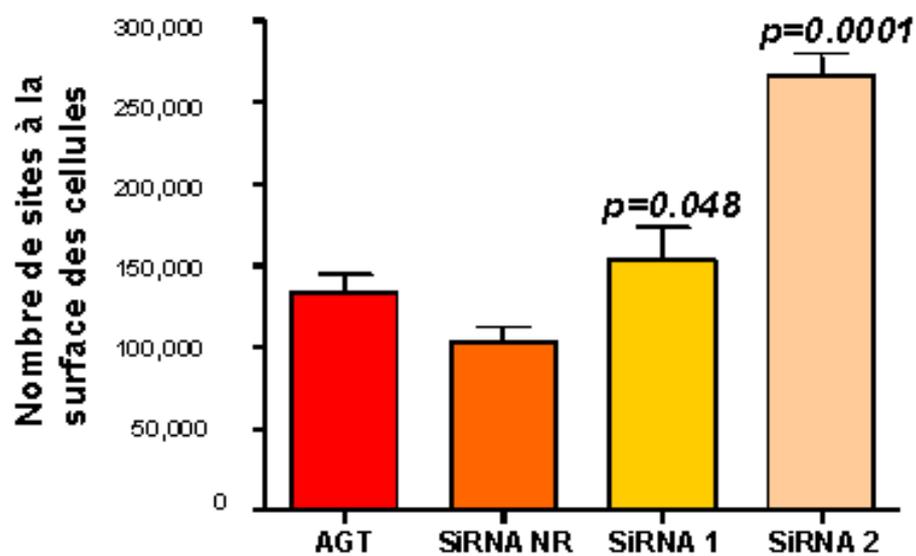
Les hétéro-dimères d'intégrine $\alpha\beta$ lient la matrice par leurs régions extracellulaires, leurs parties intracellulaires sont en relation avec le cytosquelette, et médient beaucoup de voies de signalisation intracellulaire.

Afin d'expliquer en particulier, le défaut d'adhérence des cellules déplétées en spectrine α II, nous avons évalué dans trois expériences de cytométrie en flux, l'expression des intégrines à la surface des cellules :

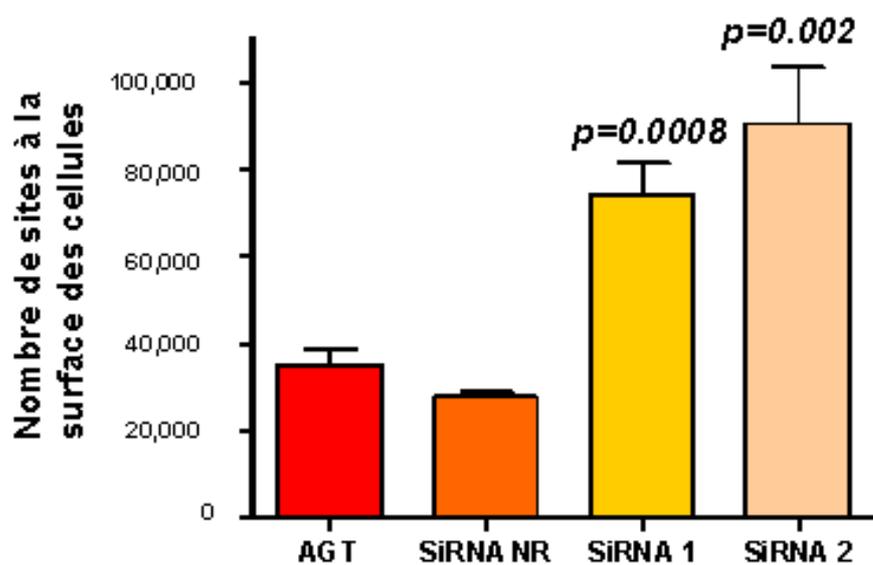
- les intégrines α 3, α V, et β 1 qui sont exprimées dans les mélanocytes, les lignées de mélanomes, dans des tissus de mélanomes métastatiques.
- les intégrines α 4, α 5 et β 3 qui sont anormalement présentes dans les mélanomes.

Ces expériences ont été faites sur les cellules traitées avec l'agent de transfection seul AGT, les cellules transfectées par le SiARN non relevant NR (30 nM), et les SiARN 1 et 2 (30 nM), 72 h après la transfection.

intégrine $\alpha 3$



intégrine $\alpha 5$



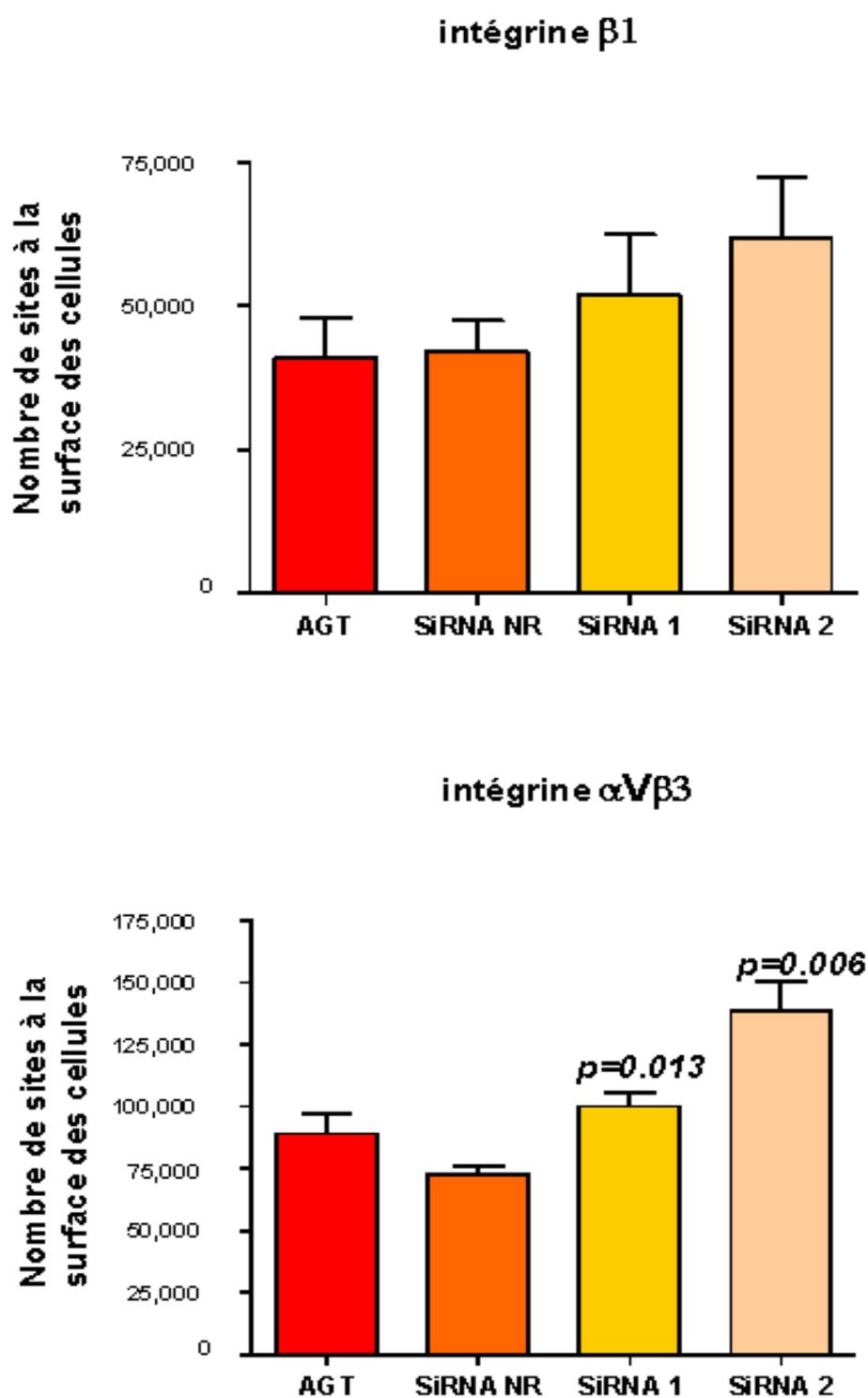


Figure 55 : Quantification de l'expression de certaines intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ à la surface des cellules traitées soit avec l'agent de transfection AGT soit avec les SiARN non relevant NR, 1 et 2 à 30 nM après 72h de la transfection par cytométrie en flux.

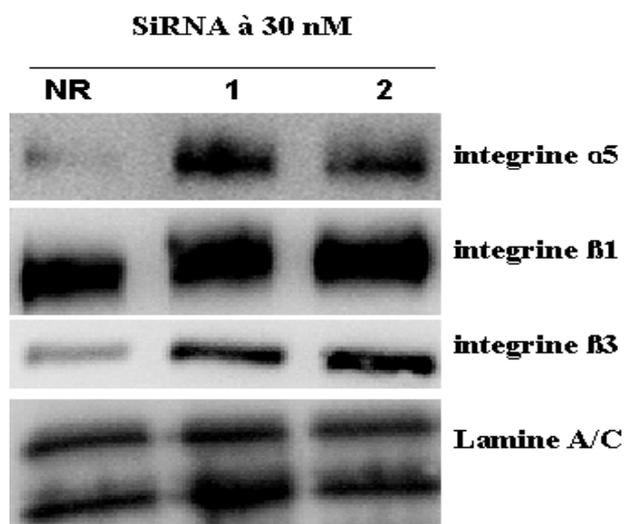


Figure 56 : Détection de l'intégrine $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ en western blot sur des lysats de cellules transfectées avec soit le SiARN NR, 1 et 2 à 30 nM après 72 h de la transfection. La lamine A/C est utilisé pour standardiser les différentes pistes.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence d'expression membranaire entre les cellules témoins (agent de transfection AGT ou SiARN non relevant NR) et les cellules transfectées avec les SiARN dirigés contre la spectrine $\alpha 11$ pour l'intégrine $\alpha 4$. Nous avons relevé une légère augmentation mais qui est non significative de l'expression membranaire de l'intégrine $\beta 1$ (figure 55 en page 130), ce résultat a été confirmé en western blot sur un lysat total de cellules (figure 56 ci-dessus).

Par contre pour les autres intégrines testées (intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha V\beta 3$), nous avons observé une expression significativement augmentée à la membrane des cellules traitées avec les SiARN 1 et 2. Cette augmentation est respectivement de 1.6 et 2.7 pour l'intégrines $\alpha 3$ et 2.6 et 3.1 pour l'intégrine $\alpha 5$ par rapport aux cellules traitées avec le SiARN non relevant NR. Pour l'intégrine $\alpha V\beta 3$, nous avons bien observé une augmentation significative mais beaucoup plus modéré de l'ordre de 1.4 pour les cellules traitées avec le SiARN 1 et 1.9 pour le SiARN 2.

L'augmentation d'expression des intégrines $\alpha 5$ et $\beta 3$ à la surface des cellules, traitées avec les SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine, a été confirmée en western blot sur un lysat total de cellules.

L'augmentation de l'expression membranaire de certaines intégrines dans les cellules déplétées en spectrine associée à une perte d'adhérence est surprenante et contradictoire. Pour vérifier l'implication de ces intégrines dans l'adhérence, nous avons réalisé des expériences d'adhérence statique avec des cellules WM-266 traitées préalablement avec des anticorps bloquant la fonction de ces intégrines.

VI.2 L'implication des intégrines dans l'adhérence des cellules WM-266

Nous avons testé si les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, et $\alpha V\beta 3$ dont l'expression est augmentée à la surface des cellules déplétées en spectrine $\alpha 11$, étaient impliquées dans l'adhérence des cellules WM-266. Ces expériences ont été réalisées comme dans les études sur l'adhérence, mais les cellules WM-266 sont traitées préalablement avec des anticorps qui ciblent une intégrine et, en se fixant, bloquent sa fonction d'adhérence à son substrat spécifique.

Pour s'assurer que les anticorps bloquant étaient bien fixés aux cellules, ils ont été marqués avec un Alexa 568. La détection de la fluorescence rouge de l'Alexa grâce à une caméra monochromatique, nous indique que les anticorps sont présents sur les cellules (figure 57 ci-dessous).

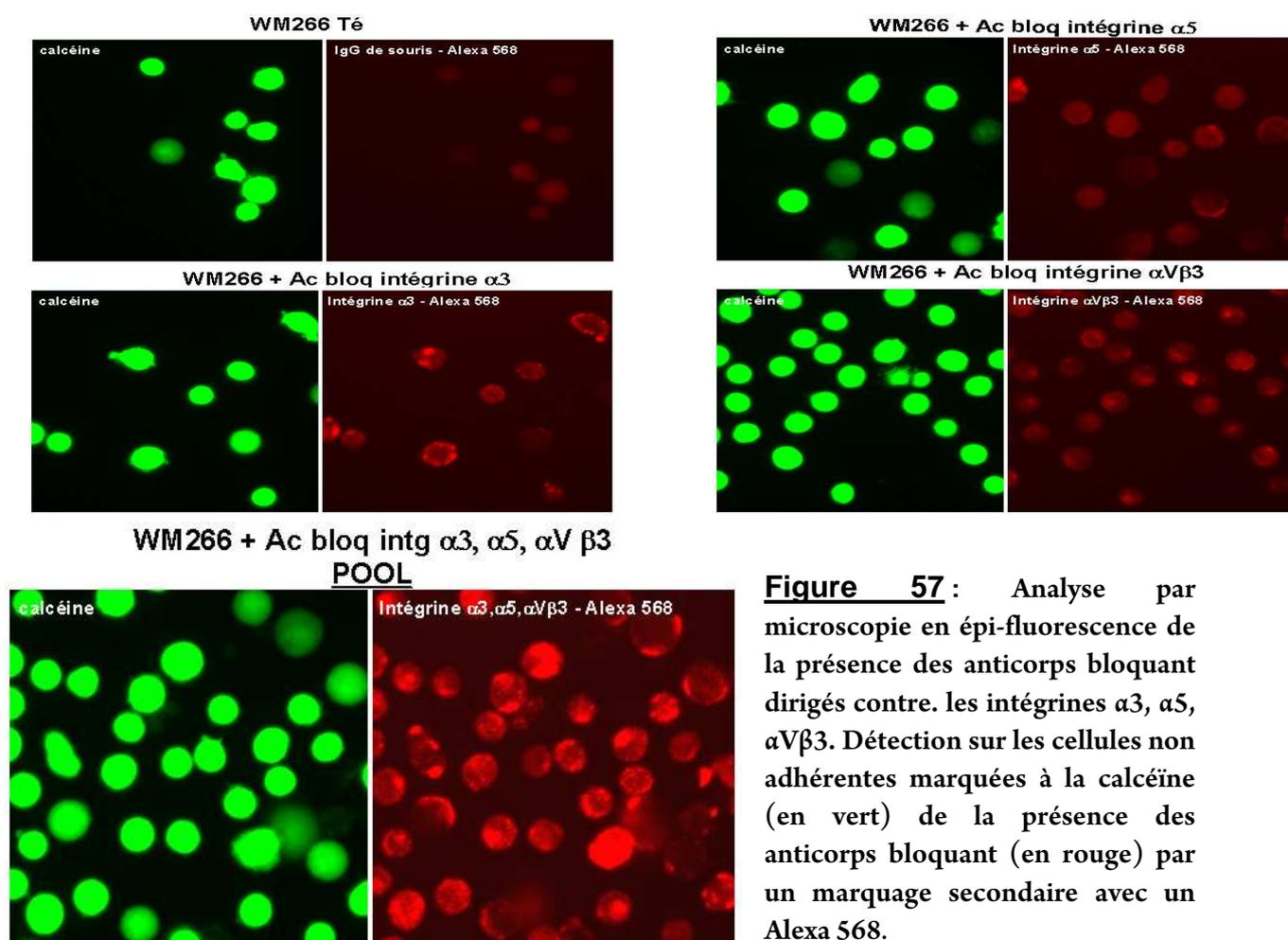


Figure 57 : Analyse par microscopie en épi-fluorescence de la présence des anticorps bloquant dirigés contre les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha V\beta 3$. Détection sur les cellules non adhérentes marquées à la calcéine (en vert) de la présence des anticorps bloquant (en rouge) par un marquage secondaire avec un Alexa 568.

Ces tests révèlent une baisse significative de l'adhérence des cellules WM-266 (figure 58 ci-dessous), lorsqu'elles sont traitées avec l'anticorps bloquant pour l'intégrine $\alpha 3$, il ne reste que $71 \pm 6\%$ de cellules qui adhèrent sur le plastique, pour l'intégrine $\alpha 5$, $80 \pm 9\%$ l'intégrine $\alpha V\beta 3$ $68 \pm 14\%$, en comparaison avec les cellules qui ont été traitées par des IgG de souris (témoins) ajustées à 100%.

Implication des intégrines dans l'adhérence des cellules WM266

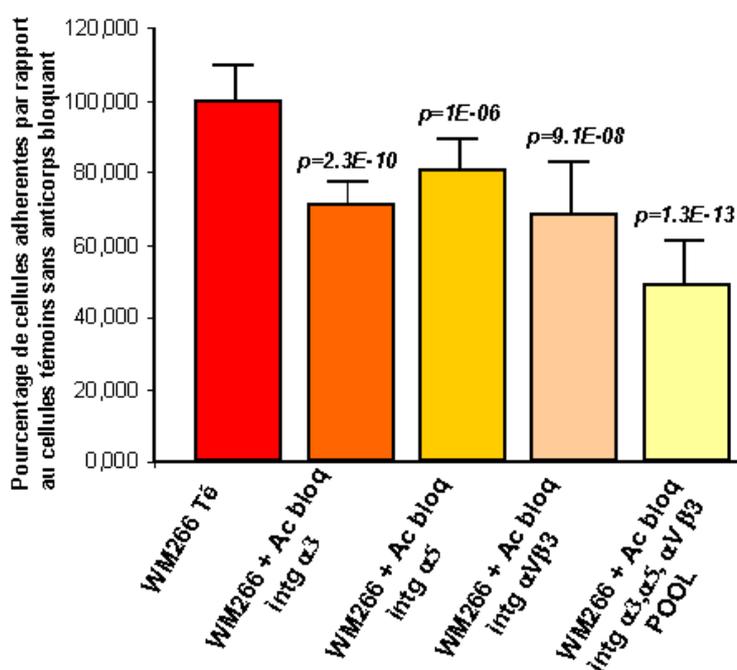


Figure 58 : Quantification de l'adhérence des cellules traitées avec des anticorps bloquants les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha V\beta 3$.

Ces expériences sur les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\alpha V\beta 3$ montrent qu'elles jouent un rôle dans l'adhérence des cellules WM-266.

VI.2 La localisation des intégrines par immunofluorescence

Nous avons ensuite analysé par immunofluorescence au microscope confocal la localisation des intégrines dont l'expression est augmentée dans les cellules

déplétées en spectrine α II, et en particulier l'intégrine α 5 et l'intégrine α V β 3, 72 h après la transfection.

Le marquage de l'intégrine α 5 dans les cellules traitées avec le SiARN non relevant (NR) (30 nM) (figure 59 ci-dessous) est diffus dans le cytoplasme. Dans les cellules traitées avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II (30 nM), ce marquage paraît beaucoup plus localisé à la membrane surtout dans les cellules qui contiennent un niveau de spectrine α II très bas (indiquées par une flèche sur la figure 59 ci-dessous).

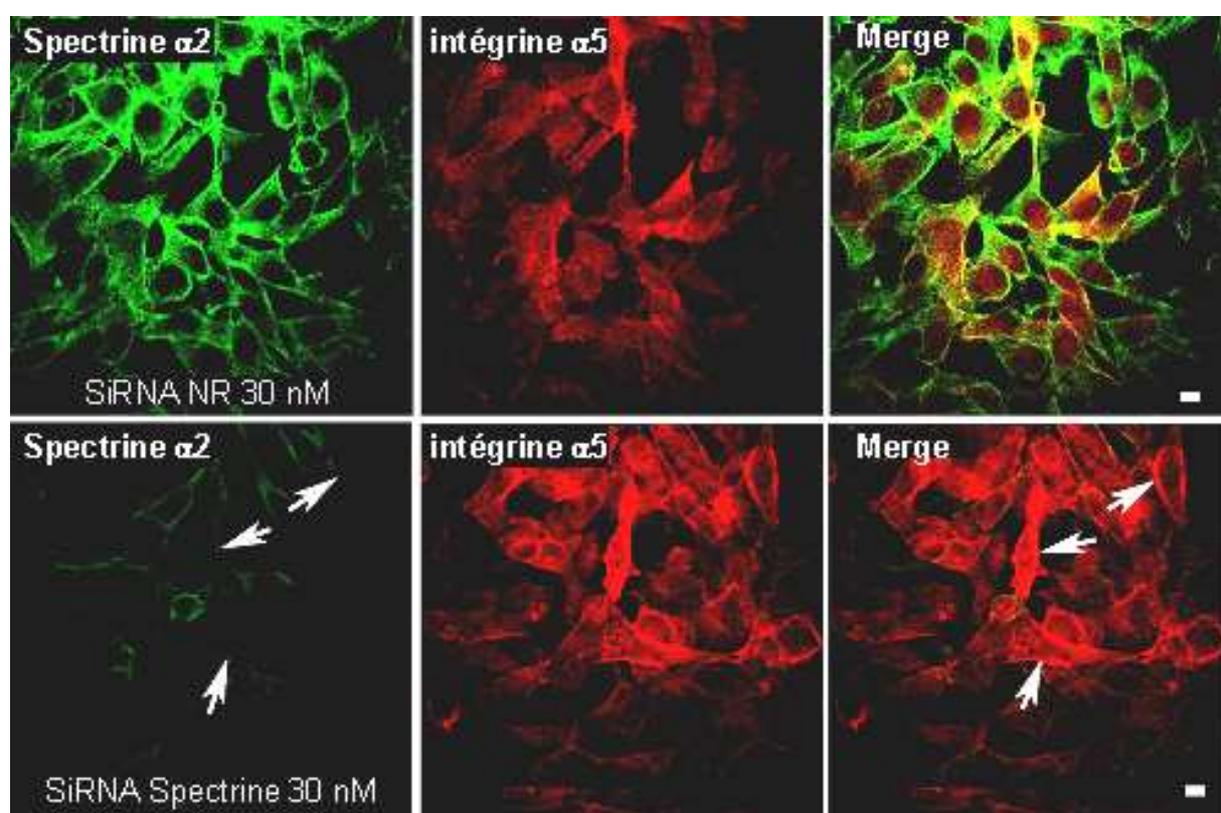


Figure 59: Localisation de l'intégrine α 5 sur des cellules transfectées avec le SiARN NR et les SiARN dirigés contre la spectrine α II à 30nM 72h après la transfection.

