



HAL
open science

Rôle des lipides-phosphate phosphatases dans la modulation des voies de signalisation impliquées dans les léiomyomes utérins

Pierre-Christian Violet

► **To cite this version:**

Pierre-Christian Violet. Rôle des lipides-phosphate phosphatases dans la modulation des voies de signalisation impliquées dans les léiomyomes utérins. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T083 . tel-00788479

HAL Id: tel-00788479

<https://theses.hal.science/tel-00788479>

Submitted on 14 Feb 2013

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.

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE MEDECINE PARIS SUD

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire

Ecole Doctorale : Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie ED419

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre-Christian VIOLET

le 17 Décembre 2012

*Rôle des lipides-phosphate phosphatases dans la
modulation des voies de signalisation impliquées dans
les léiomyomes utérins.*

Directeur de thèse : Dr. Philippe ROBIN

JURY

Pr. Marc LE MAIRE
Dr. Hervé LE STUNFF
Dr Eric RUELLAND
Dr Gilles CHRAPIGNY
Dr Jean-Albert BOUTIN

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

RESUME

Le léiomyome utérin est la pathologie utérine la plus fréquente chez les femmes en âges de procréer. Des résultats précédents obtenus avec les cellules ELT3, une lignée de cellules de léiomyomes de rat, ont montré que l'acide lysophosphatidique (LPA) activait les MAP kinases ERK1/2 via le récepteur LPA1 couplé à la protéine Gi et l'activation de Raf, Ras et de MEK. Durant ce travail, nous avons caractérisé l'activité phosphatase responsable de la dégradation du LPA dans cette lignée de cellules ELT3. Nous avons montré que le LPA était dégradé exclusivement par la lipide-phosphate phosphatase 1 (LPP1), seule isoforme exprimée dans les cellules ELT3. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés aux effets du diacylglycerol pyrophosphate (DGPP). Le DGPP est un médiateur lipidique qui, sous sa forme dioctanoyl (DGPP8:0), est décrit comme un antagoniste des récepteurs LPA1 et LPA3 chez les mammifères. Dans cette étude, nous montrons que le DGPP8:0 n'a pas d'effet antagoniste sur l'activation du module MAP kinase ERK1/2 par le LPA mais qu'il induit une activation de ERK1/2 dans plusieurs lignées de cellules de mammifères. En effet le DGPP active ERK1/2 à travers l'activation des PKC, Raf et MEK. De plus, nous montrons que l'activation induite par le DGPP repose sur sa déphosphorylation catalysée par une LPP. Nous montrons également que l'inhibition de LPP1 par le VPC32183 ou l'utilisation de siRNA dirigé contre la lipide phosphate-phosphatase 1 (LPP1) réduit l'activation ERK1/2 induite par le DGPP. Ceci montre que le DGPP active ERK1/2 via sa déphosphorylation en acide phosphatidique (PA8:0), catalysée par la LPP1. Enfin dans une dernière partie nous montrons que le myomètre sain, contrairement aux cellules ELT3, exprime à la fois la LPP1 et la LPP3. En étudiant l'effet de la surexpression de la LPP3 dans les cellules ELT3, nous avons observé que la LPP3 interagissait avec la LPP1 et qu'elle pourrait la séquestrer dans des compartiments membranaires internes. Cette séquestration entraîne une diminution de l'activité ecto-LPP au profit de l'activité intracellulaire qui pourrait réguler négativement la production de seconds messagers phospholipidiques. Ces résultats montrent l'importance des LPP dans la régulation des effets des phospholipides bioactifs et suggère un lien entre le caractère tumoral des cellules de léiomyomes et l'absence de la LPP3.

Mots Clés : Léiomyome utérin, cellule ELT3, lipide-phosphate phosphatase, acide phosphatidique, acide lysophosphatidique, diacylglycérol pyrophosphate, VPC32183, endothéline, ERK, MAP kinase