Classiquement les points focaux, régulièrement dispersés à la périphérie de la cellule, sont caractérisés par une co-localisation de la paxiline et de l'intégrine α V β 3, et la co-localisation de l'intégrine α V β 3 avec les extrémités des fibres de stress d'actine.

Nous avons donc effectué des co-marquages de la paxilline avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et de l'actine avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$ sur des cellules transfectées avec les SiARN non relevant et les SiARN dirigés contre la spectrine αII (30 nM) à 72 h de la transfection. Nous avons observé des modifications dans la localisation de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ (figure 60 ci-dessous).

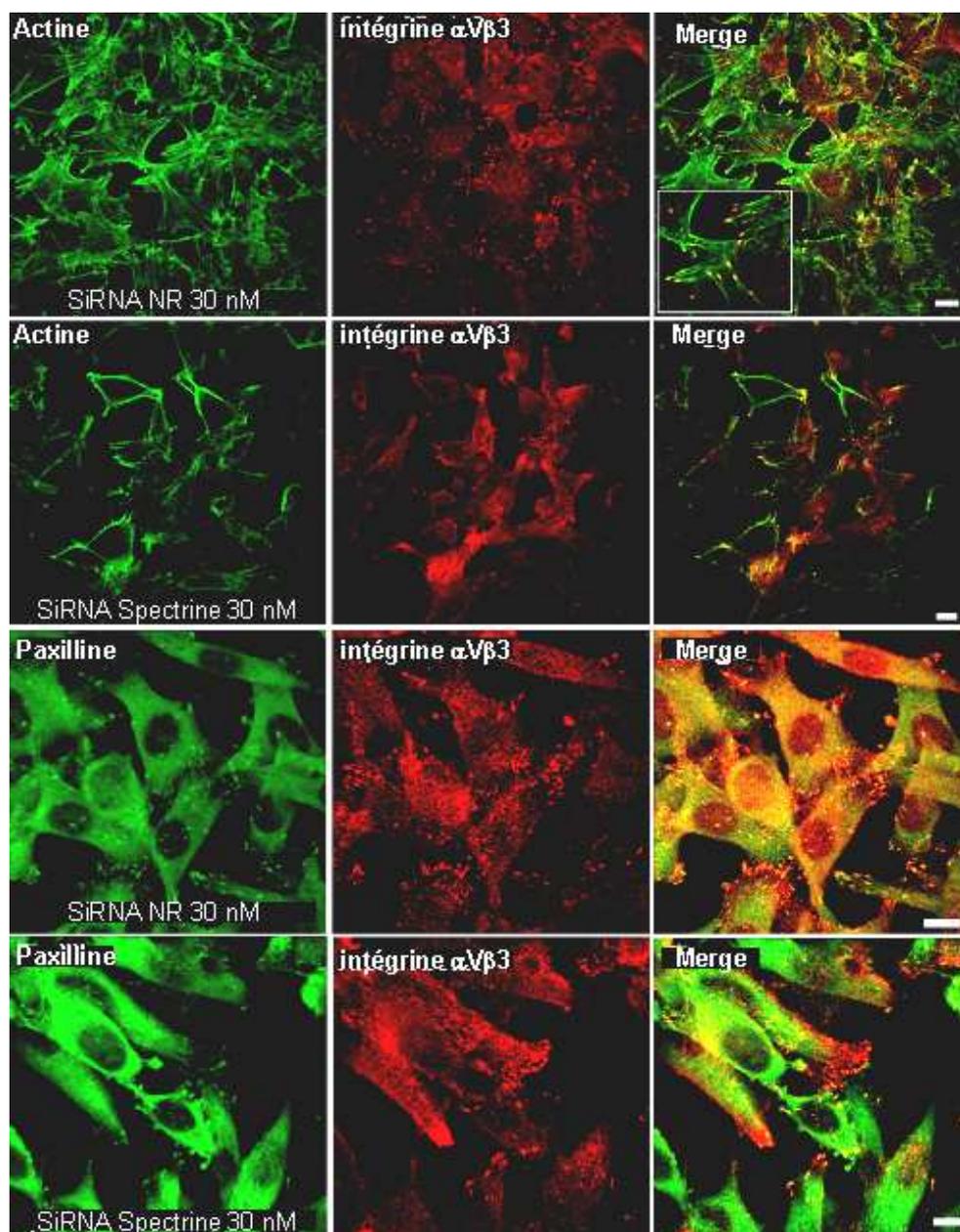


Figure 60: Localisation de l'actine, de la paxilline, et de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ sur des cellules transfectées soit avec les SiARN NR à 30 nM ou soit avec les SiARN dirigés contre la spectrine αII à 30 nM après 72h de la transfection.

Le traitement des cellules avec les SiARN dirigés contre la spectrine α II montre clairement une baisse dans la densité des structures d'adhérence, comme le montre le marquage de l'intégrine α V β 3 en comparaison entre les cellules contrôles (cellules traitées avec les SiARN non relevant) et les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2. Seules quelques structures d'adhérence restent aux extrémités des cellules après traitement par les SiARN 1 et 2. Le marquage de l'actine F par la phalloïdine montre la réduction des fibres de stress et le renforcement de l'actine corticale sur les cellules traitées avec les SiARN 1 et 2

Les modifications de localisations des intégrines α 5 et α V β 3 peuvent avoir un retentissement sur la fonction d'adhérence de ces protéines, ce qui pourrait expliquer la perte d'adhérence malgré une augmentation de ces protéines à la surface des cellules déplétées en spectrine.

DISCUSSION

L'objectif de ma thèse était de caractériser le(s) rôle(s) de la spectrine α II. Grâce à la technique de SiARN, nous avons pu observer les différents phénotypes qu'engendre la déplétion partielle de la spectrine α II dans la lignée cellulaire WM-266.

I Discussion sur les techniques utilisées pour obtenir et vérifier les résultats

I.1 Choix de la forme des SiARN et des conditions de transfection utilisés pour dépléter la spectrine α II

Les mises au point de la technique de transfection des SiARN a constitué une partie de mon travail de thèse. Il était nécessaire d'obtenir une population de cellules transfectées très homogène afin d'analyser différents processus cellulaires comme la prolifération, l'adhérence des cellules déplétées en spectrine.

Nous avons choisi d'utiliser des SiARN en oligo-nucléotides duplexes afin de diminuer l'expression de la spectrine α II de façon transitoire. Plusieurs SiARN dirigés contre différentes parties de l'ARN messenger de la spectrine α II ont été testés, ces régions ciblées sont répertoriées aujourd'hui comme étant non spécifiques d'une isoforme de la spectrine α II.

Les SiARN et les conditions de transfections ont été sélectionnés afin d'avoir :

1/ un très bon taux de transfection (une incorporation des SiARN dans les cellules doit être très importante et homogène).

2/ des SiARN très spécifiques et efficaces.

Pour cela, nous avons utilisé quatre SiARN dirigés contre la spectrine α II; deux SiARN ciblant l'ARN messenger de la spectrine α II dans des régions différentes, ont montré des résultats de déplétion de la spectrine α II plus importants avec les mêmes phénotypes.

Le but d'utiliser au moins deux SiARN nous permet de consolider les phénotypes observés liés à la déplétion de la spectrine α II. Ceci diminue les risques que les phénotypes observés soient liés à la déplétion d'une autre protéine, due à des

hybridations non spécifiques sur d'autres ARN messagers ou que ces phénotypes soient liés à une isoforme de la spectrine α II.

L'efficacité est très importante aussi, elle dépend de la zone ciblée sur l'ARN messager, ainsi que la séquence du SiARN (il faut que la zone ciblée de l'ARN messager soit accessible, qu'il y ait une bonne hybridation pour activer le complexe RISC). Les deux SiARN choisis comme les plus efficaces parmi le pool de SiARN testés ont montré une efficacité différente sur la déplétion de la protéine.

Nous aurions pu faire des transfections stables et produire le SiARN en tête d'épingle par un plasmide « inductible » mais cette technique constitue une technologie plus lourde à mettre en place avant de produire des résultats. La technique de plasmide « inductible » pourra être envisagée par la suite pour étudier les phénomènes cellulaires comme la polarisation, le transport intracellulaire.

I.2 La détection de la déplétion en spectrine α II

Pour analyser la déplétion de la spectrine nous avons décidé de détecter la baisse du taux de protéine après les transfections à 48, 72 et 96 h par différentes techniques, le western blot, la cytométrie en flux après perméabilisation des cellules et détection intracellulaire de la spectrine, l'immunofluorescence en microscopie. .

-par dosage des ARN messagers de la protéine cible

Nous aurions pu analyser la baisse des ARN messagers spécifiques de la spectrine α II dans les cellules WM-266, mais la baisse de l'ARN messager ne garantit pas la baisse du taux de la protéine car elle peut avoir une stabilité importante au sein de la cellule. La déplétion d'une protéine par la technique des SiARN est aussi dépendante du temps de demi-vie spécifique de chaque protéine sachant que ces temps peuvent être différents suivant la localisation de la protéine cible dans la cellule. Il s'avère que la spectrine α II a une grande stabilité lorsqu'elle est intégrée dans le cytosquelette tandis que son temps de demi-vie est court lorsqu'elle est soluble (Blikstad, I., Nelson, W.J. *et al.* 1983; Hanspal, M. et Palek, J. 1987). Le seul intérêt d'analyser le taux d'ARN messager de la spectrine α II serait le cas où la spectrine α II posséderait

plusieurs isoformes dans la cellule, et que les isoformes aient des fonctions différentes.

Ayant un anticorps dirigé contre le domaine SH3 de la spectrine α très performant en western blot, en cytométrie en flux, et en microscopie, nous avons donc choisi de déterminer l'effet des SiARN en mesurant le taux de protéine.

-par western blot

Grâce à un taux de transfection élevé et à une bonne efficacité des SiARN, nous avons pu observer aisément une déplétion de la spectrine α II en western blot. Le western blot analyse un ensemble de cellules et la déplétion observée en western blot reflète une moyenne des déplétions intrinsèques de chaque cellule transfectée.

-par cytométrie en flux

L'analyse de la déplétion en spectrine α II par cytométrie en flux, permet une analyse cellule par cellule du contenu cellulaire en spectrine. Cette technique montre que les cellules possédant moins de spectrine α II, ont une taille plus petite. Ces observations ont été confirmées par la suite en microscopie.

-par immunofluorescence en microscopie

Les expériences d'immunofluorescence montrent aussi la déplétion de la spectrine α II cellule par cellule mais contrairement à la cytométrie en flux, nous avons des résultats qualitatifs. Nous avons obtenu grâce à cette technique, les premiers résultats de ma thèse et surtout les voies à explorer.

I.3 Les premières observations en microscopie

Les premières analyses de cellules déplétées en spectrine par immunofluorescence en microscopie ont montré deux faits:

- Les cellules étaient beaucoup plus petites et ronds que les cellules possédant l'intégrité du squelette membranaire. Cette observation a été confirmée par la cytométrie en flux.

- Le réseau d'actine était désorganisé avec une perte des fibres de stress lors de marquage de l'actine par la phalloïdine.

II La spectrine α II et son implication dans la forme des cellules

La déplétion de la spectrine α II modifie la taille ainsi que la forme des cellules. Ce lien entre la taille, la forme de la cellule et la spectrine est très bien connue dans le globule rouge.

Chez l'humain, certaines anémies hémolytiques héréditaires sont liées à des défauts quantitatifs ou qualitatifs en spectrine (Brookoff, D., Maggio-Price, L. *et al.* 1982; Delaunay, J. 2007). Des déficits d'expression de la spectrines α et/ou β dus à des mutations sont associés à des sphérocytoses dans lequel le globule rouge a une forme anormalement sphérique avec une taille diminuée (Grimber, G., Galand, C. *et al.* 1992). D'autres mutations sur les spectrines provoquent un déficit du tétramère de spectrine dans le globule rouge débouchent vers des elliptocytoses. Cette pathologie s'exprime par des hématies en forme d'ellipse.

Chez la souris les invalidations des gènes α I (sph/sph) (Bodine, D.M.t., Birkenmeier, C.S. *et al.* 1984) et β I (ja/ja) (Bloom, M.L., Kaysser, T.M. *et al.* 1994) de la spectrine ont montré aussi de sévère anémie hémolytique, avec des globules rouges possédant des formes anormales et très fragilisés.

En ce qui concerne la spectrine non érythroïde, la déplétion de la spectrine β II par SiARN dans un modèle des cellules épithéliales de bronches humaines altère la formation des membranes latérales. Ces travaux montrent l'implication de cette protéine dans la biogenèse des membranes latérales (Kizhatil, K., Yoon, W. *et al.* 2007). Un modèle de souris tremblantes « qv(3J) » dont la spectrine β IV est déplétée des domaines PH, du domaine spécifique riche en proline et de son domaine de liaison à l'ankyrine, révèle un rôle de la spectrine dans la morphologie de l'axone (Yang, Y., Lacas-Gervais, S. *et al.* 2004). Par contre des mutations naturelles sur une autre spectrine présente dans le système nerveux, la spectrine β III, induisent la déstabilisation du transporteur au glutamate EAAT4, et du GluRDelta2, récepteur impliqué dans la transmission synaptique glutamatergique, et responsable l'ataxia spinocérébelleuse (Ikeda, Y., Dick, K.A. *et al.* 2006), n'altère pas la morphologie cellulaire neuronale. Il faut mentionner qu'il n'existe pas de travaux, qui déplètent

transitoirement par SiARN ou de façon permanente (Knock out) cette protéine, pouvant montrer l'implication possible de ce monomère

Toutes ces données montrent l'implication d'une grande partie des spectrines dans la morphologie cellulaire. Le squelette membranaire dépendant de la spectrine constitue l'armature de la cellule, aussi, lorsque l'on déstabilise ce réseau de spectrine par la diminution de l'expression d'un des monomères α ou β , on modifie les caractères structuraux cellulaires.

III La spectrine α II et le réseau d'actine

L'actine F forme un réseau dense sous la membrane plasmique, mais elle est aussi présente sous la forme de câbles très structurés appelés câbles de tension (fibres de stress), qui traversent le cytoplasme et s'ancrent à la membrane plasmique dans des structures spécialisées, les points focaux. Ce réseau est très dynamique afin de répondre aux différents processus cellulaires comme le mouvement, la différenciation, la division.

Les modifications du squelette d'actine et particulièrement la disparition des fibres de stress observées en microscopie, dans les cellules déplétées en spectrine α II, suggèrent l'implication de la spectrine α II dans l'organisation du réseau d'actine.

La spectrine est une protéine liant l'actine, mais le domaine d'interaction avec l'actine est localisé sur les chaînes β . Il a été observé que la surexpression du domaine liant l'actine localisé sur la spectrine β II dans des cellules épithéliales, entraîne une perte de la morphologie épithéliale typique. Les cellules deviennent multinucléées et meurent après 10-14 jours de culture. Cependant il n'a pas été observé de modifications du réseau d'actine (Hu, R.J., Moorthy, S. *et al.* 1995). Par contre, des micro-injections d'anticorps dirigés contre le pool maternel de spectrine α II (fragment Fab) dans des blastomères chez le poisson starfish, montrent une perturbation du réseau d'actine qui entraîne une altération du cycle cellulaire (Wong, G.K., Hoyle, D.H. *et al.* 1996).

Dans nos travaux, la perte de la spectrine α II doit engendrer la perte du complexe spectrine-actine, ainsi la baisse de prolifération et les modifications de la morphologie des cellules déplétées en spectrine α II pourraient être reliées aux modifications du réseau d'actine.

Ce complexe actine-spectrine est stabilisé par l'adducine et la protéine 4.1. La déplétion de l'adducine α par SiARN provoque une déstabilisation du réseau de spectrine avec une augmentation du taux de spectrine dans les fractions solubles. Cette déplétion en adducine modifie la hauteur des membranes latérales des cellules bronchiales humaines comme il l'est observé dans les cellules déplétées en spectrine β II (Abdi, K.M. et Bennett, V. 2008). En ce qui concerne la protéine 4.1, des souris Knock out ont été générées pour une forme de 4.1, la 4.1R. L'absence d'expression de 4.1R dans le globule rouge provoque une désorganisation du squelette membranaire dépendant de la spectrine avec une perte de 30% de spectrine. Malgré ces phénotypes lourds, les souris sont viables mais la forme de leur globule rouge est anormale et fragile (Bennett, V. et Baines, A.J. 2001). Chez l'humain on retrouve une pathologie liée à un déficit en protéine 4.1R: l'elliptocytose héréditaire. Dans cette maladie les hématies prennent une forme en ellipse.

L'interaction entre la spectrine et l'actine est importante et nécessaire afin que la cellule ait une morphologie « normale ».

La spectrine α II semble avoir un rôle dans l'organisation du réseau d'actine via la spectrine β mais elle pourrait aussi avoir un rôle dans les mécanismes régulant la machinerie de l'actine via plusieurs ligands comme le montrent beaucoup de travaux.

Des travaux récents relèvent des interactions de la spectrine α II avec des protéines impliquées dans la dynamique de l'actine comme EVL, VASP et TES.

Les protéines EVL et VASP, deux membres de la famille Mena/ VASP, sont liées directement au domaine SH3 de la spectrine α II. Elles sont localisées dans les filopodes, lamellipodes et points focaux (Bear, J.E., Krause, M. *et al.* 2001; Reinhard, M., Jarchau, T. *et al.* 2001; Rotter, B., Bournier, O. *et al.* 2005; Bournier, O., Kroviarski, Y. *et al.* 2006; Benz, P.M., Blume, C. *et al.* 2008) mais aussi dans les contacts cellule-cellule comme il a été récemment décrit pour les complexes spectrine/VASP (Benz, P.M., Blume, C. *et al.* 2008). La protéine Tes, protéine codée par un gène suppresseur de tumeur, est liée à la spectrine α II dans la région répétitive α 11. Elle est localisée le long des fibres de stress et aux points focaux. Cette protéine interagit avec une variété de protéines du cytosquelette et des points focaux (comme la zyxine, la vinculine, la taline, ainsi que les protéines Mena, VASP, et EVL) (Coutts, A.S., MacKenzie, E. *et al.* 2003; Drusco, A., Zanesi, N. *et al.* 2005). La perte de son expression, comme pour le spectrine α II, provoque la perte des fibres de stress de l'actine (Griffith, E., Coutts, A.S.

et al. 2005). Des travaux portant sur le domaine SH3 de la spectrine α II montre que ce domaine régule l'activité de la Rho GTPase, Rac (Bialkowska, K., Saido, T.C. *et al.* 2005). La surexpression du domaine SH3 de la spectrine α II inhibe l'activation de Rac, la formation des filaments d'actine et l'étalement des cellules. Cet effet inhibiteur peut être aboli par la co-expression d'une forme de protéine Rac constitutionnellement activée.

Dans nos travaux la perte du domaine SH3 de la spectrine par déplétion de la spectrine α II peut être la cause directe de la perte des fibres de stress, expliquant la baisse de certains processus comme l'adhérence, l'étalement et la migration cellulaire qui sont directement liés à la dynamique de l'actine.

IV L'adhérence des cellules et la spectrine α II

Les cellules déplétées en spectrine α II ont une perte d'adhérence sur plastique de culture et une diminution de leur capacité à s'étaler.

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire est régit par plusieurs structures très dynamiques qui ont des liens avec le cytosquelette (Le Clainche, C. et Carlier, M.F. 2008). Ces structures sont constituées par des regroupements de protéines comme les intégrines :

-les complexes focaux sont constitués, au début de leur formation, de protéines comme l'intégrine β 3, la taline et paxilline et plus tardivement de la vinculine, de l' α actinine, de VASP et de FAK (focal adhesion kinase). Ils sont localisés à la périphérie cellulaire au niveau de l'étalement de la cellule ou de la bordure de migration des cellules.

-les points focaux qui sont constitués d'une grande quantité de vinculine, taline paxilline, zyxine, α actinine, VASP, FAK (focal adhesion kinase), de l'intégrine α V β 3 et de l'actopaxine, sont liés au réseau d'actine par l'extrémité des fibres de stress. Cette structure possède un temps de demi-vie long.

IV.1 La spectrine et l'adhérence dans un aspect quantitatif

Les principales modulations de l'adhérence peuvent être dues à des modifications de l'expression des protéines d'adhérence à la surface des cellules. Il a

été décrit que la spectrine pourrait jouer un rôle dans l'adressage et/ou la stabilisation des protéines membranaires vers la membrane plasmique.

Pour définir le mécanisme régulant la perte d'adhérence des cellules déplétées en spectrine α II, nous nous sommes intéressés à l'expression de certaines intégrines présentes dans cette lignée de mélanome humain WM-266 (Kuphal, S., Bauer, R. *et al.* 2005). De façon surprenante, l'expression à la surface des cellules de certaines intégrines, comme l'intégrine α 5 et l'intégrine α V β 3 est augmentée. Ces intégrines sont présentes dans les structures d'adhérences décrites ci-dessus. Nous avons démontré que ces intégrines étaient bien impliquées dans l'adhérence des cellules WM-266. Ces résultats paraissent paradoxaux car la perte de l'adhérence, aurait pu être due à une baisse de l'expression à la membrane des intégrines.

Comme l'expression de certaines intégrines impliquées dans l'adhérence des cellules WM-266 est augmentée, la perte de l'adhérence des cellules déplétées ne peut pas être liée à un défaut de transport des intégrines. Par contre, la spectrine α II pourrait avoir un rôle dans le renouvellement des protéines de la membrane par le phénomène d'endocytose pour le recyclage des protéines. La désorganisation du cytosquelette dépendant de la spectrine pourrait entraîner un temps de demi-vie plus long à la surface des cellules pour ces protéines de membrane.

Le fait que les intégrines soit augmentées à la surface des cellules peut être du à des effets compensatoires d'adhérence. Les intégrines sont aussi de véritables récepteurs, outre leur fonction dans l'adhérence à la matrice extracellulaire, leur activation engendre des signaux cytoplasmiques via les protéines FAK (focal adhesion kinase) et ILK (integrin linked kinase) jouant un rôle dans des processus cellulaires comme la survie de la cellule, la prolifération, l'étalement de la cellule, la polymérisation de l'actine. L'augmentation des intégrines pourrait compenser les déficits du à la perte de la spectrine (Kuphal, S., Bauer, R. *et al.* 2005). Par exemple cette donnée peut expliquer l'absence apparente d'apoptose lorsque l'on déplete la spectrine α II dans les cellules WM-266, l'augmentation des intégrines à la surface des cellules pourrait protéger la cellule de cette mort cellulaire (Felding-Habermann, B., O'Toole, T.E. *et al.* 2001; Zhang, H., Ozaki, I. *et al.* 2002).

IV.2 La spectrine et l'adhérence dans un aspect qualitatif

Un des rôles proposés pour la spectrine est l'organisation de domaines membranaires spécialisés.

La perte de la spectrine provoque des modifications de localisation des intégrines $\alpha 5$ et $\alpha V\beta 3$, c'est à dire que l'absence de la spectrine αII aurait un effet direct sur la localisation des intégrines.

Actuellement, il n'a pas été décrit de lien physique direct entre la spectrine et les intégrines. Les expériences d'immunofluorescence en microscopie, que nous avons réalisées, n'ont pas mis en évidence de co-localisation entre la spectrine αII et les intégrines. Par contre deux molécules d'adhérence de la famille des Ig-CAM interagissent avec la spectrine ; le Luthéran B-CAM du globule rouge, dont l'adhérence à la laminine $\alpha 5$ diminue lorsqu'il interagit avec la spectrine αI (Kroviarski, Y., El Nemer, W. *et al.* 2004 ; An, X., Gauthier, E. *et al.* 2008) et N-CAM 180 qui est stabilisée à la membrane par l'interaction avec la spectrine βII (Pollerberg, G.E., Burridge, K. *et al.* 1987).

Ce rôle de la spectrine βII envers N-CAM, semble être le même que la spectrine βIV pour L1CAM, mais ces deux protéines interagissent indirectement via l'ankyrine. La spectrine βIV stabiliserait L1CAM à la membrane latérale, limitant ainsi sa mobilité (Nishimura, K., Akiyama, H. *et al.* 2007).

La spectrine αII serait responsable de la bonne localisation de ces intégrines, peut-être par des liens indirects via d'autres protéines comme la talin, la vinculine, la paxiline, protéines présentes dans les structures d'adhérence.

IV.3 L'organisation des points focaux et le regroupement des protéines

Dans les cellules déplétées en spectrine αII , les intégrines délocalisées sont présentes dans les structures d'adhérence. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ co-marquée avec la vinculine est

retrouvée dans les points focaux qui apparaissent moins nombreux et plus diffus ce qui peut expliquer la perte d'adhérence des cellules.

La spectrine α II pourrait jouer un rôle dans l'organisation de ces structures d'adhérence. Bialkowska et ses collaborateurs montrent une accumulation du domaine SH3 de la spectrine α II dans des regroupements d'intégrines, en particulier ils observent une co-localisation du domaine SH3 de la spectrine avec des clusters de l'intégrine β 3 dans des domaines répertoriés comme initiant l'adhérence des cellules et leur étalement (Bialkowska, K., Saido, T.C. *et al.* 2005). La spectrine serait présente au début de la formation de ces clusters d'intégrine β 3, elle pourrait donc participer à la formation de ces clusters mais aussi à leur dynamique. Une expression réduite de la spectrine pourrait altérer la formation de ces clusters d'intégrines bien qu'elles soient largement exprimées à la surface membranaire : ces intégrines non regroupées ne seraient pas efficaces pour l'adhérence. (Bialkowska, K., Saido, T.C. *et al.* 2005). Nos résultats confirment un rôle de la spectrine α II dans le processus d'adhérence cellulaire avec une implication dans l'organisation des complexes d'adhérence.

V La prolifération et spectrine α II: Apoptose et Cycle cellulaire

La déplétion en spectrine α II, provoque une baisse du nombre de cellules avec une mort cellulaire tardive, celle-ci est détectée 96 h après la transfection malgré une diminution de l'expression de spectrine α II déjà détectée à 48 h.

V.1 La mort cellulaire et la spectrine α II

L'invalidation du gène codant pour l'homologue de la chaîne α II provoque une létalité chez la drosophile, le nématode. Dans notre modèle cellulaire WM-266, la déplétion importante de la spectrine (jusqu'à 80%), n'entraîne pas une mort cellulaire significative par apoptose, évaluée selon deux approches expérimentales. Quelques points peuvent expliquer ces résultats surprenants :

Dans ce modèle, le taux de spectrine est diminué de façon importante mais il reste tout de même de la spectrine α II qui est essentiellement localisé à la membrane

(observations faites en immunofluorescence en microscopie, par western blot et par cytométrie en flux), ce taux résiduel est peut être suffisant pour préserver la cellule.

On observe une légère apoptose à 96 h après la transfection. Sur un temps plus long d'analyse, la mort par apoptose pourrait s'amplifier, mais l'efficacité des SiARN diminue après 96 h et la déplétion en spectrine commence à s'estomper, de plus comme la baisse de la spectrine α II apparaît à partir de 48 h après la transfection, si la perte de la spectrine α II provoque la mort cellulaire, celle ci serait très tardive par rapport à la baisse du taux de spectrine α II.

Le type cellulaire que l'on a utilisé est une lignée de mélanome humain au stade métastatique, ces cellules possèdent un métabolisme différent des cellules non tumorales, avec des voies de signalisation qui fonctionnent constitutivement (voies de facteurs de croissance, insensibilité aux freins de prolifération, perte de d'apoptose). Ces cellules ont le potentiel de coloniser différents tissus de l'organisme par des cycles de détachement / dissémination / adhérence. Les cellules métastatiques prolifèrent très facilement dans un environnement réduit. De plus les voies de mort cellulaire par apoptose sont très peu actives, c'est à dire que les cellules sont résistantes face à des stimuli apoptotiques. Le faible taux d'apoptose observé dans les cellules WM-266 déplétées en spectrine pourrait être lié à cette résistance aux stimuli apoptotiques mais la déplétion de la spectrine α II dans un modèle cellulaire non tumoral pourrait avoir des conséquences différentes.

V.2 Le cycle cellulaire et la spectrine α II

Nous démontrons que les cellules déplétées en spectrine ont un arrêt du cycle cellulaire (ou un ralentissement) en phase G1 comme le montre la diminution du pourcentage de cellules dans les phases S et G2/M par rapport aux cellules témoins. Ces résultats sont confirmés par la mesure de la phosphorylation de la protéine Rb et de l'augmentation de la protéine p21 (inhibitrice du cycle cellulaire dans notre modèle cellulaire).

Les mécanismes de la régulation du cycle cellulaire reposent essentiellement sur deux types protéiques complémentaires appelés Cdk ("Cycline-dependent kinase") et cycline. Les Cdk sont les composantes de base, mais, comme leur nom l'indique, elles ont besoin des cyclines pour activer leurs fonctions. Les Cdk et les cyclines

s'associent et forment des complexes hétéro-dimériques (figure 61 ci-dessous). Chaque phase du cycle cellulaire est régulée par un ou plusieurs complexes à Cdk-cycline.

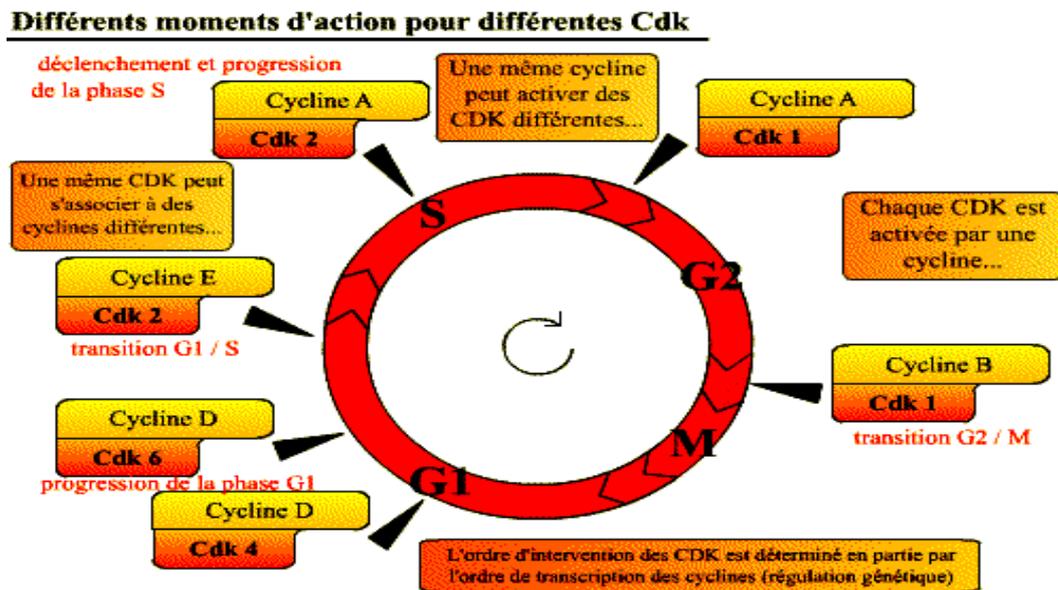


Figure 61 : Différents complexes cycline/Cdk interviennent dans la progression du cycle cellulaire. (Image obtenue sur internet à l'adresse [www.snv.jussieu.fr /bmedia /cyclecellBM /02CDK.htm](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/02CDK.htm)).

Plusieurs acteurs qui interviennent dans le processus de formation de ces complexes cycline/Cdk, régulent le cycle cellulaire (figure 62 en page 151):

Les cyclines sont des activateurs primordiaux des complexes Cdk-cycline car l'activité des Cdk est contrôlée par un cycle de synthèse/dégradation de leur cycline, tout au long du cycle cellulaire.

Des protéines déphosphorylantes (phosphatase activatrice Cdc 25) ou phosphorylantes (kinase activatrice CAK, kinase inhibitrice Wee-1)

Des molécules inhibitrices appelées des CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) constitué de deux familles les KIP/CIP qui inhibent les cyclines et les Cdk, comme p21, p27..... et les INK4 qui inhibent seulement les Cdk, comme p15, p16, p18, p19.....

Régulation de l'activité des Cdk : inhibitions et activations

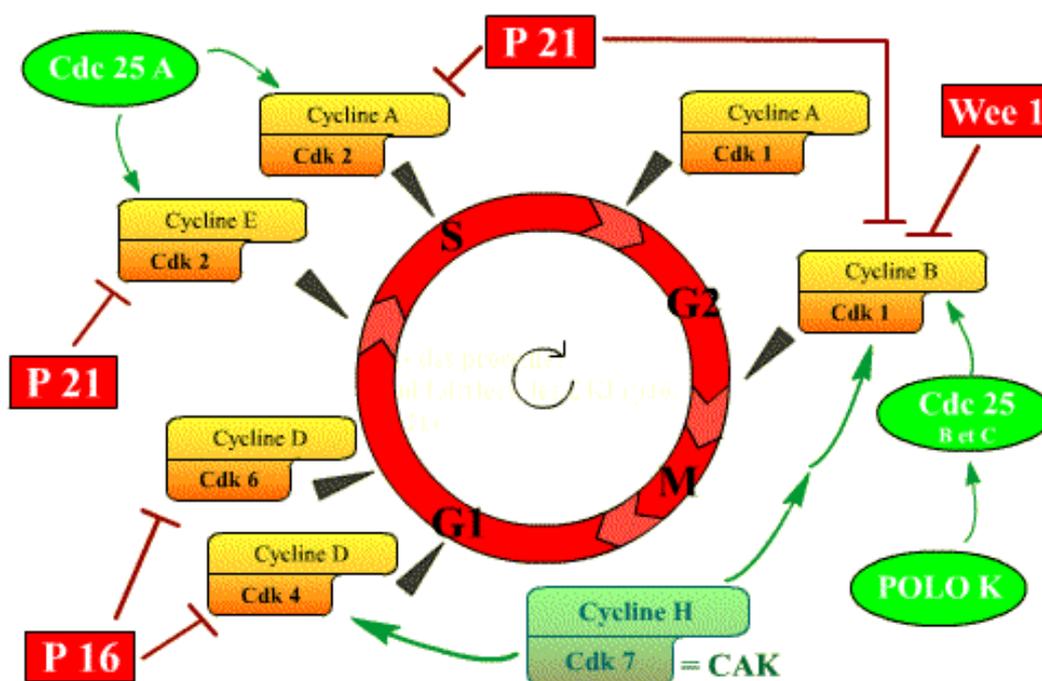


Figure 62: Représentation des différentes protéines régulant le cycle cellulaire. Les protéines (sur fond rouge) montrent les molécules inhibitrices (une kinase Wee1, des CDKI comme p21, p16) et celles sur fond vert correspondes aux protéines activatrices (la phosphatase Cdc25 et la kinase CAK). (Image obtenue sur internet à l'adresse www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/02CDK.htm).

La protéine p21, inhibiteur des Cdk (CDKI), joue un rôle de régulateur négatif dans la progression du cycle cellulaire en phase G1 vers les phases S et G2/M par inhibition de l'activité du complexe Cdk2/cyclineE (figure 62 ci-dessus). L'augmentation d'expression de la protéine p21 observée dans les cellules déplétées en spectrine est compatible avec un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1. Dans le modèle cellulaire WM-266, la déplétion en p21 dans les cellules par SiARN, est associé à une augmentation de la prolifération cellulaire. Ces résultats confirment l'implication de p21 dans la régulation du cycle cellulaire dans les cellules WM-266.

La régulation transcriptionnelle de p21 (figure 63 en page 152) se fait principalement par le facteur p53 mais aussi par Sp1/Sp3, Smad, BRCA1, E2F-1/E2F-3 (Gartel, A.L. et Radhakrishnan, S.K. 2005). La surexpression de cette protéine est observée dans

les cellules ayant subies des stimuli entraînant la réparation de l'ADN, la différenciation, la sénescence, ou l'apoptose (Rowland, B.D. et Peeper, D.S. 2006). Il est à noter que la surexpression de cette protéine peut protéger certaines cellules contre l'apoptose et la tumorigénèse. (Gartel, A.L. et Tyner, A.L. 2002).

Un rôle de la spectrine dans le cycle cellulaire a déjà été montré. Des micro-injections d'anticorps anti-spectrine α II effectuées dans des blastomères de poisson montrent une altération du timing du cycle cellulaire (Wong, G.K., Hoyle, D.H. *et al.* 1996)

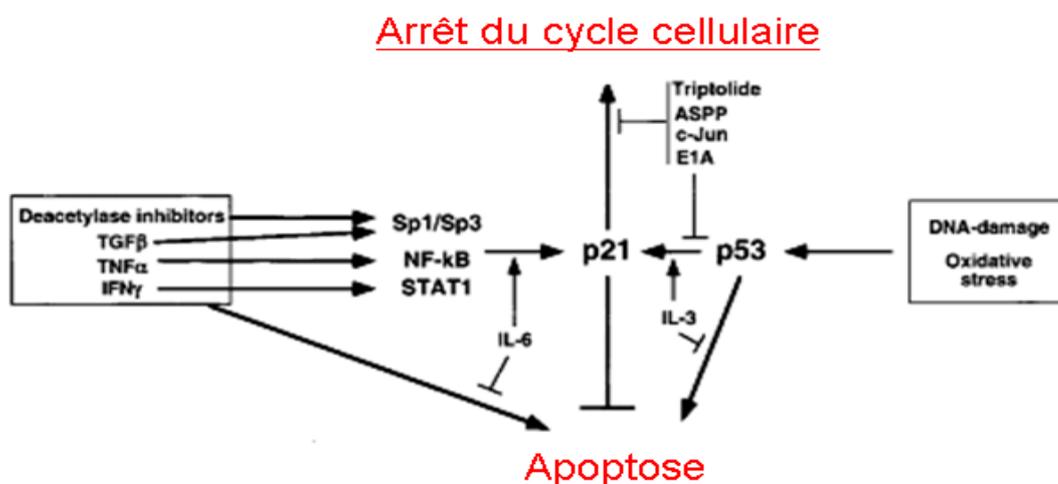


Figure 63 : Schéma représentant les différentes activations possibles de la protéine p21. La p21 joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et peut inhiber l'apoptose (image tirée d'une revue de 2002) (Gartel, A.L. et Tyner, A.L. 2002).

L'ensemble de ces résultats ainsi que la présence de la spectrine dans le noyau suggèrent que la spectrine α II pourrait jouer un rôle direct dans la prolifération des cellules via le cycle cellulaire.

V.3 La présence de la spectrine α II dans le noyau

Nous montrons que la spectrine α II est présente dans le noyau des cellules WM-266. Le traitement des cellules par les SiARN dirigés contre la spectrine α II affecte, mais dans une moindre mesure, la spectrine présente dans le noyau avec une déplétion de l'ordre de 50% quand elle est de 70% dans le cytoplasme. Cette déplétion modérée de la spectrine α II nucléaire pourrait être impliquée de l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (ou du retard) mais le mécanisme reste encore à déterminer.

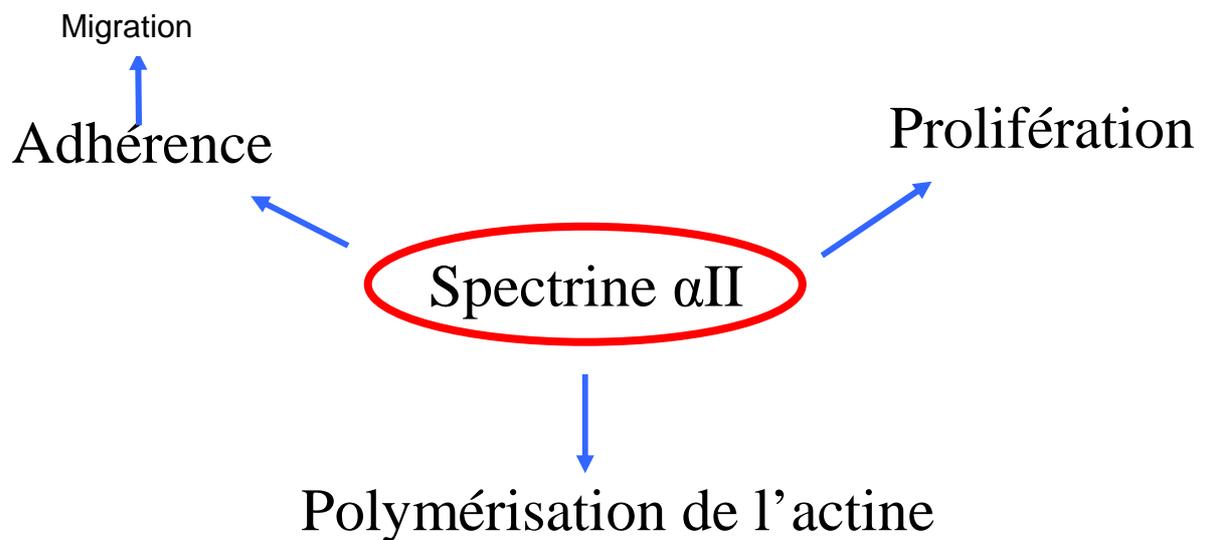
Déjà en 2001, il a été décrit des interactions entre la spectrine β et des protéines nucléaires pour deux isoformes de la spectrine β IV ($\Sigma 1$ et $\Sigma 5$) (Tse, W.T., Tang, J. *et al.* 2001). L'auteur et ses collaborateurs suggèrent un rôle de regroupement et d'organisation de protéines nucléaires (facteurs de transcription, facteurs d'épissage des ARNs, protéines impliquées dans la réparation de l'ADN) des spectrines β IV nucléaires. Pour la spectrine α , il a été montré que cinq types de protéines nucléaires possèdent des liens avec une spectrine α II Σ^* (* correspond à une isoforme de spectrine α II non caractérisée) (McMahon, L.W., Walsh, C.E. *et al.* 1999) (McMahon, L.W., Sangerman, J. *et al.* 2001 ; Sridharan, D.M., McMahon, L.W. *et al.* 2006). Ces interactions révélées par co-immunoprécipitation dans des cellules humaines normales, montrent que la spectrine α II interagit dans le noyau :

- avec des protéines de structures comme la protéine 4.1B, l'émerine, ou l'actine
- avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN : les protéines XPF et ERCC1 du système de réparation NER (nucleotide excision repair) ou les protéines RAD50, RAD51 du système HRR (homologous recombinational repair) et NHEJ (non-homologous end-joining) comme
- avec des protéines remodelant la chromatine comme BRG1 et hBRM
- avec les protéines Fanconi Anemia (FA) dont le rôle n'est pas très clairement (protéines retrouvées en association avec la chromatine après un dommage de l'ADN) mais l'association avec la spectrine pourrait être importante pour la stabilité des protéines FA
- avec des protéines qui jouent un rôle dans la transcription et le développement des ARNs comme p40, ou hnRNP A2/B1 (rôle dans la biogenèse et le transport des ARN messagers).