ABSTRACT

Leiomyoma is the most common uterine disease in women in age of procreation. Previous results have shown that in ELT3 cells, which is a rat leiomyoma-derived cell line, lysophosphatidic acid (LPA) was able to activate ERK1/2 MAP kinases through the activation of the LPA1 receptor via the classical MAP kinase pathway involving Raf, Ras and MEK. We have observed that LPA was dephosphorylated in ELT3 cells by Lipid-phosphate phosphatase 1 (LPP1) which is the only LPP isoform expressed in these cells. In a second part, we investigated the effect of diacylglycerol pyrophosphate (DGPP). DGPP, in its octanoyl form (DGPP8:0), is described as an LPA1, 3-antagonist. Here, we show that DGPP had no antagonistic effect on LPA-ERK activation, but was able to induce ERK activation by itself. This activation occurred through the activation of PKC, Raf and MEK. On the other hand, we show that DGPP-ERK activation required its dephosphorylation by LPP. Next we observed that the DGPP-ERK activation was inhibited by VPC32183, which we showed to inhibit LPP activity, and by siRNA treatment targeting LPP1. These results show that DGPP needs to be dephosphorylated into PA to induce ERK phosphorylation, and this dephosphorylation is catalyzed by LPP1. Finally, in the third part of this study, we were interested in the differential LPP expression between ELT3 cells and myometrium cells. Indeed, we have previously observed that ELT3 cells express only LPP1 while myometrial cells express LPP1 and LPP3. We observed that when LPP3 is expressed in ELT3 cells, it can interact with LPP1 and may restrain its plasma membrane localization reducing ectoLPP activity in favor of intracellular LPP activity. This may result in a negative regulation of intracellular phospholipidic second messengers. All these results show the significance of LPP in the regulation of bioactive phospholipid effects and suggest a relationship between the tumoral phenotype of leiomyoma cells and the absence of LPP3.

Keywords : Uterine leiomyoma, ELT3 cells, lipid-phosphate phosphatase, phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, diacylglycerol pyrophosphate, VPC32183, endothelin, ERK, MAP kinase

A ma Grand-mère,

Margot.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier toute mon équipe, en particulier Zahra qui m'a accueilli avec beaucoup de bienveillance et de gentillesse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Philippe pour son humour, ses madeleines, et pour les échanges aussi bien scientifiques que technologiques. J'ai énormément appris à ses côtés et lui en suis très reconnaissant.

Merci à Clément pour ses conseils, ses encouragements et pour son côté « Clément !! ».

Enfin, merci à Denis, Martin et Ginette pour leurs aides bien précieuses.

J'ai travaillé dans un cadre particulièrement agréable et convivial grâce à certaines personnes de l'institut que je tiens à remercier. Je pense particulièrement à Amel et Anne, Rodolphe, Dodo, Dom Tom, les voisins de couloir pour leurs conseils et leurs produits, mais aussi les personnes envolées (Cathy, Marion, Joseph, Elvira, ...), toute l'équipe de foot et toutes les personnes qui se reconnaîtront.

Un grand merci à l'équipe des drôles de dames du 2^{ème}. Marie pour sa fougue et sa jeunesse, Stéphanie pour son esprit sud ouest (et oui le gras c'est la santé), Sandrine pour ses conseils « lapinistiques » et Joëlle.

Merci aux membres du Jury messieurs Le Stunff H., Ruelland E., Boutin JA., Charpigny G. et Le Maire M. d'avoir accepté de juger mes travaux.

Merci à l'équipe enseignante pour m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement de la biochimie et grâce à qui le monitorat n'a pas été une charge mais un plaisir.
Merci à l'école doctorale BIO-SigNE.

Remerciement spécial à toute ma famille pour leur soutien, merci à ma Maman, Sophie, Delphine, Alexia et mon Père. Sans oublier ma p'tite moitié qui a supporté toutes les différentes étapes traversées durant ces 3 années de thèse et pour le reste.

Un grand à merci à ma grand-mère pour son soutien durant mes études.

Merci à toutes et à tous pour votre bonne humeur, pour toutes ces séances de rires et de sourires, et pour toutes ces discussions autour d'un café ou d'un plat Picard où, comme il se doit, nous avons refait le monde...

SOMMAIRE

INTRODUCTION -----	5
I Le muscle utérin : -----	5
I-1 L'utérus _____	6
I-1_1 Structure histologique_____	6
I-1_2 L'utérus de rat _____	7
I-1_3 Pathologies utérines_____	8
I-1_3_1 Cancers du col de l'utérus -----	8
I-1_3_2 Cancers de l'endomètre -----	9
I-1_3_2 Les leiomyosarcomes -----	9
I-1_3_2 Les léiomyomes utérins-----	10
I-2 Les modèles d'étude des léiomyomes utérins _____	20
I-2_1 Les rates EKER et la lignée de cellules ELT3 -----	20
II Les Lipides Bioactifs -----	23
II-1 L'acide lysophosphatidique _____	24
II-1_1 Synthèse du LPA_____	25
II-1_1_1 Synthèse intracellulaire -----	25
II-1_1_2 L'autotaxine (ATX) ou lysophospholipase D -----	27
II-1_1_3 Les phospholipases A2 secrétées -----	30
II-1_1_4 Les phospholipases A1 -----	31
II-1_2 Dégradation du LPA _____	31
II-1_2_1 Les Lipides-Phosphates Phosphatases -----	32
II-1_2_2 Les Epoxyde Hydrolases Solubles (sEH) -----	33
II-1_3 La signalisation du LPA _____	33
II-1_3_1 Les récepteurs membranaires du LPA -----	33
II-1_3_2 Les voies de signalisation impliquées -----	36
II-1_3_3 Effets physiologiques et physiopathologiques du LPA -----	43
II-2 La sphingosine-1 phosphate _____	46
II-2_1 Métabolisme _____	46
II-2_1_1 Synthèse de la S1P -----	47
II-2_1_2 Dégradation de la S1P -----	49
II-2_2 Signalisation et effets cellulaires de la S1P _____	50
II-2_2_1 Rôle de l'axe SphK1/S1P dans les cancers -----	52
II-3 L'acide Phosphatidique _____	54
II-3_1 Métabolisme du PA _____	54
II-3_1_1 La Phospholipase D (PLD) -----	55
II-3_1_2 La DAG Kinase -----	58
II-3-1-2 Dégradation du PA -----	58
II-3_2 Signalisation et effets cellulaires de l'axe PLD/PA _____	60
II-3_2_1 L'acide Phosphatidique dans le cancer. -----	64
II-4 Le Diacylglycerol Pyrophosphate _____	65
III Les lipides phosphatases -----	67
III-1 Les phosphatidates phosphatases _____	68
III-1_1 PAP1/Lipines _____	68
III-1_2 PAP2 _____	70