Toutes ces interactions avec des protéines ayant des fonctions différentes suggèrent que la spectrine α II pourrait avoir des fonctions multiples et importantes.

VI Effet direct ou secondaire de la spectrine α II sur la polymérisation de l'actine la prolifération et l'adhérence

IV.1 La spectrine α II a un rôle direct sur les différents processus cellulaires

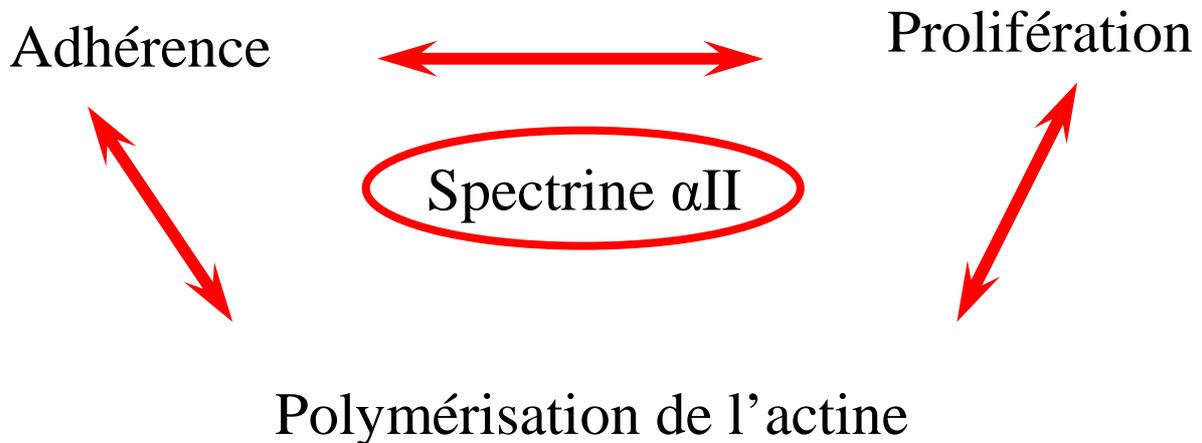


La spectrine est présente dans le noyau, elle est présente dans des structures d'adhérence, et elle lie le réseau d'actine. Ces données décrites précédemment sont en faveur d'un rôle direct de la spectrine α II dans les processus cellulaires comme la prolifération, l'adhérence, ou la polymérisation de l'actine.

Cependant tous ces processus sont étroitement liés. La difficulté dans l'analyse de ces résultats est de déterminer quel processus pourrait intervenir en premier.

VI.2 Un lien étroit entre les processus cellulaires observés

Migration et étalement



VI.2.1 La prolifération et le réseau d'actine

Une désorganisation du cytosquelette d'actine par utilisation de drogues inhibant la polymérisation de l'actine (comme la cytochalasine D) provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase S avec une baisse de l'expression de la cycline D1, une augmentation de l'inhibiteur CDKI p27, ainsi qu'une hypo-phosphorylation de la protéine Rb (Huang, S., Chen, C.S. *et al.* 1998). Des travaux montrent aussi que l'actine régule le cycle cellulaire et la cytokinèse par son rôle dans l'architecture de la cellule et une implication dans la transduction des signaux produits par des molécules extérieures à la cellule (facteurs de croissance, matrice extracellulaire) (Boonstra, J. et Moes, M.J. 2005).

L'arrêt du cycle cellulaire observé dans les cellules déplétées en spectrine pourrait être du   la désorganisation du réseau d'actine.

VI.2.2 L'adhérence et le réseau d'actine

Les modifications du réseau d'actine, (les pertes des fibres de stress) dans les cellules déplétées en spectrine α II jouent un rôle dans l'adhérence cellulaire. Les intégrines, présentes à la membrane même en quantité supérieure à la normale, sont délocalisées. Elles semblent non fonctionnelles car nous montrons une perte d'adhérence des cellules.

Cette perte de fonction des intégrines peut être due à une mauvaise organisation structurale (formation des points focaux) par la diminution de la spectrine α II ou par le déficit des fibres de stress via la diminution de la spectrine α II.

On sait que la spectrine α II joue un rôle dans la formation des points focaux (Bialkowska, K., Saido, T.C. *et al.* 2005) et que les intégrines pour être fonctionnelles sont regroupées en cluster (points focaux). Par interaction avec leur ligand, elles peuvent aussi activer plusieurs complexes protéiques via la protéine FAK (focal adhesion kinase) afin d'allumer différentes voies de signalisation, comme la voie Erk, JNK ou PI3-kinase (figure 64 en page 157). Par exemple des travaux montrent qu'une protéine critique Rac, protéine de la famille Rho GTPase dont la fonction est d'initier la polymérisation de l'actine, est activée par des signaux provenant des intégrines, de plus Rac joue des rôles en aval dans les processus d'étalement, de migration, de progression du cycle cellulaire (Bialkowska, K., Saido, T.C. *et al.* 2005). Des travaux montrent également que l'inhibition de l'assemblage des points focaux par le blocage fonctionnel des intégrines grâce à des anticorps spécifiques, provoque un défaut dans la formation des fibres de stress (Burrige, K. et Chrzanowska-Wodnicka, M. 1996) (Miyamoto, S., Teramoto, H. *et al.* 1995). Tous ces résultats semblent montrer que l'adhérence serait un processus important dans les fonctions de la spectrine α II.

Mais il s'avère que des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine entraîne la destruction des points focaux (Goldmann, W.H., Schindl, M. *et al.* 1995; Machesky, L.M. et Hall, A. 1997), cela souligne le lien étroit entre l'adhérence et la polymérisation de l'actine et relève la difficulté de trancher sur la question de savoir quel processus régit les autres, sachant qu'il existe aussi des liens entre l'adhérence et la prolifération des cellules.

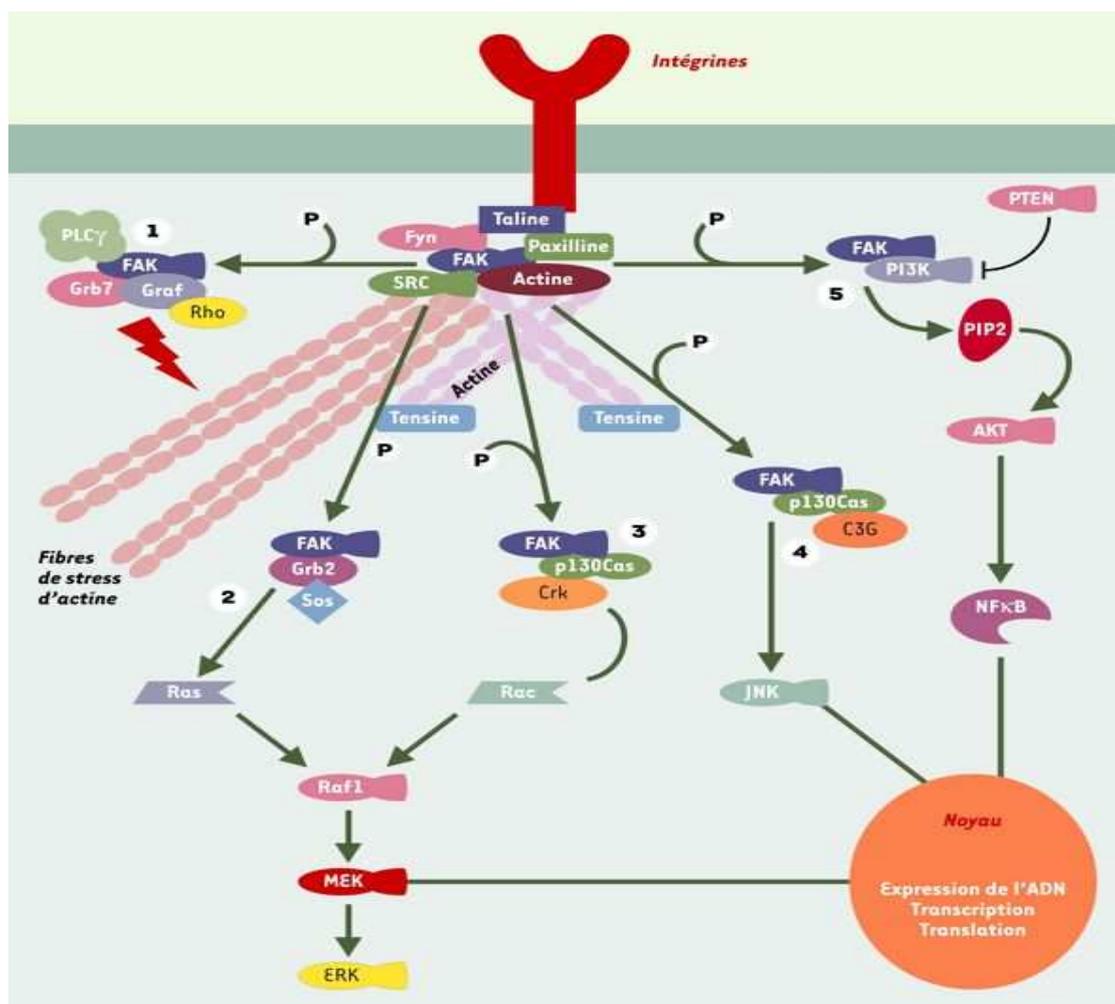


Figure 64 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation de l'adhérence focale. Ce schéma montre des interactions entre les protéines du complexe d'adhérence et les voies de signalisation qu'il engendre. FAK activée, par les intégrines et/ou les facteurs de croissance, va permettre l'activation de plusieurs complexes de protéines : (1) (2) (3) (4) (5). Le complexe (1) a la fonction de régulation et de remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec pour chaque étape une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence. Les complexes (2) et (3) participent à l'activation de la voie de Erk, le complexe (4) active la voie de JNK (4) et le (5) la voie de la PI3-kinase. (Image obtenue sur internet à l'adresse suivante : [www.erudit.org / revue / ms / 2003 / v19 / n6-7 / 006837ar.html](http://www.erudit.org/revue/ms/2003/v19/n6-7/006837ar.html)).

VI.2.3 L'adhérence et la prolifération

La prolifération cellulaire se fait grâce à l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par des mitogènes solubles se trouvant à la surface des cellules. Il est maintenant clair que dans un bon nombre de type cellulaire, l'adhérence à la matrice extracellulaire est essentielle pour la progression dans le cycle cellulaire. On sait que les cellules adhérentes, lorsqu'elles se détachent de leur matrice extracellulaire, meurent par un processus spécifique que l'on appelle mort programmée ou apoptose par le phénomène d'anoïkis (Frisch, S.M. et Ruoslahti, E. 1997; Frisch, S.M. et Screaton, R.A. 2001). Ce phénomène est mis en place pour éviter que les cellules « normales » prolifèrent, et se disséminent. Par contre les cellules transformées « tumorales » comme les WM-266 que l'on utilise dans nos travaux, elles, survivent au détachement, échappent à l'apoptose, pouvant ainsi aller coloniser d'autres sites dans l'organisme.

Des signaux extracellulaires de l'adhérence provenant de différentes protéines comme des intégrines, des cadhérines, peuvent réguler la progression du cycle cellulaire via les récepteurs aux facteurs de croissance (Pugacheva, E.N., Roegiers, F. *et al.* 2006). Ces récepteurs sont présents dans les structures d'adhérence et pourraient être régulés par les intégrines. L'intégrine $\alpha\beta3$ peut activer les récepteurs aux IGF-1, PDGF, VEGF en l'absence de ces facteurs de croissance et induire l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire, lorsque les cellules adhèrent sur la vitronectine (ligand de l'intégrine $\alpha\beta3$). Au contraire quand les cellules sont cultivées sur une matrice de collagène, aucune activation des récepteurs n'est observée (Walker, J.L., Fournier, A.K. *et al.* 2005). Dans les cellules épithéliales, Moro et ses collaborateurs démontrent que le récepteur à l'EGF peut s'associer à l'intégrine $\beta1$ et que l'activité kinase intrinsèque du récepteur est activé par l'adhérence de l'intégrine et ceci même en l'absence de l'EGF. Cette activation du récepteur indépendante du ligand fait progresser le cycle cellulaire vers la phase G2/M (sans sérum ni EGF) (Moro, L., Dolce, L. *et al.* 2002).

La perte d'adhérence et la modification de la localisation des intégrines observées dans les cellules déplétées en spectrine pourrait modifier la localisation et l'activation

des récepteurs mais aussi moduler des facteurs responsables de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (figure 64 en page 157).

L'adhérence via les intégrines peut modifier l'expression de protéine nécessaires à la progression du cycle cellulaire, comme la baisse des CDKI (p21 et p27) (Bottazzi, M.E. et Assoian, R.K. 1997 ; Huang, S., Chen, C.S. *et al.* 1998).

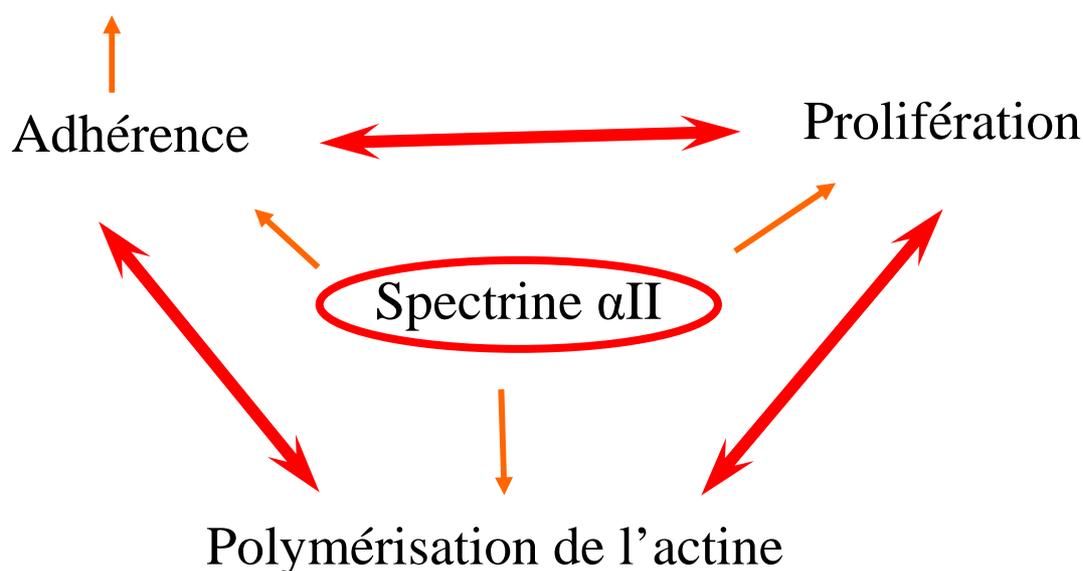
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Par la transfection de SiARN dirigées contre la spectrine α II, nous avons pu diminuer l'expression de cette protéine dans des cellules de mélanome humain WM-266, et observer l'implication de la spectrine α II.

Ces travaux démontrent de nouvelles implications de la spectrine α II, jamais montrées auparavant, dans des processus cellulaires. La spectrine ne joue pas seulement un rôle structural, elle est impliquée aussi dans la réorganisation du réseau d'actine, dans l'adhérence ainsi que dans le cycle cellulaire.

Il s'avère que la fonction précise de la spectrine dans tous ces processus n'est pas très claire et reste encore à être étudiée ce qui ouvre beaucoup des voies de recherche à explorer, plus en détail, afin de comprendre les phénomènes moléculaires qui relient la spectrine aux différents processus cellulaires mis en défaut.

Migration et Etalement



Afin d'éclaircir les voies de signalisation impliquant la spectrine α II dans ces processus cellulaires mis en défaut lorsque la spectrine α II est déplétée, on pourrait imaginer deux approches possibles. La première approche serait de relier la spectrine α II au processus cellulaire, la seconde serait de faire l'inverse, étudier le processus cellulaire afin de le raccorder à la spectrine α II.

I Travaux sur la spectrine α II et son environnement direct afin d'expliquer les phénotypes

I.1 Etude de l'expression et de la localisation des partenaires directs de la spectrine

La première partie serait de s'intéresser à toutes les protéines connues interagissant directement avec la spectrine α II et celles, récemment identifiées par des cribles de double hybride effectués par notre équipe et ayant un rôle dans les processus mis en défaut, en absence de spectrine α II :

Nous souhaitons étudier leur expression et leurs localisations dans la cellule lorsque la spectrine α II endogène est très diminuée.

Par exemple on pourrait étudier les protéines faisant partie des macro-complexes spectrine-actine : adducine, vimentine, 4.1 ou les protéines interagissant avec le domaine SH3 : EVL, N-WASP.

I.2 Etude des domaines de la spectrine α II

Dans une seconde partie, on peut cibler le(s) rôle(s) spécifique(s) des domaines de la spectrine α II dans les phénotypes obtenus, pour cela deux approches sont possibles :

-La première serait d'utiliser des dominants négatifs. De faire surexprimer à la cellule le domaine étudié (soit sauvage, soit muté) pour qu'il rentre en compétition avec le domaine de la spectrine entière. Cette approche a déjà été utilisée dans l'étude des interactions du domaine SH3 et EVL, ou N-WASP.

-La seconde serait l'utilisation de la technique de SiARN en plasmide inducible. On pourrait dépléter la spectrine α II endogène puis effectuer dans un premier temps, une correction des phénotypes en produisant une spectrine α II exogène dont l'ARN messager ne soit pas la cible du SiARN que l'on a utilisé. Puis dans un second temps au lieu de produire dans la cellule une spectrine α II exogène entière, on pourrait introduire une spectrine α II exogène tronquée d'un domaine de la spectrine ou mutée

afin que la spectrine α II n'interagisse pas avec une/des protéine(s) spécifique(s). Si cette spectrine exogène mutante ne permet pas de corriger le(s) phénotype(s) mis en défaut pas la diminution de la spectrine α II endogène alors on pourra conclure que le domaine est impliqué dans le(s) phénotype(s). Par exemple on pourrait étudier le rôle du domaine SH3 par délétion de ce domaine dans la spectrine exogène néo-synthétisée. Une étude bioinformatique pourra nous donner d'éventuels changements structuraux de la spectrine α II lorsque celle-ci est tronquée de son domaine SH3. Une autre possibilité d'étude de ce domaine peut se faire par une mutation ponctuelle car il a été montré qu'une mutation dans ce domaine (substitution de la proline 1017 en leucine) provoquait une perte d'interaction des protéines interagissant avec ce domaine et impliquées dans la dynamique du réseau d'actine (EVL, N WASP) (HDR de Gaël NICOLAS). Ces études de déplétion transitoire de la spectrine α II avec une néo-synthèse d'une spectrine α II modifiée peuvent être mises en parallèle avec l'élaboration de souris transgéniques.

II Etudes des processus cellulaires pour expliquer l'implication de la spectrine α II

On pourrait étudier la désorganisation du réseau d'actine, la perte d'adhérence, et l'arrêt du cycle cellulaire plus en détail.

II.1 Etude de la polymérisation de l'actine

On peut étudier le rôle de la spectrine α II dans la formation des structures d'actine. Une étude sur la polymérisation de l'actine par vidéomicroscopie sur des cellules déplétées en spectrine est en cours. Ces travaux sur la polymérisation de l'actine se fait grâce à la co-transfection d'un plasmide exprimant de l'actine marquée par la GFP avec les SiARN dirigées contre la spectrine α II.

II.2 Etude de l'adhérence

L'étude de l'adhérence peut se faire par la détermination des interactions (directe ou indirecte via l'ankyrine) entre spectrine α II et les Ig-CAM ou les intégrines grâce à des expériences de co-immunoprécipitation.

Pour étudier l'implication de la spectrine α II dans le dynamisme des intégrines à la surface de la cellule, on pourrait étudier le temps de demi-vie de ces protéines responsables de l'adhérence, par biotinylation à la surface de cellules déplétées en spectrine.

II.3 Etude de la prolifération cellulaire

L'étude sur le cycle cellulaire peut se faire par la détermination d'interaction entre la spectrine α II et des protéines nécessaires à la division cellulaire par co-immunoprécipitations et par des études de localisation de ces protéines dans le noyau.

II.4 Etude d'autres processus cellulaires

D'autres études peuvent être faites pour étudier l'implication de la spectrine α II dans la polarisation ou le trafic cellulaire de protéines vers la membrane.

-On pourrait étudier l'implication de la spectrine α II dans le processus de polarisation (dans l'établissement et le maintien de la polarisation) par l'observation de la polarité de cellules sauvages ou déplétées en spectrine α II.

-Pour l'étude du trafic cellulaire; la présence de la spectrine α II et la composition du dimère de spectrine (savoir quelle(s) spectrine(s) β est (sont) présente(s)) pourraient être analysées dans les différents compartiments du transport de protéines (le réticulum endoplasmique, le golgi, les vésicules de transport vers la membrane) par microscopie ou fractionnement cellulaire. Dans un second temps, l'implication de la spectrine α II dans le trafic intracellulaire pourrait être étudiée par le suivi de protéines exogènes marquées et néosynthétisées en vidéomicroscopie ainsi que par fractionnement cellulaire dans des cellules sauvages et déplétées.

Tables des figures et des tableaux

Table des figures

- Figure 1: Image du réseau membranaire de spectrine obtenue en microscopie électronique (A). Représentation schématique de ce réseau (B) (d'après (Liu, S.C., Derick, L.H. et al. 1987)). Les nœuds du réseau correspondent aux liens entre la spectrine et l'actine. 14*
- Figure 2: Schéma du squelette membranaire dépendant de la spectrine dans le globule rouge (image tirée de la revue de Xiuli An et Narla Mohandas (2008))..... 15*
- Figure 3: Description des nœuds du réseau de spectrine dans le globule rouge 15*
- Figure 4: Représentation de 2 sous-unités répétitives constituées des hélices α A, B, C de la première sous-unité et des hélices A bis, B bis, C bis de la seconde sous-unité (image tirée de la revue de Van Bennett et Anthony Baines (2001))..... 21*
- Figure 5: Représentation des alignements de séquences des différentes unités répétitives de la spectrine α II Σ I. L'unité répétitive α 1 commence à l'hélice A jusqu'à la fin de l'hélice C, puis vient l'unité répétitive α 2. Seuls la leucine 26 dans l'hélice C et le tryptophane 45 dans l'hélice A présentent une forte conservation. Les séquences représentées au dessus des flèches noires représentent les insertions de 8 acides aminés qui sont impliqués dans la formation du dimère de spectrine $\alpha\beta$. Alignement obtenu dans la thèse de Gaël NICOLAS, 199 tiré de l'article suivant (Sahr, K.E., Laurila, P. et al. 1990)..... 22*
- Figure 6: Représentation des différents sites et domaines de la spectrine α II/ β II (image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)). 24*
- Figure 7: Représentation de quelques protéines interagissant avec le dimère de spectrine α II/ β II (image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000) et complétée par les résultats acquis au laboratoire. 27*
- Figure 8: Représentation en 3 dimensions du domaine PH qui interagit directement à la membrane plasmique (image tirée de la revue de Van Bennett et Anthony Baines (2001))..... 29*
- Figure 9: Représentation du domaine EF hand de la spectrine (MOLSCRIPT), sans calcium lié (A) ou avec le calcium (B) (image tirée de l'article de G.Travé (Trave, G., Lacombe, P.J. et al. 1995). ... 30*
- Figure 10: Représentation du domaine SH3 (image tirée de la revue de Van Bennett et Anthony Baines (2001)). 31*
- Figure 11: Représentation des deux principales isoformes de la spectrine α II, la spectrine α II Σ I présente une insertion de 20 résidus, localisée dans l'hélice C de l'unité répétitive 9, tandis que cette*

boucle est épissée dans l'isoforme du dessous α II Σ 2. Image tirée de la thèse de Gaël NICOLAS, 1999.	33
Figure 12: Représentation de la spectrine α I exprimée dans le globule rouge qui ne possède pas la boucle CCC et de la spectrine α II avec cette boucle sensible aux protéases (calpaines et caspases). Image tirée de la thèse de Gaël NICOLAS de 1999.....	34
Figure 13 : Représentation de la partie centrale de la spectrine α II à savoir le domaine SH3, et les unités répétitives 9 et 10 dans lesquelles se trouvent la boucle α II Σ 1 et la boucle CCC. Dans la boucle CCC sont représentés par des points rouges les deux sites de coupures des protéases calpaïne et caspase 3. Image tirée de la thèse de Bjorn ROTTER de 2004.....	35
Figure 14: Représentation du rôle du squelette membranaire dans la forme de la membrane. (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).....	46
Figure 15: Représentation des deux concepts de Sako et Kusumi expliquant le rôle du squelette membranaire dans la diffusion des protéines de membrane. A : le modèle de lien « tether » avec la spectrine. B: le modèle de clôture sous membranaire (image tirée de l'article de Sako et Kusumi de 1995 (Sako, Y. et Kusumi, A. 1995))......	47
Figure 16 : Le modèle de mosaïque montre l'aspect dynamique de la spectrine sur les protéines membranaires. Le rôle du squelette de spectrine est d'organiser la bicouche lipidique et de contrôler la diffusion des protéines membranaires. Ce modèle souligne la flexibilité du réseau de spectrine. (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).....	48
Figure 17 : Représentation du rôle de la spectrine comme accumulateur de protéines. Le premier contact entre les cellules est établi par des molécules d'adhérence (b), les complexes vont recruter l'ankyrine qui ensuite liera les tétramères de spectrine (c) ; Ce complexe stabilisera la membrane latérale, permettant le recrutement et la stabilisation à la membrane de la Na/K/ATPase (d). (Image tirée de l'article de Jennifer C. Pinder et Anthony J. Baines dans Nature (Pinder, J.C. et Baines, A.J. 2000)).....	56
Figure 18: Représentation du modèle du squelette de la spectrine dans l'appareil de golgi proposé par De Matteis et Morrow (2000). ER réticulum endoplasmique, CVT cluster de vésicules tubulaires, MP membrane plasmique. (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).....	57
Figure 19: Le modèle SAATS (spectrin ankyrin adapter protein tethering system) pourrait lier et regrouper des vésicules du réticulum endoplasmique (RE) pour effectuer le transport de plusieurs vésicules via les protéines dynéine et dynactine le long des microtubules jusqu'au cis golgi (1,3). Alternativement, SAATS pourrait aussi être un système interne du RE (2). Les vésicules des compartiments intermédiaires qui ne sont pas capturées par le SAATS pourraient retourner au RE. En ce qui concerne le trans-golgi (TGN) et après (4), la spectrine liée à certaines protéines pourrait jouer le rôle de triage des protéines afin de donner le bon chemin, l'adressage des protéines vers la membrane plasmique (MP). (Image tirée de l'article de M.A De Matteis, Jon .S Morrow (2000)).	60

Figure 20: Schéma du principe de diminution de l'expression protéique par l'emploi de SiARN (image tirée du web à l'adresse suivante www.ohsu.edu/research/core/images/SiARN_MWG-biotech.gif). Les SiARN transfectés dans les cellules à l'état de double brin (dsRNA) sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique nommé RISC (RNA induce silencing complex). Ce complexe activé par libération du brin complémentaire de l'ARN, va reconnaître l'ARN messagers spécifique, son transcrite cible. Une fois la cible liée, la protéine Ago endonucléase, faisant partie du complexe RISC, va couper le transcrite au niveau du site de reconnaissance. Les deux morceaux du transcrite clivé par Ago vont être rapidement dégradés via leurs extrémités par des exonucléases. La transfection de SiARN dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARN messagers ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers. 71

Figure 21 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire (image tirée du web à l'adresse suivante: www.lifespan.org/reslab/flow2final.jpg). Ce spectre du cycle cellulaire montre en ordonnée le nombre de cellules et en abscisse la fluorescence de l'iodure de propidium (marqueur de l'ADN). Les cellules possédant une quantité N d'ADN (X intensité de fluorescence) correspondent à des cellules en phases G0/G1 du cycle cellulaire ; les cellules avec une quantité 2N d'ADN (2X intensité de fluorescence) sont celles en phases G2/M. Les cellules possédant moins de N quantité d'ADN (moins de X intensité de fluorescence) sont des cellules en apoptose ou Sub-G1. 79

Figure 22: Les différentes phases durant le processus de mort cellulaire. Les conséquences des stimuli apoptotiques provenant de différents inducteurs (différentes voies d'induction) peuvent être suivies séquentiellement dans le temps. Des phénomènes apoptotiques précoces constituent la phase de décision mitochondriale dans lequel les membranes mitochondriales sont très perméables, libérant ainsi les sIMPS (soluble intermembran mitochondrial proteins) puis survient une phase, plus tardivement, la phase de dégradation post-mitochondriale au sein duquel les cellules subissent des modifications morphologiques avec des altérations de la membrane, du cytoplasme et du noyau. La cellule se fragmente en corps apoptotiques. 80

Figure 23: Méthode pour mesurer la fragmentation de l'ADN (Image tirée du protocole du kit APO-BRDU™), TdT : enzyme déoxynucleotidyl transferase, Br-dUTP : desoxythymidine 5 bromo2 desoxyuridine 5 triphosphate. 81

Figure 24 : Structure moléculaire du DiOC 6 (image tirée d'une page web dont l'adresse est la suivante : www.gla.ac.uk/centres/cellengineering/Teaching-at-CCE/Teaching-MCB-G3/Fluo_Labs_Support.htm). 83

Figure 25 : Schéma montrant le principe de mesure de la migration cellulaire Image tirée de l'internet à l'adresse suivante : www.biocat.de/bc/pdf/migration%20fluorometric.pdf. 86

Figure 26 : Schéma montrant l'utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux (image tirée d'Annales de Biologie Clinique. Volume 58, Numéro 3, 337-43, Mai - Juin 2000, De mémoire d'interne). 89

Figure 27 : Localisation par fluorescence, sur le modèle cellulaire WM-266, de la spectrine α II (anticorps polyclonaux dirigé contre le SH3 de la spectrine α II, Alexa 488 en vert), de l'actine F (marquage par la phalloïdine couplé à l'Alexa 568 (en rouge) et du noyau par un marquage de l'ADN (marquage DAPI en bleu). 92

Figure 28 : Analyse par Western blot de l'efficacité des SiARN dirigés contre la spectrine α II : 48 h après la transfection avec l'agent de transfection JetSI-endo, les lysats des cellules WM-266 ont été analysés en Western blot et révélés par un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine SH3 de la spectrine α II. Le premier puits correspond à des cellules WM-266 non transfectées (contrôle), puis les cellules traitées avec l'agent de transfection seul (Agt), les puits suivants correspondent aux lysats des cellules transfectées avec le pool des 4 SiARN, puis les cellules transfectées avec chacun des SiARN 1, 2, 3, 4 et le dernier puits correspond aux lysats des cellules transfectées avec le SiARN non relevant (NR). La concentration des SiARN était de 50 nM. La quantité des protéines totales déposée est de 10 μ g. 95

Figure 29 : Efficacité des SiARN ciblant la spectrine α II en fonction du temps et de leur concentration ; Western-blot des lysats réalisés à partir de cellules transfectées avec les SiARN NR, 1, et 2, à 25 et 50 nM, 48, 72 et 96 h après la transfection, révélés par un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine SH3 et un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la lamine A/C qui constitue un contrôle de la charge protéique de chaque puits..... 96

Figure 30 : Détection du taux de spectrine α II en cytométrie en flux après fixation et perméabilisation des cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul (gris) soit avec les SiARN non relevant NR (orange), SiARN 1 (violet) et SiARN 2 (rose) à 25 et 50 nM et à des temps différents après la transfection 48, 72 et 96 h..... 99

Figure 31 : Analyse de la taille relative des cellules déplétées en spectrine α II par cytométrie en flux. Rapport entre la taille des cellules et le taux de spectrine α II dans les cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul soit avec les SiARN NR, 1 et 2 à 30 nM après 72 et 96 h de la transfection. La région R1 a été définie sur les cellules traitées avec l'agent de transfection et correspond aux cellules qui possèdent un taux de spectrine (indice de fluorescence entre 1900 à 2100 UA, unité arbitraire) et une taille supérieure à 100 UA (unité arbitraire). La région R2 correspond à une population qui possède un taux de spectrine α II très diminué et une taille beaucoup plus petite par rapport à la région R1. 101

Figure 32 : Détection de la spectrine α II et de l'actine F dans des cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR à 25 nM et les SiARN dirigés contre la spectrine à 15 nM et 25 nM. Les marquages sont faits sur les cellules, 72 h après la transfection..... 103

Figure 33: Etude de la prolifération des cellules traitées par l'agent de transfection AGT, par le SiARN non relevant NR (30 nM) et par les SiARN 1 et 2 dirigés contre la spectrine (30 nM) à 24 h, 48 h, 72 h, 96 h après la transfection. Ces résultats correspondent à deux transfactions différentes dans lequel on effectue trois points pour chaque condition. L'étoile correspond à une différence significative du nombre de cellules traitées avec le SiARN 1 ou 2 en comparaison avec le nombre de cellules traitées avec les SiARN non relevant (NR) à 72 h et 96 h. 105

- Figure 34: Pourcentage du nombre de cellules totales vivantes comptées sur les échantillons traités avec l'agent de transfection seul, avec le SiARN non relevant NR (30 nM) ou avec les SiARN 1 et 2 (30 nM) à 72 h et 96 h..... 106
- Figure 35 : Etude de la fragmentation de l'ADN par marquage des brins 3'OH sur des cellules traitées soit par le SiARN non relevant NR (30 nM) soit par les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II..... 107
- Figure 36: Effet TUNEL sur des cellules témoins. L'histogramme de gauche montre des cellules contrôles négatives et celui de droite des cellules en apoptose. (Image tirée du protocole du kit APO-BRDU™)..... 108
- Figure 37 : Etude du potentiel de membrane mitochondriale par cytométrie en flux. Les cellules traitées avec le SiARN non relevant (30 nM) et les SiARN 1 et 2 (30 nM) sont marquées avec le DioC6 et l'iodure de propidium. Cette analyse montre trois types de cellules : pour la région R1, les cellules (en rouge) représentent les cellules nécrosées, positives à l'iodure de propidium, les régions R2 et R3 correspondent aux cellules négatives à l'iodure de propidium, la région R2 correspondant aux cellules apoptotiques (en orange) faiblement marquées au DioC6, et la région R3, représentant les cellules vivantes (en vert) fortement marquées au DioC6..... 110
- Figure 38 : Etude du cycle cellulaire par marquage de l'ADN à l'iodure de propidium de cellules WM-266 fixées et perméabilisées. Nous avons la courbe en grisé plein les cellules transfectées avec le SiARN non relevant NR (30 nM), les courbes rouge et bleue respectivement sont les cellules traitées par les SiARN 1 et 2 (30 nM). Cette étude a été réalisée sur des cellules à 72 h et 96 h après la transfection. 113
- Figure 39 : Régulation de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome, Rb par le complexe cyclineD/cdk4 dans la phase G1. Image obtenue sur internet à l'adresse www.med.univ-angers.fr. 114
- Figure 40 : Rôle de la protéine Rb sur la transcription des gènes pour l'entrée en phase S image obtenue sur internet à l'adresse suivante www.snv.jussieu.fr/vie/dossiersBM/cyclecellVIE/images/CDK4-D-action-img.gif..... 114
- Figure 41: Etat de phosphorylation la protéine Rb dans différentes phases du cycle cellulaire reconnu par l'anticorps que l'on a utilisé dans le western blot de la figure 40. Q : quiescence ; G1, S, M : respectivement les phases G1, S et M du cycle cellulaire ; Image obtenue par internet à l'adresse suivante www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/14001A_554136.pdf. 115
- Figure 42: Détection du niveau de phosphorylation de la protéine Rb en western blot, sur des cellules traitées avec l'agent de transfection seul AGT, traitées avec le SiARN non relevant NR (30 nM) et les SiARN 1 et 2 (30 nM) à 48 h, 72 h et 96 h de la transfection. La protéine Rb est détectée grâce à un anticorps qui reconnaît toutes les formes phosphorylées de cette protéine comme le montre la figure 42. 115

Figure 43 : Détection par western blot de la protéine p21 dans des lysats de cellules traitées avec l'agent de transfection AGT, SiARN non relevant NR (30 nM), ou les SiARN 1 et 2 (30 nM) dirigés contre la spectrine α II. Ces lysats ont été obtenus 72 h après la transfection. 117

Figure 44 : Quantification du western blot les lysats de cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul AGT (rouge) soit avec les SiARN non relevant NR (orange), 1 (jaune) et 2 (beige) à 30 nM, 72 h après la transfection..... 117

Figure 45 : Détection par western blot de la protéine p21 dans des lysats de cellules traitées avec SiARN non relevant NR (30 nM), et le pool de SiARN (30 nM) dirigé contre la protéine p21. Ces lysats ont été obtenus à 48 h et 72 h après la transfection. La lamine A/C constitue un contrôle de la charge protéique pour chaque puits..... 118

Figure 46 : Etude de la prolifération des cellules WM-266 traitées par le SiARN non relevant NR (30 nM) et par le pool de SiARN dirigé contre la protéine p21 (30 nM) à 48 h, 72 h, 96 h après la transfection. Ces résultats correspondent à deux transfections différentes dans lesquelles trois points ont été effectués pour chaque condition..... 118

Figure 47 : Détection de la spectrine α II en western blot dans des extraits cytoplasmiques et nucléaires de cellules traitées avec l'agent de transfection AGT, ou les SiARN NR, 1 et 2 à 30 nM. L'intégrine β 3, protéine membranaire, Erk1/2 protéine cytoplasmique, et la lamine A/C protéine nucléaire sont utilisées pour contrôler d'éventuelles contaminations entre les 2 fractions..... 120

Figure 48 : Pourcentage du taux de spectrine α II présente dans les différentes fractions cellulaires 121

Figure 49 : Détection de la fluorescence des cellules marquées à la calcéïne en vert (cellules traitées soit avec l'agent de transfection seul, soit avec le SiARN non relevant NR, soit avec les SiARN 1 et 2, à 30 nM 72 h après la transfection), et des cellules témoins marquées au Hoechst 33342 en bleu, 2 h après leur dépôt. 123

Figure 50 : Etude de l'adhérence statique des cellules traitées avec l'agent de transfection seul (100%), et des cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR (30 nM) en orange, le SiARN 1 (30 nM) en jaune, et le SiARN 2 (30 nM) en beige. Cette expérience a été faite sur des cellules 72 h après la transfection..... 124

Figure 51 : Détection des cellules marquées à la calcéïne (cellules transfectées soit avec l'agent de transfection seul, soit avec les SiARN non relevant NR, 1 et 2 à 30 nM après 72 h de la transfection) pour visualiser leur étalement après 4 h d'incubation. 125

Figure 52 : Etude de l'étalement des cellules traitées avec l'agent transfection seul correspond à 100%, et sur des cellules transfectées avec les SiARN non relevant NR (30 nM) en orange, le SiARN 1

(30 nM) en jaune, et le SiARN 2 (30 nM) en beige. Cette expérience a été faite sur des cellules à 72 h de la transfection. 125

Figure 53 : Graphique des cellules migrantes par rapport au nombre de cellules déposées sur la membrane, ces expériences ont été faites pour déterminer le nombre de cellules à déposer sur la membrane pour avoir le maximum de cellules migrantes. 126

Figure 54 : Quantification de la migration des cellules traitées avec l'agent de transfection seul correspond à 100 %, et sur des cellules transfectées avec les SiARN non relevant (30 nM) NR en orange, le SiARN 1 (30 nM) en jaune, et le SiARN 2 (30 nM) en beige. Cette expérience a été faite sur des cellules à 72 h de la transfection. 127

Figure 55 : Quantification de l'expression de certaines intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ à la surface des cellules traitées soit avec l'agent de transfection AGT soit avec les SiARN non relevant NR, 1 et 2 à 30 nM après 72h de la transfection par cytométrie en flux. 130

Figure 56 : Détection de l'intégrine $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ en western blot sur des lysats de cellules transfectées avec soit le SiARN NR, 1 et 2 à 30 nM après 72 h de la transfection. La lamine A/C est utilisé pour standardiser les différentes pistes. 131

Figure 57 : Analyse par microscopie en épi-fluorescence de la présence des anticorps bloquant dirigés contre. les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha V\beta 3$. Détection sur les cellules non adhérentes marquées à la calcéïne (en vert) de la présence des anticorps bloquant (en rouge) par un marquage secondaire avec un Alexa 568. 132

Figure 58 : Quantification de l'adhérence des cellules traitées avec des anticorps bloquants les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha V\beta 3$ 133

Figure 59: Localisation de l'intégrine $\alpha 5$ sur des cellules transfectées avec le SiARN NR et les SiARN dirigés contre la spectrine αII à 30nM 72h après la transfection. 134

Figure 60: Localisation de l'actine, de la paxilline, et de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ sur des cellules transfectées soit avec les SiARN NR à 30 nM ou soit avec les SiARN dirigés contre la spectrine αII à 30 nM après 72h de la transfection. 135

Figure 61 : Différents complexes cycline/Cdk interviennent dans la progression du cycle cellulaire. (Image obtenue sur internet à l'adresse www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/02CDK.htm). 150

Figure 62: Représentation des différentes protéines régulant le cycle cellulaire. Les protéines (sur fond rouge) montrent les molécules inhibitrices (une kinase Wee1, des CDKI comme p21, p16) et celles sur fond vert correspondes aux protéines activatrices (la phosphatase Cdc25 et la kinase CAK).