III-1_2_1	Caractéristiques/Spécificités générales	70
III-1_2_2	Les effets cellulaires des LPP	73
IV	La Signalisation Endothéline	77
IV-1	Les endothélines	78
IV-1_1	Structure et métabolisme des endothélines	78
IV-1_2	La signalisation de l'axe endothéline	80
V	Etat du sujet	83
MATERIELS ET METHODES		87
I-1	Matériels	88
I-1_1	Produits	88
I-2	Méthodes	89
I-2_1	Culture cellulaire	90
I-2_2_1	Lipofectamine LTX plus	91
I-2_2_2	Lipofectamine RNAimax	91
I-2_3	Analyse de l'activité phosphatase	92
I-2_3_1	Préparation d'extrait membranaire	92
I-2_3_2	Dosage de phosphate	93
I-2_3_3	Chromatographie sur couche mince	94
I-2_4	Analyse des MAPK ERK1/2	94
I-2_4_1	Caractérisation immunologique de l'activation de ERK1/2	94
I-2_4_2	Incubation et extraction des protéines cellulaires	94
I-2_4_3	Electrophorèse et électrotransfert	95
I-2_4_3	Analyse immunologique	95
I-2_5	RT-PCR	96
I-2_5_1	Extraction des ARNs	96
I-2_5_2	Réaction de reverse transcription	96
I-2_5_3	Réaction de PCR	97
I-2_6	PCR quantitative	97
I-2_7	Mesure de la translocation de la PKC	98
I-2_8	Liaison du GTP γ ³⁵ S	98
I-2_8_1	Préparation des membranes	99
I-2_8_2	Liaison du GTP γ ³⁵ S	99
I-2_9	Immunoprécipitation par GFP-TRAP®	99
I-2_10	Clonage des Lipide-Phosphate Phosphatases.	100
I-2_10_1	Les plasmides et primers utilisés pour les constructions.	100
I-2_10_2	Restriction des vecteurs et des inserts	102
I-2_10_3	Ligation des inserts dans leurs vecteurs correspondants	102
I-2_10_4	Transformation des plasmides.	102
I-2_10_5	Extraction des plasmides à partir des colonies transformées.	103
I-2_10_6	Contrôle de la ligation	103
I-2_11	Immunofluorescence.	104
RESULTAT		106
I	Mise en évidence et caractérisation de l'activité LPA-phosphatase	106
I_1	Activation des MAP kinases ERK1/2 par le LPA	107
I_2	Le LPA est dégradé en présence de cellules ETL3 et de membranes de cellule ELT3	108

I_3 La déphosphorylation du LPA réduit son effet sur l'activation de ERK1/2 _____	112
I_4 Caractérisation biochimique des enzymes déphosphorylant le LPA _____	113
I_5 L'activité phosphatase hydrolysant le LPA possède les caractéristiques des PAP2 _____	115
I_6 Dans les cellules ELT3, seule la LPP1 est exprimée _____	117
I_7 La LPP1 est responsable de l'activité ectophosphatase des cellules ELT3 _____	118
I_8 Conclusion _____	120
II VII Inhibition of lipid phosphate phosphatase activity by VPC32183 suppresses the ability of diacylglycerol pyrophosphate to activate ERK_{1/2} MAP kinase -----	122
III Etude comparée de l'activité lipide-phosphate phosphatase dans les cellules musculaires lisses utérines normales et pathologiques (léiomyomes) -----	157
III_1 Activité et expression des LPP dans les cellules de myomètre sain _____	158
III_2 La surexpression de la LPP3 dans les cellules ELT3 _____	159
III_4 La LPP1 interagit avec la LPP3 _____	164
III_5 Conclusion _____	166
DISCUSSION GENERALE -----	168
BIBLIOGRAPHIE-----	178