(Image obtenue sur internet à l'adresse [www.snv.jussieu.fr /bmedia /cyclecellBM /02CDK.htm](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/02CDK.htm)).
 151

Figure 63 : Schéma représentant les différentes activations possibles de la protéine p21. La p21 joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et peut inhiber l'apoptose (image tirée d'une revue de 2002) (Gartel, A.L. et Tyner, A.L. 2002). 152

Figure 64 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation de l'adhérence focale. Ce schéma montre des interactions entre les protéines du complexe d'adhérence et les voies de signalisation qu'il engendre. FAK activée, par les intégrines et/ou les facteurs de croissance, va permettre l'activation de plusieurs complexes de protéines : (1) (2) (3) (4) (5). Le complexe (1) a la fonction de régulation et de remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec pour chaque étape une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence. Les complexes (2) et (3) participent à l'activation de la voie de Erk, le complexe (4) active la voie de JNK (4) et le (5) la voie de la PI3-kinase. (Image obtenue sur internet à l'adresse suivante : [www.erudit.org / revue / ms / 2003 / v19 / n6-7 / 006837ar.html](http://www.erudit.org/revue/ms/2003/v19/n6-7/006837ar.html)). 157

Table des tableaux

Tableau 1 : Les isoformes connues de la spectrine érythroïde et non érythroïde 19

Tableau 2 : Répertoire des anticorps utilisés dans les différents travaux. 69

Tableau 3 : Taux de transfection et de viabilité des cellules WM-266 selon l'agent de transfection. Le taux de viabilité des cellules ainsi que le taux de transfusions ont été évalués 24 h après la transfection. Ces transfusions ont été réalisées sur des cellules en suspension en présence de SiARN non-relevant couplé à un Alexa 488 à une concentration de 50 nM. 94

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdi, K.M. et Bennett, V. (2008). "Adducin promotes micrometer-scale organization of beta2-spectrin in lateral membranes of bronchial epithelial cells." *Mol Biol Cell* **19**(2): 536-45.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M. et Venter, J.C. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* **287**(5461): 2185-95.
- Alloisio, N., Dalla Venezia, N., Rana, A., Andrabi, K., Texier, P., Gilsanz, F., Cartron, J.P., Delaunay, J. et Chishti, A.H. (1993). "Evidence that red blood cell protein p55 may participate in the skeleton-membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin C." *Blood* **82**(4): 1323-7.
- Alper, S.L., Stuart-Tilley, A., Simmons, C.F., Brown, D. et Drenckhahn, D. (1994). "The fodrin-ankyrin cytoskeleton of choroid plexus preferentially colocalizes with apical

Na⁺K⁺-ATPase rather than with basolateral anion exchanger AE2." J Clin Invest **93**(4): 1430-8.

An, X., Gauthier, E., Zhang, X., Guo, X., Anstee, D.J., Mohandas, N. et Chasis, J.A. (2008). "Adhesive activity of Lu glycoproteins is regulated by interaction with spectrin." Blood.

An, X., Guo, X., Sum, H., Morrow, J., Gratzer, W. et Mohandas, N. (2004). "Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability." Biochemistry **43**(2): 310-5.

Aspengren, S. et Wallin, M. (2004). "A role for spectrin in dynactin-dependent melanosome transport in *Xenopus laevis* melanophores." Pigment Cell Res **17**(3): 295-301.

Aunis, D. et Bader, M.F. (1988). "The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells." J Exp Biol **139**: 253-66.

B

Backman, L., Pekrun, A. et Gratzer, W.B. (1991). "Formation and properties of spectrin containing a truncated beta-chain, generated by an endogenous calcium-dependent protease." J Biol Chem **266**(6): 3835-40.

Banuelos, S., Saraste, M. et Djinovic Carugo, K. (1998). "Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding." Structure **6**(11): 1419-31.

Bear, J.E., Krause, M. et Gertler, F.B. (2001). "Regulating cellular actin assembly." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 158-66.

Beck, K.A., Buchanan, J.A., Malhotra, V. et Nelson, W.J. (1994). "Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex." J Cell Biol **127**(3): 707-23.

Beck, K.A. et Nelson, W.J. (1996). "The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine." Am J Physiol **270**(5 Pt 1): C1263-70.

Bennett, V. (1990). "Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm." Physiol Rev **70**(4): 1029-65.

Bennett, V. et Baines, A.J. (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." Physiol Rev **81**(3): 1353-92.

Bennett, V. et Gilligan, D.M. (1993). "The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane." Annu Rev Cell Biol **9**: 27-66.

- Benz, P.M., Blume, C., Moebius, J., Oschatz, C., Schuh, K., Sickmann, A., Walter, U., Feller, S.M. et Renne, T. (2008). "Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spectrin-VASP complexes." *J Cell Biol* **180**(1): 205-19.
- Berghs, S., Aggujaro, D., Dirx, R., Jr., Maksimova, E., Stabach, P., Hermel, J.M., Zhang, J.P., Philbrick, W., Slepnev, V., Ort, T. et Solimena, M. (2000). "betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system." *J Cell Biol* **151**(5): 985-1002.
- Bialkowska, K., Saido, T.C. et Fox, J.E. (2005). "SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin signaling complexes." *J Cell Sci* **118**(Pt 2): 381-95.
- Bignone, P.A., King, M.D., Pinder, J.C. et Baines, A.J. (2007). "Phosphorylation of a threonine unique to the short C-terminal isoform of betaII-spectrin links regulation of alpha-beta spectrin interaction to neuritogenesis." *J Biol Chem* **282**(2): 888-96.
- Blikstad, I., Nelson, W.J., Moon, R.T. et Lazarides, E. (1983). "Synthesis and assembly of spectrin during avian erythropoiesis: stoichiometric assembly but unequal synthesis of alpha and beta spectrin." *Cell* **32**(4): 1081-91.
- Bloom, M.L., Kaysser, T.M., Birkenmeier, C.S. et Barker, J.E. (1994). "The murine mutation jaundiced is caused by replacement of an arginine with a stop codon in the mRNA encoding the ninth repeat of beta-spectrin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 10099-103.
- Bodine, D.M.t., Birkenmeier, C.S. et Barker, J.E. (1984). "Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes." *Cell* **37**(3): 721-9.
- Boonstra, J. et Moes, M.J. (2005). "Signal transduction and actin in the regulation of G1-phase progression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **15**(3): 255-76.
- Bottazzi, M.E. et Assoian, R.K. (1997). "The extracellular matrix and mitogenic growth factors control G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors." *Trends Cell Biol* **7**(9): 348-52.
- Bournier, O., Kroviarski, Y., Rotter, B., Nicolas, G., Lecomte, M.C. et Dhermy, D. (2006). "Spectrin interacts with EVL (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein), a protein involved in actin polymerization." *Biol Cell* **98**(5): 279-93.
- Brookoff, D., Maggio-Price, L., Bernstein, S. et Weiss, L. (1982). "Erythropoiesis in ha/ha and sph/sph mice, mutants which produce spectrin-deficient erythrocytes." *Blood* **59**(3): 646-51.

BurrIDGE, K. et Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). "Focal adhesions, contractility, and signaling." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 463-518.

Byers, T.J., Brandin, E., Lue, R.A., Winograd, E. et Branton, D. (1992). "The complete sequence of Drosophila beta-spectrin reveals supra-motifs comprising eight 106-residue segments." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6187-91.

C

Canizalez-Roman, A. et Navarro-Garcia, F. (2003). "Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative Escherichia coli leads to actin cytoskeletal disruption." Mol Microbiol **48**(4): 947-58.

Chen, Y., Yu, P., Lu, D., Tagle, D.A. et Cai, T. (2001). "A novel isoform of beta-spectrin II localizes to cerebellar Purkinje-cell bodies and interacts with neurofibromatosis type 2 gene product schwannomin." J Mol Neurosci **17**(1): 59-70.

Chen, Y.A. et Scheller, R.H. (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 98-106.

Chow, C.W. (1999). "Regulation and intracellular localization of the epithelial isoforms of the Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3." Clin Invest Med **22**(5): 195-206.

Cianci, C.D., Zhang, Z., Pradhan, D. et Morrow, J.S. (1999). "Brain and muscle express a unique alternative transcript of alphaII spectrin." Biochemistry **38**(48): 15721-30.

Clark, M.B., Ma, Y., Bloom, M.L., Barker, J.E., Zagon, I.S., Zimmer, W.E. et Goodman, S.R. (1994). "Brain alpha erythroid spectrin: identification, compartmentalization, and beta spectrin associations." Brain Res **663**(2): 223-36.

Coutts, A.S., MacKenzie, E., Griffith, E. et Black, D.M. (2003). "TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading." J Cell Sci **116**(Pt 5): 897-906.

Cowburn, D., Zheng, J., Xu, Q. et Barany, G. (1995). "Enhanced affinities and specificities of consolidated ligands for the Src homology (SH) 3 and SH2 domains of Abelson protein-tyrosine kinase." J Biol Chem **270**(45): 26738-41.

D

- Dahl, S.C., Geib, R.W., Fox, M.T., Edidin, M. et Branton, D. (1994). "Rapid capping in alpha-spectrin-deficient MEL cells from mice afflicted with hereditary hemolytic anemia." J Cell Biol **125**(5): 1057-65.
- Das, A., Base, C., Manna, D., Cho, W. et Dubreuil, R.R. (2008). "Unexpected complexity in the mechanisms that target assembly of the spectrin cytoskeleton." J Biol Chem **283**(18): 12643-53.
- Davis, J. et Bennett, V. (1983). "Brain spectrin. Isolation of subunits and formation of hybrids with erythrocyte spectrin subunits." J Biol Chem **258**(12): 7757-66.
- Davis, J.Q. et Bennett, V. (1984). "Brain ankyrin. A membrane-associated protein with binding sites for spectrin, tubulin, and the cytoplasmic domain of the erythrocyte anion channel." J Biol Chem **259**(21): 13550-9.
- Davis, J.Q. et Bennett, V. (1994). "Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules." J Biol Chem **269**(44): 27163-6.
- Davis, J.Q., Lambert, S. et Bennett, V. (1996). "Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments." J Cell Biol **135**(5): 1355-67.
- Davis, L., Lux, S.E. et Bennett, V. (1989). "Mapping the ankyrin-binding site of the human erythrocyte anion exchanger." J Biol Chem **264**(16): 9665-72.
- De Matteis, M.A. et Morrow, J.S. (2000). "Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway." J Cell Sci **113** (Pt 13): 2331-43.
- Delaunay, J. (2007). "The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders." Blood Rev **21**(1): 1-20.
- DeSilva, T.M., Harper, S.L., Kotula, L., Hensley, P., Curtis, P.J., Otvos, L., Jr. et Speicher, D.W. (1997). "Physical properties of a single-motif erythrocyte spectrin peptide: a highly stable independently folding unit." Biochemistry **36**(13): 3991-7.
- Devarajan, P., Scaramuzzino, D.A. et Morrow, J.S. (1994). "Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of Na,K-ATPase alpha subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 2965-9.

- Devarajan, P., Stabach, P.R., De Matteis, M.A. et Morrow, J.S. (1997). "Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10711-6.
- Di Stasi, A.M., Gallo, V., Ceccarini, M. et Petrucci, T.C. (1991). "Neuronal fodrin proteolysis occurs independently of excitatory amino acid-induced neurotoxicity." Neuron **6**(3): 445-54.
- Djinovic Carugo, K., Banuelos, S. et Saraste, M. (1997). "Crystal structure of a calponin homology domain." Nat Struct Biol **4**(3): 175-9.
- Doctor, R.B., Bennett, V. et Mandel, L.J. (1993). "Degradation of spectrin and ankyrin in the ischemic rat kidney." Am J Physiol **264**(4 Pt 1): C1003-13.
- Drusco, A., Zaneni, N., Roldo, C., Trapasso, F., Farber, J.L., Fong, L.Y. et Croce, C.M. (2005). "Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10947-51.
- Dubreuil, R.R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J. et Goldstein, L.S. (2000). "Drosophila beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells." J Cell Biol **149**(3): 647-56.

F

- Fagiani, E., Giardina, G., Luzi, L., Cesaroni, M., Quarto, M., Capra, M., Germano, G., Bono, M., Capillo, M., Pelicci, P. et Lanfrancone, L. (2007). "RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas." Cancer Res **67**(7): 3064-73.
- Fairbanks, G., Avruch, J., Dino, J.E. et Patel, V.P. (1978). "Phosphorylation and dephosphorylation of spectrin." J Supramol Struct **9**(1): 97-112.
- Faraday, C.D. et Spanswick, R.M. (1993). "Evidence for a membrane skeleton in higher plants. A spectrin-like polypeptide co-isolates with rice root plasma membranes." FEBS Lett **318**(3): 313-6.
- Featherstone, D.E., Davis, W.S., Dubreuil, R.R. et Broadie, K. (2001). "Drosophila alpha- and beta-spectrin mutations disrupt presynaptic neurotransmitter release." J Neurosci **21**(12): 4215-24.
- Felding-Habermann, B., O'Toole, T.E., Smith, J.W., Fransvea, E., Ruggeri, Z.M., Ginsberg, M.H., Hughes, P.E., Pampori, N., Shattil, S.J., Saven, A. et Mueller, B.M. (2001).

- "Integrin activation controls metastasis in human breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1853-8.
- Fernandez-Shaw, C., Marina, A., Cazorla, P., Valdivieso, F. et Vazquez, J. (1997). "Anti-brain spectrin immunoreactivity in Alzheimer's disease: degradation of spectrin in an animal model of cholinergic degeneration." J Neuroimmunol **77**(1): 91-8.
- Fishkind, D.J., Bonder, E.M. et Begg, D.A. (1990). "Sea urchin spectrin in oogenesis and embryogenesis: a multifunctional integrator of membrane-cytoskeletal interactions." Dev Biol **142**(2): 453-64.
- Fowler, V. et Taylor, D.L. (1980). "Spectrin plus band 4.1 cross-link actin. Regulation by micromolar calcium." J Cell Biol **85**(2): 361-76.
- Fowler, V.M. et Adam, E.J. (1992). "Spectrin redistributes to the cytosol and is phosphorylated during mitosis in cultured cells." J Cell Biol **119**(6): 1559-72.
- Frisch, S.M. et Ruoslahti, E. (1997). "Integrins and anoikis." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 701-6.
- Frisch, S.M. et Screaton, R.A. (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 555-62.
- Fujimoto, T., Lee, K., Miwa, S. et Ogawa, K. (1991). "Immunocytochemical localization of fodrin and ankyrin in bovine chromaffin cells in vitro." J Histochem Cytochem **39**(11): 1485-93.

G

- Gaetani, M., Mootien, S., Harper, S., Gallagher, P.G. et Speicher, D.W. (2008). "Structural and functional effects of hereditary hemolytic anemia-associated point mutations in the alpha spectrin tetramer site." Blood.
- Garbe, D.S., Das, A., Dubreuil, R.R. et Bashaw, G.J. (2007). "beta-Spectrin functions independently of Ankyrin to regulate the establishment and maintenance of axon connections in the Drosophila embryonic CNS." Development **134**(2): 273-84.
- Gartel, A.L. et Radhakrishnan, S.K. (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." Cancer Res **65**(10): 3980-5.
- Gartel, A.L. et Tyner, A.L. (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." Mol Cancer Ther **1**(8): 639-49.
- Geerts, D., Fontao, L., Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q., Purkis, P.E., Wheeler, G.N., Lane, E.B., Leigh, I.M. et Sonnenberg, A. (1999). "Binding of integrin alpha6beta4 to

- plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding." J Cell Biol **147**(2): 417-34.
- Glantz, S.B., Cianci, C.D., Iyer, R., Pradhan, D., Wang, K.K. et Morrow, J.S. (2007). "Sequential degradation of alphaII and betaII spectrin by calpain in glutamate or maitotoxin-stimulated cells." Biochemistry **46**(2): 502-13.
- Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Devarajan, P., Stabach, P.R., Morrow, J.S., Di Tullio, G., Polishchuk, R., Petrucci, T.C., Luini, A. et De Matteis, M.A. (1998). "ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8607-12.
- Goldmann, W.H., Schindl, M., Cardozo, T.J. et Ezzell, R.M. (1995). "Motility of vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cells analyzed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy." Exp Cell Res **221**(2): 311-9.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. et Cong, J. (2003). "The calpain system." Physiol Rev **83**(3): 731-801.
- Goodman, S.R. et Zagon, I.S. (1984). "Brain spectrin: a review." Brain Res Bull **13**(6): 813-32.
- Goodman, S.R., Zimmer, W.E., Clark, M.B., Zagon, I.S., Barker, J.E. et Bloom, M.L. (1995). "Brain spectrin: of mice and men." Brain Res Bull **36**(6): 593-606.
- Gorina, S. et Pavletich, N.P. (1996). "Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2." Science **274**(5289): 1001-5.
- Greidinger, E.L., Miller, D.K., Yamin, T.T., Casciola-Rosen, L. et Rosen, A. (1996). "Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells." FEBS Lett **390**(3): 299-303.
- Griffith, E., Coutts, A.S. et Black, D.M. (2005). "RNAi knockdown of the focal adhesion protein TES reveals its role in actin stress fibre organisation." Cell Motil Cytoskeleton **60**(3): 140-52.
- Grimber, G., Galand, C., Garbarz, M., Mattei, M.G., Cavard, C., Zider, A., Blanchet, P., Boivin, P., Briand, P. et Dhermy, D. (1992). "Inherited haemolytic anaemia created by insertional inactivation of the alpha-spectrin gene." Transgenic Res **1**(6): 268-74.
- Gundersen, D., Orlowski, J. et Rodriguez-Boulan, E. (1991). "Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton." J Cell Biol **112**(5): 863-72.

H

- Hammarlund, M., Davis, W.S. et Jorgensen, E.M. (2000). "Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure." J Cell Biol **149**(4): 931-42.
- Hammarlund, M., Jorgensen, E.M. et Bastiani, M.J. (2007). "Axons break in animals lacking beta-spectrin." J Cell Biol **176**(3): 269-75.
- Hanspal, M. et Palek, J. (1987). "Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors." J Cell Biol **105**(3): 1417-24.
- Harris, A.S. et Morrow, J.S. (1990). "Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(8): 3009-13.
- Harwood, S.M., Yaqoob, M.M. et Allen, D.A. (2005). "Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis." Ann Clin Biochem **42**(Pt 6): 415-31.
- Hayashi, Y., Yayagi, K. et Haneji, N. (2000). "Involvement of apoptotic protease cascade for tissue destruction in Sjogren's syndrome." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **48**(5): 399-403.
- Hayes, N.V., Scott, C., Heerkens, E., Ohanian, V., Maggs, A.M., Pinder, J.C., Kordeli, E. et Baines, A.J. (2000). "Identification of a novel C-terminal variant of beta II spectrin: two isoforms of beta II spectrin have distinct intracellular locations and activities." J Cell Sci **113** (Pt 11): 2023-34.
- Hemming, N.J., Anstee, D.J., Mawby, W.J., Reid, M.E. et Tanner, M.J. (1994). "Localization of the protein 4.1-binding site on human erythrocyte glycoporphins C and D." Biochem J **299** (Pt 1): 191-6.
- Herrmann, H. et Wiche, G. (1987). "Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin." J Biol Chem **262**(3): 1320-5.
- Holleran, E.A., Ligon, L.A., Tokito, M., Stankewich, M.C., Morrow, J.S. et Holzbaur, E.L. (2001). "beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin." J Biol Chem **276**(39): 36598-605.
- Holleran, E.A., Tokito, M.K., Karki, S. et Holzbaur, E.L. (1996). "Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1815-29.

- Hosey, M.M. et Tao, M. (1976). "Altered erythrocyte membrane phosphorylation in sickle cell disease." Nature **263**(5576): 424-5.
- Hryniewicz-Jankowska, A., Czogalla, A., Bok, E. et Sikorsk, A.F. (2002). "Ankyrins, multifunctional proteins involved in many cellular pathways." Folia Histochem Cytobiol **40**(3): 239-49.
- Hu, R.J. et Bennett, V. (1991). "In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s)." J Biol Chem **266**(27): 18200-5.
- Hu, R.J., Moorthy, S. et Bennett, V. (1995). "Expression of functional domains of beta G-spectrin disrupts epithelial morphology in cultured cells." J Cell Biol **128**(6): 1069-80.
- Hu, R.J., Watanabe, M. et Bennett, V. (1992). "Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of beta-spectrin." J Biol Chem **267**(26): 18715-22.
- Huang, S., Chen, C.S. et Ingber, D.E. (1998). "Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension." Mol Biol Cell **9**(11): 3179-93.
- Huh, G.Y., Glantz, S.B., Je, S., Morrow, J.S. et Kim, J.H. (2001). "Calpain proteolysis of alpha II-spectrin in the normal adult human brain." Neurosci Lett **316**(1): 41-4.
- Hulsmeier, J., Pielage, J., Rickert, C., Technau, G.M., Klambt, C. et Stork, T. (2007). "Distinct functions of alpha-Spectrin and beta-Spectrin during axonal pathfinding." Development **134**(4): 713-22.

I

- Ikeda, Y., Dick, K.A., Weatherspoon, M.R., Gincel, D., Armbrust, K.R., Dalton, J.C., Stevanin, G., Durr, A., Zuhlke, C., Burk, K., Clark, H.B., Brice, A., Rothstein, J.D., Schut, L.J., Day, J.W. et Ranum, L.P. (2006). "Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5." Nat Genet **38**(2): 184-90.

J

- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L. et Porter, A.G. (1998). "Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis." J Biol Chem **273**(25): 15540-5.

Joseph, S.K. et Samanta, S. (1993). "Detergent solubility of the inositol trisphosphate receptor in rat brain membranes. Evidence for association of the receptor with ankyrin." J Biol Chem **268**(9): 6477-86.

K

Karinch, A.M., Zimmer, W.E. et Goodman, S.R. (1990). "The identification and sequence of the actin-binding domain of human red blood cell beta-spectrin." J Biol Chem **265**(20): 11833-40.