INTRODUCTION PARTIE 1

I Le muscle utérin :

Aspects physiologiques et pathologie des léiomyomes

I-1 L'utérus

I-1_1 Structure histologique

L'utérus est l'organe féminin de reproduction, c'est un organe creux qui mesure environ 8 cm et qui est le siège du développement de l'œuf fécondé. Il est sous le contrôle de nombreuses hormones, facteurs de croissance, et de neurotransmetteurs qui régulent les différentes fonctions utérines (prolifération cellulaires, contraction, différenciation) au cours du cycle menstruel ou de la grossesse, et permet ainsi à l'utérus de s'adapter au niveau structural et fonctionnel. La paroi utérine est composée de trois tuniques : une couche musculaire lisse, le myomètre, recouverte par une muqueuse du côté de la lumière utérine, l'endomètre, et recouverte par la séreuse au niveau intra-abdominal (Schéma 1).

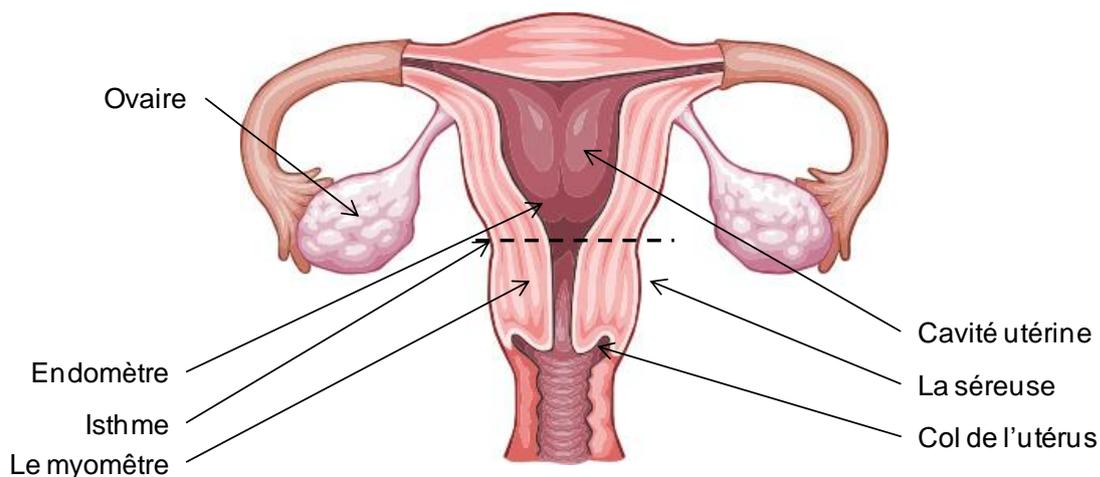


Schéma 1. Représentation schématique de l'utérus de femme.

Le myomètre (Schéma 1) correspond à la partie musculaire de l'utérus. Il est principalement formé de fibres musculaires lisses, cellules longues et fusiformes, arrangées en faisceaux étroitement intriqués dans des lames conjonctives. Le tissu conjonctif a un rôle de soutien et participe à la transmission des forces contractiles engendrées par les cellules musculaires. Il englobe également les systèmes vasculaires et nerveux ainsi que des cellules isolées comme des fibroblastes. Trois

couches différentes ont été identifiées au sein du myomètre : la couche externe qui comprend majoritairement des faisceaux musculaires obliques et longitudinaux par rapport au péritoine, d'où son nom de couche longitudinale, puis la couche intermédiaire ou plexiforme qui est richement vascularisée et à dominance conjonctive, enfin la couche interne ou circulaire qui possède des fibres musculaires orientées parallèlement par rapport au stroma endométrial formant un anneau autour de la cavité utérine. Ces couches musculaires myométriales peuvent présenter dans certaines espèces des caractéristiques histologiques, biochimiques et pharmacologiques différentes (Chow and Marshall 1981; Breuiller, Rouot et al. 1987; Tomiyasu, Chen et al. 1988) ainsi que des réactivités différentes aux agonistes utérotoniques et relaxants. (Cao, Yosida et al. 2005),

La fonction principale du myomètre est de se contracter ou de se relâcher selon les conditions physiologiques, sous l'action d'hormones (ocytocine, endothéline...), de neurotransmetteurs (adrénergiques, cholinergiques) ou de prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGF₂α). De plus, les cellules musculaires utérines ont la capacité de proliférer et de s'hypertrophier au cours de la gestation, ce qui permet au myomètre de s'adapter à la croissance du fœtus.