Kashgarian, M., Morrow, J.S., Foellmer, H.G., Mann, A.S., Cianci, C. et Ardito, T. (1988). "Na,K-ATPase co-distributes with ankyrin and spectrin in renal tubular epithelial cells." Prog Clin Biol Res **268B**: 245-50.

Kennedy, S.P., Warren, S.L., Forget, B.G. et Morrow, J.S. (1991). "Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin." J Cell Biol **115**(1): 267-77.

Kizhatil, K. et Bennett, V. (2004). "Lateral membrane biogenesis in human bronchial epithelial cells requires 190-kDa ankyrin-G." J Biol Chem **279**(16): 16706-14.

Kizhatil, K., Yoon, W., Mohler, P.J., Davis, L.H., Hoffman, J.A. et Bennett, V. (2007). "Ankyrin-G and beta2-spectrin collaborate in biogenesis of lateral membrane of human bronchial epithelial cells." J Biol Chem **282**(3): 2029-37.

Kotula, L., Laury-Kleintop, L.D., Showe, L., Sahr, K., Linnenbach, A.J., Forget, B. et Curtis, P.J. (1991). "The exon-intron organization of the human erythrocyte alpha-spectrin gene." Genomics **9**(1): 131-40.

Kroviarski, Y., El Nemer, W., Gane, P., Rahuel, C., Gauthier, E., Lecomte, M.C., Cartron, J.P., Colin, Y. et Le Van Kim, C. (2004). "Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin." Br J Haematol **126**(2): 255-64.

Kuphal, S., Bauer, R. et Bosserhoff, A.K. (2005). "Integrin signaling in malignant melanoma." Cancer Metastasis Rev **24**(2): 195-222.

L

Lazarides, E. et Nelson, W.J. (1985). "Expression and assembly of the erythroid membrane-skeletal proteins ankyrin (goblin) and spectrin in the morphogenesis of chicken neurons." J Cell Biochem **27**(4): 423-41.

- Le Clainche, C. et Carlier, M.F. (2008). "Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration." Physiol Rev **88**(2): 489-513.
- Lee, J.K., Brandin, E., Branton, D. et Goldstein, L.S. (1997). "alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*." Development **124**(2): 353-62.
- Lee, J.K., Coyne, R.S., Dubreuil, R.R., Goldstein, L.S. et Branton, D. (1993). "Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1797-809.
- Legendre, K., Safieddine, S., Kussel-Andermann, P., Petit, C. et El-Amraoui, A. (2008). "{alpha}II-{beta}V spectrin bridges the plasma membrane and cortical lattice in the lateral wall of the auditory outer hair cells." J Cell Sci **121**(Pt 20): 3347-56.
- Leshchynska, I., Sytnyk, V., Morrow, J.S. et Schachner, M. (2003). "Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via betaI spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth." J Cell Biol **161**(3): 625-39.
- Leto, T.L., Pleasic, S., Forget, B.G., Benz, E.J., Jr. et Marchesi, V.T. (1989). "Characterization of the calmodulin-binding site of nonerythroid alpha-spectrin. Recombinant protein and model peptide studies." J Biol Chem **264**(10): 5826-30.
- Leung, C.L., Green, K.J. et Liem, R.K. (2002). "Plakins: a family of versatile cytolinker proteins." Trends Cell Biol **12**(1): 37-45.
- Levine, J. et Willard, M. (1981). "Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells." J Cell Biol **90**(3): 631-42.
- Li, X. et Bennett, V. (1996). "Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes." J Biol Chem **271**(26): 15695-702.
- Li, Z., Patil, G.S., Golubski, Z.E., Hori, H., Tehrani, K., Foreman, J.E., Eveleth, D.D., Bartus, R.T. et Powers, J.C. (1993). "Peptide alpha-keto ester, alpha-keto amide, and alpha-keto acid inhibitors of calpains and other cysteine proteases." J Med Chem **36**(22): 3472-80.
- Liao, E.C., Paw, B.H., Peters, L.L., Zapata, A., Pratt, S.J., Do, C.P., Lieschke, G. et Zon, L.I. (2000). "Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability." Development **127**(23): 5123-32.
- Liu, S.C., Derick, L.H. et Palek, J. (1987). "Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton." J Cell Biol **104**(3): 527-36.

- Liu, S.C. et Palek, J. (1980). "Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons." Nature **285**(5766): 586-8.
- Lofvenberg, L. et Backman, L. (1999). "Calpain-induced proteolysis of beta-spectrins." FEBS Lett **443**(2): 89-92.
- Lombardo, C.R., Weed, S.A., Kennedy, S.P., Forget, B.G. et Morrow, J.S. (1994). "Beta II-spectrin (fodrin) and beta I epsilon 2-spectrin (muscle) contain NH₂- and COOH-terminal membrane association domains (MAD1 and MAD2)." J Biol Chem **269**(46): 29212-9.
- Lopez, C., Metral, S., Eladari, D., Drevensek, S., Gane, P., Chambrey, R., Bennett, V., Cartron, J.P., Le Van Kim, C. et Colin, Y. (2005). "The ammonium transporter RhBG: requirement of a tyrosine-based signal and ankyrin-G for basolateral targeting and membrane anchorage in polarized kidney epithelial cells." J Biol Chem **280**(9): 8221-8.
- Lux, S.E. et John, K.M. (1977). "Evidence that spectrin is a determinant of shape and deformability in the human erythrocyte." Prog Clin Biol Res **17**: 481-91.

M

- Machesky, L.M. et Hall, A. (1997). "Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization." J Cell Biol **138**(4): 913-26.
- Macias, M.J., Musacchio, A., Ponstingl, H., Nilges, M., Saraste, M. et Oschkinat, H. (1994). "Structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin." Nature **369**(6482): 675-7.
- Manno, S., Takakuwa, Y., Nagao, K. et Mohandas, N. (1995). "Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation." J Biol Chem **270**(10): 5659-65.
- Manya, H., Inomata, M., Fujimori, T., Dohmae, N., Sato, Y., Takio, K., Nabeshima, Y. et Endo, T. (2002). "Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain." J Biol Chem **277**(38): 35503-8.
- Marchesi, V.T. et Steers, E., Jr. (1968). "Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane." Science **159**(811): 203-4.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C. et Green, D.R. (1995). "Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis." J Biol Chem **270**(12): 6425-8.

- Mattagajasingh, S.N., Huang, S.C., Hartenstein, J.S. et Benz, E.J., Jr. (2000). "Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton." J Biol Chem **275**(39): 30573-85.
- McKeown, C., Praitis, V. et Austin, J. (1998). "sma-1 encodes a betaH-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis." Development **125**(11): 2087-98.
- McMahon, L.W., Sangerman, J., Goodman, S.R., Kumaresan, K. et Lambert, M.W. (2001). "Human alpha spectrin II and the FANCA, FANCC, and FANCG proteins bind to DNA containing psoralen interstrand cross-links." Biochemistry **40**(24): 7025-34.
- McMahon, L.W., Walsh, C.E. et Lambert, M.W. (1999). "Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex." J Biol Chem **274**(46): 32904-8.
- Meary, F., Metral, S., Ferreira, C., Eladari, D., Colin, Y., Lecomte, M.C. et Nicolas, G. (2007). "A mutant alphaII-spectrin designed to resist calpain and caspase cleavage questions the functional importance of this process in vivo." J Biol Chem **282**(19): 14226-37.
- Michaud, D., Guillet, G., Rogers, P.A. et Charest, P.M. (1991). "Identification of a 220 kDa membrane-associated plant cell protein immunologically related to human beta-spectrin." FEBS Lett **294**(1-2): 77-80.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. et Yamada, K.M. (1995). "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules." J Cell Biol **131**(3): 791-805.
- Mohler, P.J., Gramolini, A.O. et Bennett, V. (2002). "The ankyrin-B C-terminal domain determines activity of ankyrin-B/G chimeras in rescue of abnormal inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distribution in ankyrin-B (-/-) neonatal cardiomyocytes." J Biol Chem **277**(12): 10599-607.
- Moon, R.T. et McMahon, A.P. (1990). "Generation of diversity in nonerythroid spectrins. Multiple polypeptides are predicted by sequence analysis of cDNAs encompassing the coding region of human nonerythroid alpha-spectrin." J Biol Chem **265**(8): 4427-33.
- Moorthy, S., Chen, L. et Bennett, V. (2000). "*Caenorhabditis elegans* beta-G spectrin is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function." J Cell Biol **149**(4): 915-30.
- Morck, C. et Pilon, M. (2006). "*C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy." BMC Dev Biol **6**: 39.

- Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Smeriglio, M., Turco, E., Retta, S.F., Giuffrida, M.G., Venturino, M., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Schaefer, E., Beguinot, L., Tacchetti, C., Gaggini, P., Silengo, L., Tarone, G. et Defilippi, P. (2002). "Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines." J Biol Chem **277**(11): 9405-14.
- Morrow, J.S., Cianci, C.D., Ardito, T., Mann, A.S. et Kashgarian, M. (1989). "Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na,K-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells." J Cell Biol **108**(2): 455-65.
- Muresan, V., Stankewich, M.C., Steffen, W., Morrow, J.S., Holzbaur, E.L. et Schnapp, B.J. (2001). "Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids." Mol Cell **7**(1): 173-83.
- Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R. et Saraste, M. (1992). "Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain." Nature **359**(6398): 851-5.

N

- Nakano, M., Nogami, S., Sato, S., Terano, A. et Shirataki, H. (2001). "Interaction of syntaxin with alpha-fodrin, a major component of the submembranous cytoskeleton." Biochem Biophys Res Commun **288**(2): 468-75.
- Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B.Q., Nataro, J.P. et Azamar, Y. (2004). "The serine protease motif of EspC from enteropathogenic Escherichia coli produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative E. coli." Infect Immun **72**(6): 3609-21.
- Nedrelow, J.H., Cianci, C.D. et Morrow, J.S. (2003). "c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176." J Biol Chem **278**(9): 7735-41.
- Nelson, W.J. et Hammerton, R.W. (1989). "A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺,K⁺-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity." J Cell Biol **108**(3): 893-902.
- Nelson, W.J. et Veshnock, P.J. (1986). "Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." J Cell Biol **103**(5): 1751-65.
- Nelson, W.J. et Veshnock, P.J. (1987). "Ankyrin binding to (Na⁺ + K⁺)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells." Nature **328**(6130): 533-6.

- Nelson, W.J. et Yeaman, C. (2001). "Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells." Trends Cell Biol **11**(12): 483-6.
- Nicolas, G., Fournier, C.M., Galand, C., Malbert-Colas, L., Bournier, O., Kroviarski, Y., Bourgeois, M., Camonis, J.H., Dhermy, D., Grandchamp, B. et Lecomte, M.C. (2002). "Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain." Mol Cell Biol **22**(10): 3527-36.
- Nicolas, Gael. Etude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes: site de tétramérisation et domaine SH3, Thèse de doctorat, biologie des cellules sanguines, Université Paris 7, 1999.
- Nicolas, Gael. Etude fonctionnelle et structurale des spectrines érythroïdes; Découverte de l'hepcidine, une nouvelle hormone de l'homéostasie du fer, HDR, 2008.
- Nicolas, V., Le Van Kim, C., Gane, P., Birkenmeier, C., Cartron, J.P., Colin, Y. et Mouro-Chanteloup, I. (2003). "Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation." J Biol Chem **278**(28): 25526-33.
- Nishimura, K., Akiyama, H., Komada, M. et Kamiguchi, H. (2007). "betaIV-spectrin forms a diffusion barrier against L1CAM at the axon initial segment." Mol Cell Neurosci **34**(3): 422-30.
- Nixon, R.A. (1986). "Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: preferential localization of CANP activities in neurons." J Neurosci **6**(5): 1264-71.
- Norman, K.R. et Moerman, D.G. (2002). "Alpha spectrin is essential for morphogenesis and body wall muscle formation in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol **157**(4): 665-77.
- O**
- Ohanian, V., Wolfe, L.C., John, K.M., Pinder, J.C., Lux, S.E. et Gratzer, W.B. (1984). "Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins spectrin, actin, and 4.1." Biochemistry **23**(19): 4416-20.
- Ohara, O., Ohara, R., Yamakawa, H., Nakajima, D. et Nakayama, M. (1998). "Characterization of a new beta-spectrin gene which is predominantly expressed in brain." Brain Res Mol Brain Res **57**(2): 181-92.
- Onofri, F., Giovedi, S., Kao, H.T., Valtorta, F., Borbone, L.B., De Camilli, P., Greengard, P. et Benfenati, F. (2000). "Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains." J Biol Chem **275**(38): 29857-67.

P

- Parkinson, N.J., Olsson, C.L., Hallows, J.L., McKee-Johnson, J., Keogh, B.P., Noben-Trauth, K., Kujawa, S.G. et Tempel, B.L. (2001). "Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice." Nat Genet **29**(1): 61-5.
- Pascual, J., Pfuhl, M., Walther, D., Saraste, M. et Nilges, M. (1997). "Solution structure of the spectrin repeat: a left-handed antiparallel triple-helical coiled-coil." J Mol Biol **273**(3): 740-51.
- Pedroni, S., Lecomte, M.C., Gautero, H. et Dhermy, D. (1993). "Heterogeneous phosphorylation of erythrocyte spectrin beta chain in intact cells." Biochem J **294** (Pt 3): 841-6.
- Perrin, D., Moller, K., Hanke, K. et Soling, H.D. (1992). "cAMP and Ca(2+)-mediated secretion in parotid acinar cells is associated with reversible changes in the organization of the cytoskeleton." J Cell Biol **116**(1): 127-34.
- Pielage, J., Fetter, R.D. et Davis, G.W. (2005). "Presynaptic spectrin is essential for synapse stabilization." Curr Biol **15**(10): 918-28.
- Piepenhagen, P.A., Peters, L.L., Lux, S.E. et Nelson, W.J. (1995). "Differential expression of Na(+)-K(+)-ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron." Am J Physiol **269**(6 Pt 1): C1417-32.
- Pinder, J.C. et Baines, A.J. (2000). "A protein accumulator." Nature **406**(6793): 253-4.
- Pollerberg, G.E., Burridge, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R. et Schachner, M. (1987). "The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions." Cell Tissue Res **250**(1): 227-36.
- Pollerberg, G.E., Burridge, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R. et Schachner, M. (1987). "The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions." Cell Tissue Res **250**(1): 227-36.
- Pradhan, D., Lombardo, C.R., Roe, S., Rimm, D.L. et Morrow, J.S. (2001). "alpha -Catenin binds directly to spectrin and facilitates spectrin-membrane assembly in vivo." J Biol Chem **276**(6): 4175-81.
- Pradhan, D. et Morrow, J. (2002). "The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production." Immunity **17**(3): 303-15.

Prchal, J.T., Papayannopoulou, T. et Yoon, S.H. (1990). "Patterns of spectrin transcripts in erythroid and non-erythroid cells." J Cell Physiol **144**(2): 287-94.

Pugacheva, E.N., Roegiers, F. et Golemis, E.A. (2006). "Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 507-15.

R

Rebecchi, M.J. et Scarlata, S. (1998). "Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 503-28.

Reinhard, M., Jarchau, T. et Walter, U. (2001). "Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins." Trends Biochem Sci **26**(4): 243-9.

Riederer, B.M. et Routtenberg, A. (1999). "Can GAP-43 interact with brain spectrin?" Brain Res Mol Brain Res **71**(2): 345-8.

Rizzolo, L.J. et Zhou, S. (1995). "The distribution of Na⁺,K⁺-ATPase and 5A11 antigen in apical microvilli of the retinal pigment epithelium is unrelated to alpha-spectrin." J Cell Sci **108** (Pt 11): 3623-33.

Romero, F., Dargemont, C., Pozo, F., Reeves, W.H., Camonis, J., Gisselbrecht, S. et Fischer, S. (1996). "p95vav associates with the nuclear protein Ku-70." Mol Cell Biol **16**(1): 37-44.

Rotter, B., Bournier, O., Nicolas, G., Dhermy, D. et Lecomte, M.C. (2005). "AlphaII-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts." Biochem J **388**(Pt 2): 631-8.

Rotter, B., Kroviarski, Y., Nicolas, G., Dhermy, D. et Lecomte, M.C. (2004). "AlphaII-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding." Biochem J **378**(Pt 1): 161-8.

Rowland, B.D. et Peeper, D.S. (2006). "KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer." Nat Rev Cancer **6**(1): 11-23.

S

Sadqi, M., Casares, S., Abril, M.A., Lopez-Mayorga, O., Conejero-Lara, F. et Freire, E. (1999). "The native state conformational ensemble of the SH3 domain from alpha-spectrin." Biochemistry **38**(28): 8899-906.

- Sahr, K.E., Laurila, P., Kotula, L., Scarpa, A.L., Coupal, E., Leto, T.L., Linnenbach, A.J., Winkelmann, J.C., Speicher, D.W., Marchesi, V.T. et al. (1990). "The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid alpha-spectrin." J Biol Chem **265**(8): 4434-43.
- Sakaguchi, G., Orita, S., Naito, A., Maeda, M., Igarashi, H., Sasaki, T. et Takai, Y. (1998). "A novel brain-specific isoform of beta spectrin: isolation and its interaction with Munc13." Biochem Biophys Res Commun **248**(3): 846-51.
- Sako, Y. et Kusumi, A. (1995). "Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether." J Cell Biol **129**(6): 1559-74.
- Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M. et Kusumi, A. (1998). "Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton." J Cell Biol **140**(5): 1227-40.
- Sangerman, J., Gard, A.L., Shah, A. et Goodman, S.R. (1999). "Synthesis, assembly, and turnover of alpha and beta-erythroid and nonerythroid spectrins in rat hippocampal neurons." Brain Res **849**(1-2): 128-38.
- Seubert, P., Peterson, C., Vanderklish, P., Cotman, C. et Lynch, G. (1990). "Increased spectrin proteolysis in the brindled mouse brain." Neurosci Lett **108**(3): 303-8.
- Shotton, D.M., Burke, B.E. et Branton, D. (1979). "The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies." J Mol Biol **131**(2): 303-29.
- Siddhanta, A., Radulescu, A., Stankewich, M.C., Morrow, J.S. et Shields, D. (2003). "Fragmentation of the Golgi apparatus. A role for beta III spectrin and synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." J Biol Chem **278**(3): 1957-65.
- Sikorski, A.F., Terlecki, G., Zagon, I.S. et Goodman, S.R. (1991). "Synapsin I-mediated interaction of brain spectrin with synaptic vesicles." J Cell Biol **114**(2): 313-8.
- Singer, S.J. et Nicolson, G.L. (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Sormunen, R., Paakko, P., Palovuori, R., Soini, Y. et Lehto, V.P. (1994). "Fodrin and actin in the normal, metaplastic, and dysplastic respiratory epithelium and in lung carcinoma." Am J Respir Cell Mol Biol **11**(1): 75-84.

- Speicher, D.W., Weglarz, L. et DeSilva, T.M. (1992). "Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site." J Biol Chem **267**(21): 14775-82.
- Sridharan, D., Brown, M., Lambert, W.C., McMahon, L.W. et Lambert, M.W. (2003). "Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links." J Cell Sci **116**(Pt 5): 823-35.
- Sridharan, D.M., McMahon, L.W. et Lambert, M.W. (2006). "alphaII-Spectrin interacts with five groups of functionally important proteins in the nucleus." Cell Biol Int **30**(11): 866-78.
- Stabach, P.R., Cianci, C.D., Glantz, S.B., Zhang, Z. et Morrow, J.S. (1997). "Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility." Biochemistry **36**(1): 57-65.
- Stabach, P.R. et Morrow, J.S. (2000). "Identification and characterization of beta V spectrin, a mammalian ortholog of Drosophila beta H spectrin." J Biol Chem **275**(28): 21385-95.
- Stankewich, M.C., Tse, W.T., Peters, L.L., Ch'ng, Y., John, K.M., Stabach, P.R., Devarajan, P., Morrow, J.S. et Lux, S.E. (1998). "A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14158-63.
- Sui, B.Q., Dutta, P.R. et Nataro, J.P. (2003). "Intracellular expression of the plasmid-encoded toxin from enteroaggregative Escherichia coli." Infect Immun **71**(9): 5364-70.
- ## T
- Takeda, S., Yamazaki, H., Seog, D.H., Kanai, Y., Terada, S. et Hirokawa, N. (2000). "Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building." J Cell Biol **148**(6): 1255-65.
- Tang, Y., Katuri, V., Iqbal, S., Narayan, T., Wang, Z., Lu, R.S., Mishra, L. et Mishra, B. (2002). "ELF a beta-spectrin is a neuronal precursor cell marker in developing mammalian brain; structure and organization of the elf/beta-G spectrin gene." Oncogene **21**(34): 5255-67.
- Teng, F.Y., Wang, Y. et Tang, B.L. (2001). "The syntaxins." Genome Biol **2**(11): REVIEWS3012.
- Tepass, U. (2002). "Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function." Bioessays **24**(8): 690-5.

- Thomas, G.H. et Kiehart, D.P. (1994). "Beta heavy-spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during *Drosophila* embryogenesis." Development **120**(7): 2039-50.
- Thomas, G.H., Zarnescu, D.C., Juedes, A.E., Bales, M.A., Londergan, A., Korte, C.C. et Kiehart, D.P. (1998). "Drosophila betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye." Development **125**(11): 2125-34.
- Trave, G., Lacombe, P.J., Pfuhl, M., Saraste, M. et Pastore, A. (1995). "Molecular mechanism of the calcium-induced conformational change in the spectrin EF-hands." Embo J **14**(20): 4922-31.
- Trave, G., Pastore, A., Hyvonen, M. et Saraste, M. (1995). "The C-terminal domain of alpha-spectrin is structurally related to calmodulin." Eur J Biochem **227**(1-2): 35-42.
- Tse, W.T., Tang, J., Jin, O., Korsgren, C., John, K.M., Kung, A.L., Gwynn, B., Peters, L.L. et Lux, S.E. (2001). "A new spectrin, beta IV, has a major truncated isoform that associates with promyelocytic leukemia protein nuclear bodies and the nuclear matrix." J Biol Chem **276**(26): 23974-85.
- Tsukamoto, T. et Nigam, S.K. (1997). "Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly." J Biol Chem **272**(26): 16133-9.
- Tuominen, H., Sormunen, R. et Kallioinen, M. (1996). "Non-erythroid spectrin (fodrin) in cutaneous tumours: diminished in cell membranes, increased in the cytoplasm." Br J Dermatol **135**(4): 576-80.

U

- Ungewickell, E. et Gratzer, W. (1978). "Self-association of human spectrin. A thermodynamic and kinetic study." Eur J Biochem **88**(2): 379-85.
- Ursitti, J.A., Kotula, L., DeSilva, T.M., Curtis, P.J. et Speicher, D.W. (1996). "Mapping the human erythrocyte beta-spectrin dimer initiation site using recombinant peptides and correlation of its phasing with the alpha-actinin dimer site." J Biol Chem **271**(12): 6636-44.
- Ursitti, J.A., Petrich, B.G., Lee, P.C., Resneck, W.G., Ye, X., Yang, J., Randall, W.R., Bloch, R.J. et Wang, Y. (2007). "Role of an alternatively spliced form of alphaII-spectrin in localization of connexin 43 in cardiomyocytes and regulation by stress-activated protein kinase." J Mol Cell Cardiol **42**(3): 572-81.

V

- Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H. et Orrenius, S. (1996). "Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis." J Biol Chem **271**(49): 31075-85.
- Veeranna, Kaji, T., Boland, B., Odriljin, T., Mohan, P., Basavarajappa, B.S., Peterhoff, C., Cataldo, A., Rudnicki, A., Amin, N., Li, B.S., Pant, H.C., Hungund, B.L., Arancio, O. et Nixon, R.A. (2004). "Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease." Am J Pathol **165**(3): 795-805.
- Viel, A. et Branton, D. (1996). "Spectrin: on the path from structure to function." Curr Opin Cell Biol **8**(1): 49-55.
- Villaseca, J.M., Navarro-Garcia, F., Mendoza-Hernandez, G., Nataro, J.P., Cravioto, A. et Eslava, C. (2000). "Pet toxin from enteroaggregative Escherichia coli produces cellular damage associated with fodrin disruption." Infect Immun **68**(10): 5920-7.
- Voas, M.G., Lyons, D.A., Naylor, S.G., Arana, N., Rasband, M.N. et Talbot, W.S. (2007). "alphaII-spectrin is essential for assembly of the nodes of Ranvier in myelinated axons." Curr Biol **17**(6): 562-8.

W

- Walker, J.L., Fournier, A.K. et Assoian, R.K. (2005). "Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension." Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 395-405.
- Wallis, C.J., Wenegieme, E.F. et Babitch, J.A. (1992). "Characterization of calcium binding to brain spectrin." J Biol Chem **267**(7): 4333-7.
- Wang, K.K., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R.V., Glantz, S.B. et Morrow, J.S. (1998). "Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells." J Biol Chem **273**(35): 22490-7.
- Wasenius, V.M., Saraste, M. et Lehto, V.P. (1989). "From the spectrin gene to the assembly of the membrane skeleton." Int J Dev Biol **33**(1): 49-54.
- Watanabe, T., Tsuchida, T., Kanda, N., Mori, K., Hayashi, Y. et Tamaki, K. (1999). "Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjogren syndrome and lupus erythematosus." Arch Dermatol **135**(5): 535-9.

- Williams, J.A., MacIver, B., Klipfell, E.A. et Thomas, G.H. (2004). "The C-terminal domain of *Drosophila* (beta) heavy-spectrin exhibits autonomous membrane association and modulates membrane area." J Cell Sci **117**(Pt 5): 771-82.
- Winkelman, J.C., Chang, J.G., Tse, W.T., Scarpa, A.L., Marchesi, V.T. et Forget, B.G. (1990). "Full-length sequence of the cDNA for human erythroid beta-spectrin." J Biol Chem **265**(20): 11827-32.
- Winkelman, J.C., Costa, F.F., Linzie, B.L. et Forget, B.G. (1990). "Beta spectrin in human skeletal muscle. Tissue-specific differential processing of 3' beta spectrin pre-mRNA generates a beta spectrin isoform with a unique carboxyl terminus." J Biol Chem **265**(33): 20449-54.
- Winkelman, J.C. et Forget, B.G. (1993). "Erythroid and nonerythroid spectrins." Blood **81**(12): 3173-85.
- Wong, G.K., Hoyle, D.H. et Begg, D.A. (1996). "Alteration of cell cycle timing and induction of surface instability in starfish blastomeres microinjected with antibodies to spectrin." Dev Biol **180**(1): 199-212.

Y

- Yan, Y., Winograd, E., Viel, A., Cronin, T., Harrison, S.C. et Branton, D. (1993). "Crystal structure of the repetitive segments of spectrin." Science **262**(5142): 2027-30.
- Yang, Y., Lacas-Gervais, S., Morest, D.K., Solimena, M. et Rasband, M.N. (2004). "BetaIV spectrins are essential for membrane stability and the molecular organization of nodes of Ranvier." J Neurosci **24**(33): 7230-40.
- Yu, J., Fischman, D.A. et Steck, T.L. (1973). "Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents." J Supramol Struct **1**(3): 233-48.

Z

- Zarnescu, D.C. et Thomas, G.H. (1999). "Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in *Drosophila*." J Cell Biol **146**(5): 1075-86.
- Zhang, H., Ozaki, I., Mizuta, T., Matsushashi, S., Yoshimura, T., Hisatomi, A., Tadano, J., Sakai, T. et Yamamoto, K. (2002). "Beta 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway." Cancer **95**(4): 896-906.

Ziemnicka-Kotula, D., Xu, J., Gu, H., Potempska, A., Kim, K.S., Jenkins, E.C., Trenkner, E. et Kotula, L. (1998). "Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based membrane skeleton." J Biol Chem **273**(22): 13681-92.

ARTICLES

ARTICLE 1

Cet article étudie le rôle de la région CCC dans un modèle murin présentant une spectrine α II mutée. Ces souris possèdent une spectrine α II délétée d'une région ciblée par les protéases calpaïnes et caspases (description de la région CCC dans mon introduction). C'est une région présente spécifiquement dans la spectrine α II et elle est très conservée chez les mammifères.

La protéolyse de la spectrine serait impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme le suggèrent beaucoup de travaux effectués dans des modèles cellulaires (ex vivo). Afin d'étudier les fonctionnalités de cette région dans un modèle in vivo, des souris ont été développées au sein du laboratoire. Elles possèdent une chaîne α II de la spectrine délétée de la région CCC mimant la spectrine α I spécifique du globule rouge. Ainsi la spectrine α II de ces souris mutantes est non sensible à la protéolyse ciblée de cette région CCC.

Des études histologiques et immunologiques ont été effectuées sur les organes (le rein, le foie, le colon, la rate, le cerveau) de ces souris et elles ont montré une localisation de la spectrine α II mutante semblable à la spectrine α II sauvage sans défauts structuraux.

D'autres études consistant à induire l'apoptose sur les fibroblastes embryonnaires des souris mutantes ont été effectuées. Malgré l'absence de protéolyse sur la spectrine α II mutante par les caspases dans la région CCC confirmant que le site de clivage majoritaire des caspases a bien été délété, cette spectrine α II mutante est tout de même clivée au deuxième site de clivage des caspases dit minoritaire, situé en aval du premier. Aucune différence de sensibilité des cellules à l'apoptose a été observée entre les fibroblastes embryonnaires sauvages et mutantes. Les études d'immunohistochimie ont montré que le phénomène de bourgeonnement de la membrane plasmique lors de l'apoptose existait aussi bien sur les cellules des souris mutantes que sur les cellules des souris sauvages.

Ce deuxième site « caspase » sur la spectrine α II pourrait compenser la perte du site principal de la région CCC.

Ces travaux réalisés sur l'étude de l'apoptose des fibroblastes embryonnaires constituent ma participation dans cet article.

Les conclusions de ces travaux sont à l'encontre des hypothèses émises. Les souris mutantes, générant une spectrine ayant perdue sa propriété d'être clivée par les protéases spécifiques de la région CCC, sont viables et elles se développent sans phénotype apparent. Il s'avère par conséquent que le clivage de la spectrine α II n'est pas impliqué dans des fonctions cellulaires ubiquitaires, comme on pouvait le penser.

Toute fois comme le clivage de la chaîne α II de la spectrine a été impliqué dans de nombreuses pathologies, notamment neurologiques, ce modèle pourrait être d'un intérêt majeur pour appréhender l'importance de ce clivage dans la physiologie de ces maladies.

A Mutant α II-spectrin Designed to Resist Calpain and Caspase Cleavage Questions the Functional Importance of This Process *in Vivo**

Received for publication, January 2, 2007, and in revised form, February 20, 2007. Published, JBC Papers in Press, March 20, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700028200

Fleur Meary^{1,5*}, Sylvain Metral^{1,5*}, Christophe Ferrel¹, Dominique Eladari^{4,6,7}, Yves Collin^{1,5*}, Marie-Christine Lecomte^{1,5*}, and Gaël Nicolas^{1,5*}

From the ¹INSERM, U665, Paris F-75015, ²Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris F-75015, ³Université Paris 7/Denis Diderot, Paris, F-75005, ⁴Institut Fédératif de Recherche Clau de Bernard, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris F-75018, ⁵INSERM, U652, Paris F-75006, and ^{6,7}Université Paris Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, and AP-HP, Département de Physiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris F-75006, France

α - and β -spectrins are components of molecular scaffolds located under the lipid bilayer and named membrane skeletons. Disruption of these scaffolds through mutations in spectrins demonstrated that they are involved in the membrane localization or the maintenance of proteins associated with them. The ubiquitous α II-spectrin chain bears in its central region a unique domain that is sensitive to several proteases such as calpains or caspases. The conservation of this region in vertebrates suggests that the proteolysis of α II-spectrin by these enzymes could be involved in important functions. To assess the role of α II-spectrin cleavage *in vivo*, we generated a murine model in which the exons encoding the region defining this cleavage sensitivity were disrupted by gene targeting. Surprisingly, homozygous mice expressing this mutant α II-spectrin appeared healthy, bred normally, and had no histological anomaly. Remarkably, the mutant α II-spectrin assembles correctly into the membrane skeleton, thus challenging the notion that this region is required for the stable biogenesis of the membrane skeleton in nonerythroid cells. Our finding also argues against a critical role of this particular α II-spectrin cleavage in either major cellular functions or in normal development.

Spectrin was first identified at the inner surface of the red blood cell membrane and is well known to be the central component of the membrane skeleton, a ubiquitous and complex spectrin-actin scaffold. Spectrins are long and flexible molecules composed of two subunits, α and β , that intertwine to form α/β heterodimers. Spectrin is subsequently integrated into the membrane skeleton as $(\alpha/\beta)_2$ tetramers resulting from the self-association of α/β heterodimers (1). These tetramers constitute the filaments of the lattice, the nodes of which are cross-linked by short actin filaments (2). Each spectrin subunit is mainly composed of a succession of triple helical repeats. The spectrin-based membrane skeleton is

responsible for the characteristic shape and the unique physical properties of red blood cells, such as deformability and remarkable stability to shear stress. Defects in components of this network lead to membrane fragility and are associated with various hemolytic anemias (3).

This membrane skeleton network was identified in all nonerythroid mammalian cells with components, including spectrins, that are very similar to those found into red blood cells but in most cases are expressed by different genes. There are only two genes encoding α -spectrins. The α I-spectrin is mainly expressed into red blood cells in association with β I. The ubiquitous α II-spectrin (also named α -fodrin) is actually considered as the major α -spectrin expressed in nonerythroid cells, and the α II/ β II heterodimers are the main species described in these cells. Disruption of membrane skeletons through β -spectrin mutations was found to be responsible for the abnormal localization or the maintenance of proteins associated with spectrin-based complexes (4–7).

There are no mammalian models describing α II-spectrin mutations. Defects in the unique α -spectrin ortholog to the α II-gene from vertebrates are lethal in larva in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, arguing for the crucial role of the entire protein (8–10).

α II-spectrin differs from the erythroid α I-spectrin mainly in one feature as follows: the presence of a short region consisting of 36 amino acids encoded by three exons and located in the middle part of the protein near an SH3² domain. This region bears several cleavage sites for different proteases, including calpains and caspases. Moreover, it contains a binding site for calmodulin, and a calmodulin/ α II-spectrin interaction was shown to regulate the cleavage by calpains and caspases (11). We and others found that calpain cleavage is also regulated by phospho/dephosphorylation of the tyrosine residue (position 1176) located in the calpain recognition site (12, 13). More recently, it was shown that this region here named CCC (for calpain, caspase, calmodulin) is also targeted by proteases (*e.g.* Pet) secreted by pathological enteroaggregative strains of *Escherichia coli* (14, 15).

* This work was supported by INSERM and by the Institut National de la Transfusion Sanguine. The project was initiated at unit 409 of INSERM. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: INSERM U665, Institut National de la Transfusion Sanguine, 6 Rue Alexandre Cabanel, Paris F-75015, France. Tel: 33-1-44-49-30-00 (ext. 32-02); Fax: 33-1-43-06-50-19; E-mail: gnicolas@idf.inserm.fr.

² The abbreviations used are: SH, Src homology; CHAPS, 3-[3-(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; BDP, breakdown product; MEF, murine embryonic fibroblast; PGK, phosphoglycerate kinase; ES, embryonic stem; ALLN, N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal.

ARTICLE 2

α II-Spectrin Is Critical for Cell Adhesion and Cell Cycle*

Received for publication, February 19, 2008, and in revised form, October 2, 2008. Published, JBC Papers in Press, October 31, 2008, DOI 10.1074/jbc.M801324200

Sylvain Metral^{1,5*}, Beata Machnicka^{1,5*}, Sylvain Blgot^{1,5*}, Yves Collin^{1,5*}, Didier Dherym^{1,5*},
and Marie-Christine Lecomte^{1,5*1}

From the ¹INSERM, U665, Paris, F-75015, the ²Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris F-75015, and the ³Université Paris 7/Denis Diderot, Paris F-75005, France

Spectrins are ubiquitous scaffolding components of the membrane skeleton that organize and stabilize microdomains on both the plasma membrane and the intracellular organelles. By way of their numerous interactions with diverse protein families, they are implicated in various cellular functions. Using small interfering RNA strategy in the WM-266 cell line derived from human melanoma, we found that α II-spectrin deficiency is associated with a defect in cell proliferation, which is related to a cell cycle arrest at the G₁ phase (first gap phase), as evaluated by DNA analysis and Rb phosphorylation. These observations coincided with elevated expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21^{CIP}. Concomitantly, spectrin loss impaired cell adhesion and spreading. These cell adhesion defects were associated with modifications of the actin cytoskeleton, such as loss of stress fibers, alterations of focal adhesions, and modified expression of some integrins. Our results provide novel insights into spectrin functions by demonstrating the involvement of α II-spectrin in cell cycle regulation and actin organization.

First identified at the intracellular surface of the erythrocyte plasma membrane, the spectrin-based skeleton is considered as a nearly ubiquitous and complex spectrin-actin network in metazoan cells (1).

Spectrins are giant extended flexible molecules composed of two subunits (α and β) that intertwine to form $\alpha\beta$ heterodimers. Spectrin is normally considered to exist as tetramers resulting from self-association of $\alpha\beta$ dimers. Spectrin tetramers constitute the filaments of the lattice, the nodes of which are cross-linked by actin filaments. This spectrin-based skeleton is bound to various transmembrane proteins either directly, or more frequently through two connecting proteins, ankyrin and protein 4.1. In mammals, the spectrin family currently includes seven genes encoding for two α -subunits (α I and α II), four "conventional" β -subunits (β I to β IV) and one β heavy subunit (β V), as well as multiple alternatively spliced variants, each of these species presenting its specific cellular expression pattern. For example, whereas α I-spectrin is essentially expressed in the mature erythrocyte, α II-spectrin is the most common form in nucleated cells.

The functions clearly determined up to date for the spectrin network emerge from human mutations associated with dis-

eases as well as from animal models. Numerous studies on red cells, particularly those in hereditary hemolytic anemia, have clearly established its importance for supporting cell shape and for maintaining cell membrane integrity and stability (2, 3). In nucleated cells, the spectrin-based skeleton has been shown to participate in the stabilization or activation of several specialized membrane proteins, as recently reported for the TRCP channels (4). The direct interaction between TRCP4 channel and spectrin is involved in the regulation of the channel surface expression and activation. One consistent feature observed when spectrin or its binding partner ankyrin are lost or defective, is a failure of interacting membrane proteins to accumulate at the appropriate site. The loss of β IV-spectrin observed in quivering mice with hearing defect is associated with a mislocation of voltage-gated channels from the axon initial segment and the node of Ranvier (5, 6). In humans, β III-spectrin mutations, which are responsible for spinocerebellar ataxia type 5, are associated with a mislocation of the glutamate transporter EAAT4 at the surface of the plasma membrane (7, 8). In *Drosophila*, loss of β -spectrin led to loss of Na,K-ATPase from the basolateral domain of epithelial cells (9). In an extreme case, loss of a variant of β II-spectrin in mice led to death *in utero* (10).

Although the consequences of loss of function of β -spectrins and ankyrins are progressively better explained, the cellular consequences of α -spectrin defects are less well established, except in the context of red blood cells: mutations in the gene coding for α I-spectrin mainly expressed in mature red blood cells from mammals, are associated with severe hemolytic anemia and in some cases with a short survival (11, 12). Defects in the unique α -spectrin ortholog to the α II-spectrin of vertebrates are lethal in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* larvae, arguing for the crucial role of this protein (13–15). Up to now, there are no mammalian models describing α II-spectrin knock-out. In this paper, we studied the relative contributions of α II-spectrin to cell behavior using a small interfering RNA (siRNA)² knock-down approach in a cellular model. For the first time we show that depletion of α II-spectrin is associated with a loss of cell adhesion as well as with an arrest of cell proliferation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—Rabbit polyclonal antibodies against lamin and paxillin were purchased from Santa Cruz Biotechnology, against p15, p16, and p27 proteins were from Cell Signaling. Monoclonal antibodies against α II-spectrin, retinoblastoma

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1724, solely to indicate this fact.

RESUME

ETUDE DES FONCTIONS DE LA SPECTRINE α NON-ERYTHROÏDE

Le squelette dépendant de la spectrine, localisé sous la bicouche lipidique, est un échafaudage essentiel de toutes les cellules animales. La Spectrine (Sp), structure géante, robuste mais flexible d'hétéro tétramères $(\alpha\beta)_2$, constitue les filaments de ce réseau, dont chaque nœud interagit avec des filaments d'actine. Les fonctions du squelette de Sp, qui sont bien définies dans le globule rouge (rôle dans sa forme, dans sa résistance aux forces de cisaillement et dans sa déformabilité) sont moins bien connues dans les cellules non-érythroïdes. La Sp non-érythroïde pourrait participer à l'établissement et/ou au maintien de sous-domaines membranaires spécialisés dans l'accumulation de protéines de membrane (telles que les canaux ioniques, les pompes ioniques, les récepteurs et les molécules d'adhérence) comme nous le font penser les invalidations de la Sp- β non-érythroïde. Cependant le rôle de la Sp- α non-érythroïde est moins bien établi. Chez les mammifères, la Sp- α est codée par deux gènes: un pour Sp- α I, principalement exprimée dans l'érythrocyte mature, le second pour Sp- α II qui est exprimée dans toutes les cellules nucléées. Pour étudier les fonctions de la Sp- α II, nous avons utilisé une approche de SiRNA sur des cellules de mélanome humain. Nos données montrent que la diminution de Sp- α II est associée à I) un arrêt en G1 du cycle cellulaire II) une perte d'adhérence des cellules malgré l'augmentation de quelques intégrines III) des modifications dans l'organisation du réseau d'actine.

Study of the non-erythroid α spectrin functions

The spectrin-based skeleton is an essential scaffold underlying different lipid bilayers in all animal cells. Spectrins (Sp), as giant extended flexible heterotetramers $(\alpha\beta)_2$, constitute the filaments of this network, the nodes of which are cross-linked by actin filaments. The functions of the Sp-based skeleton, which are well defined in red blood cells (required for shape, resistance to shear stress and deformability) are less well understood in non-erythroid cells. The non-erythroid Sp might participate in the establishment and/or the maintenance of specialized membrane subdomains by accumulating integral membrane proteins (such as ionic channels, ionic pumps,

receptors and cell adhesion molecules) as revealed by loss of the main non-erythroid β -Sp. However the effect of non-erythroid α -Sp are less well established. In mammals, α -Sp are encoded by two genes: one for α I-Sp mainly expressed in mature erythrocyte, the second one for α II-Sp which is expressed in all nucleated cells. In the pursuit of α II-Sp functions, we have checked the effect of α II-Sp knock down by siRNA melanoma human cell line. Our data revealed that spectrin depletion is associated with i) an arrest of cell cycle at G1 state ii) a loss of cell adhesion in spite of increase in some integrins iii) some modifications of actin organisation.