I-1_2 L'utérus de rat

Contrairement à l'utérus de femme, l'utérus de rat est divisé en 2 cornes utérines. Chaque corne utérine communique au niveau du col, qui débouche dans le vagin, et débouche à l'autre extrémité sur un ovaire. Ces cornes mesurent 5 cm de long environ et sont orientées vers la paroi latérale de la cavité abdominale postérieure, en direction des reins. Contrairement à l'utérus humain qui est destiné à ne recevoir qu'un embryon unique, l'utérus de rat peut contenir de nombreux embryons : en moyenne un utérus de rat en contient 10 (Schéma 2).

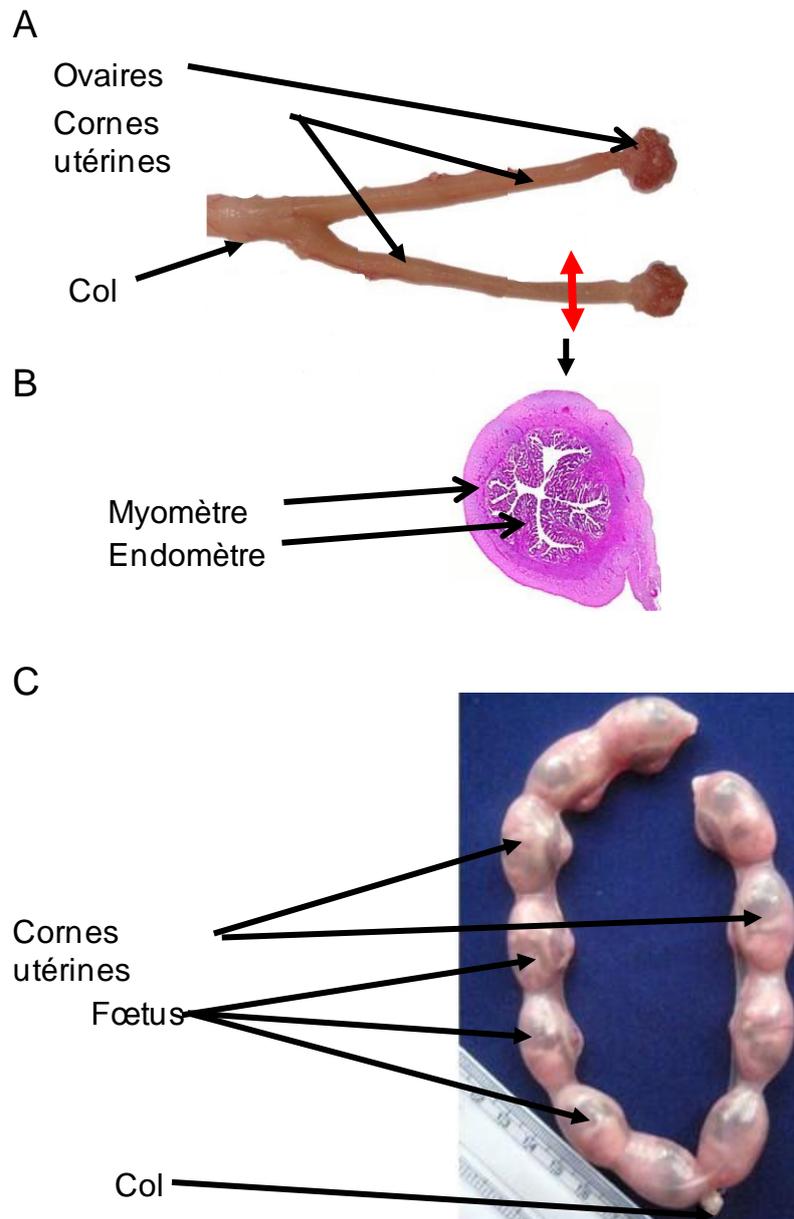


Schéma 2. L'utérus de rate non gestante et gestante. A, photographie d'un utérus de rate non gestante. B, coupe transversale d'une corne utérine. C, Utérus de rat en cours de gestation.

I-1_3 Pathologies utérines

I-1_3_1 Cancers du col de l'utérus

C'est un des cancers qui survient le plus fréquemment chez la femme. Dans ce cas, c'est l'épithélium du col qui est généralement atteint, on parle d'épithéliome.

L'épithélium est composé de deux couches : superficielle et profonde. Lorsque seule la couche superficielle est touchée, il s'agit d'un cancer au stade 0 ou épithélioma pré invasif, cependant, lorsque la lame basale est envahie il s'agit d'un cancer invasif. Les infections vaginales et cervicales par des virus tels que le papillomavirus ou l'herpès sont les facteurs majoritairement responsables du cancer du col de l'utérus. Cette pathologie est, au départ, totalement asymptomatique. Lorsqu'elle est décelée et traitée rapidement les chances de guérison sont proches de 100 %. Les traitements indiqués sont la radiothérapie, la chirurgie et la chimiothérapie.

I-1_3_2 Cancers de l'endomètre

Les cancers de l'endomètre sont des tumeurs fréquentes souvent découvertes après la ménopause. Le type histologique le plus couramment observé est l'adénocarcinome. Responsable de métrorragies post-ménopausiques, il peut rester longtemps asymptomatique. Les principaux facteurs de risque sont l'obésité et la prédisposition génétique. Les stratégies thérapeutiques sont l'hystérectomie et la radiothérapie. Le pronostic de survie à long terme dépend de la profondeur de l'extension tumorale dans le myomètre au moment du traitement. En effet, si le risque de dissémination lymphatique est négligeable lorsque la tumeur est localisée à l'endomètre, il passe de 4 à 40% selon qu'il existe un envahissement du myomètre superficiel ou du myomètre profond.

I-1_3_2 Les leiomyosarcomes

Le leiomyosarcome est un cancer du muscle lisse utérin relativement rare. En effet, il ne représente qu'environ 1% des pathologies utérines. Il touche principalement les femmes à partir de 40 ans. Les leiomyosarcomes sont difficilement identifiables et on les confond souvent avec des léiomyomes utérins car ils partagent des symptômes communs. En effet, les leiomyosarcomes provoquent

des saignements anormaux en dehors des règles ou après la ménopause accompagnés de fortes douleurs pelviennes. L'utérus n'est généralement le siège que d'un leiomyosarcome, avec un diamètre moyen de 10 cm environ, mais il peut être à l'origine de métastases. Tous les leiomyosarcomes ne dérivent pas en métastases, en effet, certains peuvent être « dormants » pendant plusieurs dizaines d'années. Actuellement le seul traitement qui offre un maximum de rédemption consiste en un acte chirurgical. En effet, les leiomyosarcomes sont très peu sensibles à la chimiothérapie ainsi qu'aux radiations. Généralement, en cas de découverte d'un leiomyosarcome, la première étape consiste à retirer la tumeur par chirurgie, puis suit un traitement de chimiothérapie pour éliminer les éventuelles métastases.

I-1_3_2 Les léiomyomes utérins

Les léiomyomes utérins (appelés aussi fibromes ou fibromyomes utérins) sont les tumeurs les plus fréquentes chez la femme, soit environ 35 % des femmes en âge de procréer dans les principaux pays développés (Walker and Stewart 2005). Il s'agit d'un myome, c'est-à-dire une tumeur se développant à partir des fibres musculaires lisses. Ils sont composés, en grande partie, par des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine et des protéoglycanes. Les léiomyomes sont des tumeurs solides très denses pesant de quelques grammes à plusieurs kilogrammes. Généralement l'utérus est le siège de plusieurs fibromes (jusqu'à plusieurs dizaines chez la même femme). On distingue différents types de léiomyomes en fonction de leurs localisations soit sur le corps utérin soit sur le col utérin.

Sur le corps utérin (97% des léiomyomes), on distingue les léiomyomes interstitiels, sous muqueux et sous séreux.

Léiomyome interstitiel (ou intramural) : le fibrome est localisé dans la paroi musculaire de l'utérus (Schéma 3A)

Léiomyome sous muqueux (endocavitaire) : le fibrome se développe dans la cavité utérine et l'endomètre recouvre la partie saillante dans cette cavité (Schéma 3B et C). On différencie le léiomyome sous-muqueux par le fait qu'il soit pédiculé ou sessile.

Léiomyome sous-séreux : le fibrome se développe sur la surface externe de l'utérus (Schéma 3D et E). On distingue deux léiomyomes sous-séreux différents. Le premier, le léiomyome sous-séreux sessile quand le fibrome est relié à l'utérus par une large base d'implantation et le second le léiomyome sous-séreux pédiculé quand le fibrome est relié à l'utérus par un pédicule plus ou moins long.

Sur le col utérin (cervical) : les léiomyomes du col utérin ne représentent que 3% des léiomyomes. Il s'agit de tumeurs qui se développent dans la région du col de l'utérus, plus précisément dans sa portion sus-vaginale et plus rarement dans sa portion intra-vaginale (Schéma 3F).

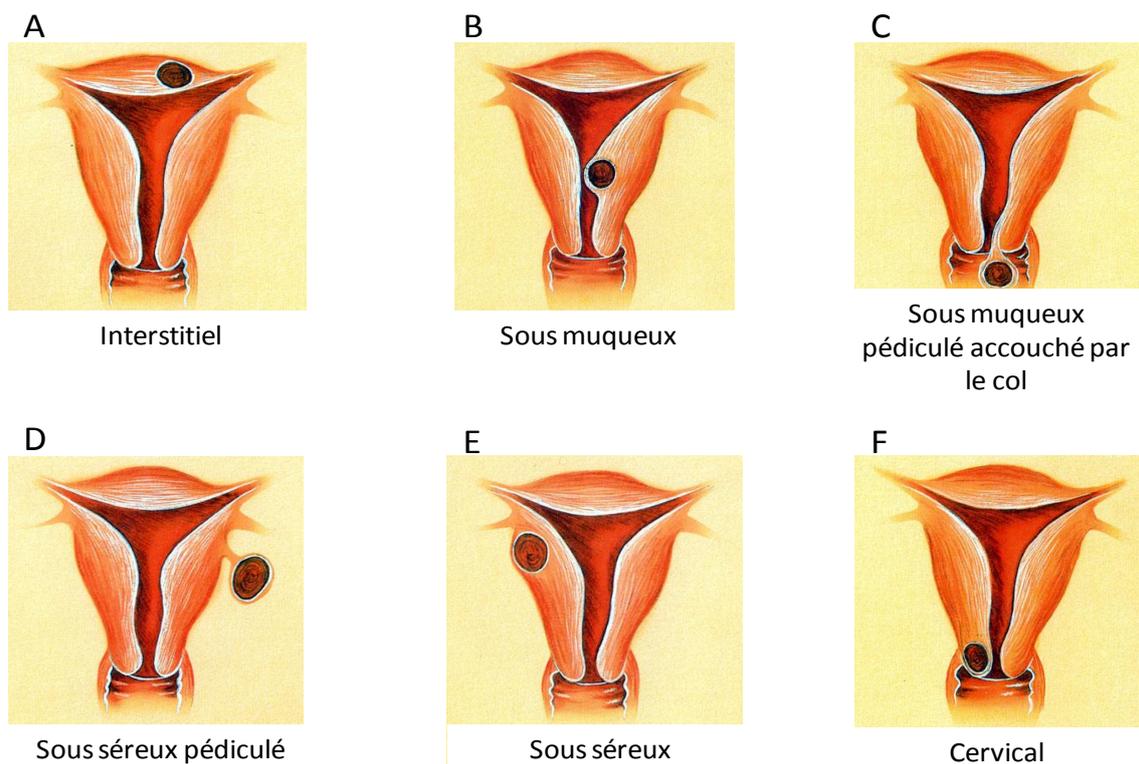


Schéma 3. Les différents types de léiomyomes. A) Léiomyomes interstitiels. B) et C) Léiomyomes sous-muqueux. D) et E) Léiomyomes sous-séreux. F) Léiomyomes cervicaux. (D'après www.aly-abbara.com).

Symptômes liés aux léiomyomes

Un grand nombre de femmes sont susceptibles de développer des léiomyomes. Dans 50% des cas les léiomyomes restent asymptomatiques et sont diagnostiqués seulement lors de contrôles ou de manière inopinée. A contrario, ils peuvent également être responsables de nombreux symptômes. En effet, ils peuvent provoquer des douleurs pelviennes de manière chronique ou lors de la torsion accidentelle d'un de ces léiomyomes, entraînant une très forte douleur aiguë. On observe également l'apparition de règles hémorragiques, appelées ménorragies, correspondant à de fortes menstruations qui apparaissent de façon irrégulière et qui se prolongent. Ces saignements importants sont souvent responsables d'anémies (Divakar 2008). Les léiomyomes peuvent provoquer des symptômes qui peuvent être associés à d'autres pathologies. En effet, ils peuvent provoquer des compressions d'organes avoisinants tels que la vessie, l'uretère et le rectum, ayant pour effet d'entraîner des constipations chroniques ainsi que des envies fréquentes d'uriner. Les léiomyomes sont également retrouvés dans beaucoup d'autres problèmes médicaux : le plus critique étant l'infertilité. Les léiomyomes sont retrouvés chez plus de 35% des femmes fertiles et seraient responsables de 2 à 5 % des cas de stérilité. Cette infertilité pourrait être expliquée par différents mécanismes : notamment une altération du transport des gamètes ou de l'embryon dans le tractus génital, une distorsion de la cavité utérine, ou encore par une modification quantitative et qualitative des contractions utérines physiologiques, ou par une compression des ostia tubaires (orifices des trompes utérines). Ils peuvent également provoquer des avortements à répétition, des accouchements prématurés ainsi que des troubles dans le déroulement de l'accouchement et de la délivrance du placenta (Sunkara, Khairy et al. 2010).

Etiologie des léiomyomes

Le léiomyome est une tumeur monoclonale provenant de la dérivation d'une seule cellule myométriale. Bien que l'on n'en connaisse pas les causes précises, le rôle des hormones stéroïdiennes comme la progestérone et surtout l'œstradiol dans la

croissance et le maintien de ces léiomyomes est connu depuis longtemps (Maruo, Ohara et al. 2004) (Schéma 4).

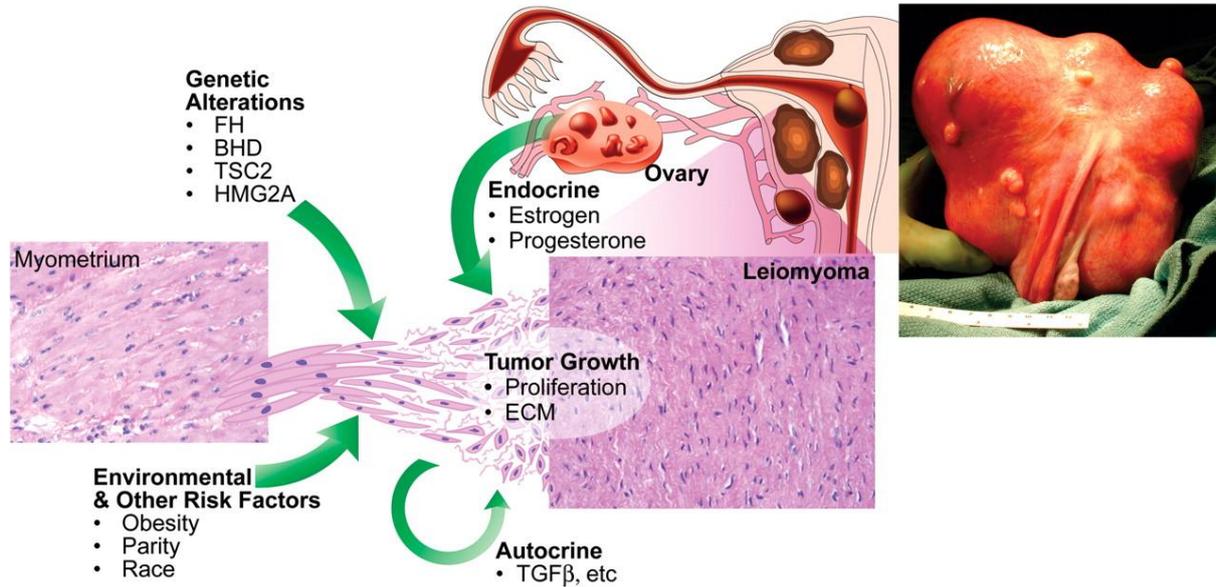


Schéma 4. Physiopathologie des léiomyomes utérins (d'après Reins MS et al., 2000)

Facteurs génétiques

Dans de nombreux léiomyomes on trouve des anomalies cytogénétiques telles que des mutations somatiques ou des réarrangements chromosomiques comme des translocations ou des délétions (Walker and Stewart 2005). Des travaux ont montré que 50% des léiomyomes contenaient des anomalies chromosomiques majeures sur les chromosomes 6, 7, 12 et 14. Par exemple dans 40% des léiomyomes, une mutation sur le chromosome 12, au niveau du gène HMGA2, gène codant des facteurs architecturaux de l'ADN, a été observée (Ligon and Morton 2000).

Les prédispositions génétiques sont également importantes, car certains groupes ethniques sont beaucoup plus touchés que d'autres par la pathologie. En effet, jusqu'à 70 % des femmes d'origine africaine sont atteintes par les léiomyomes. De plus, les tumeurs qu'elles développent sont beaucoup plus importantes en taille et en nombre (Blake 2007).

Facteurs de risque

Des facteurs propres à chaque individu interviennent dans la prévalence des léiomyomes. Ainsi il existe des « phénomènes » qui vont augmenter le risque de développement des myomes. Parmi ces phénomènes, l'apparition précoce des règles, 11 ans et moins, augmenterait le risque de formation de ces léiomyomes. Le surpoids est également un facteur les favorisant. En effet, l'apparition des léiomyomes augmente avec le poids et l'indice de masse corporel (IMC). Ceci serait dû à une plus grande production de progestérone et d'œstrogène ainsi qu'à une diminution des protéines de transport de ces hormones et qui entraîne une augmentation de la quantité d'hormone libre. L'alcool est aussi un facteur de risque. Au-delà d'une prise de 20 g d'alcool par jour, on augmente d'un tiers l'apparition des myomes. Il y a aussi une légère dimension héréditaire. Ainsi, une femme aura 2,5 fois plus de probabilité d'avoir un fibrome si sa mère ou sa sœur en a eu un. A contrario, il existe des facteurs protecteurs. Le fait d'avoir une puberté tardive, à partir de 14-15 ans, entraîne une diminution de l'apparition de myomes. On observe également chez les femmes post-ménopausées une diminution de la taille ainsi que du nombre de myomes corrélée avec un taux d'œstrogène bas. De la même manière un poids et un IMC moyens et constants constituent des facteurs protecteurs. Paradoxalement, fumer protège de l'apparition des léiomyomes, en dehors d'autres effets néfastes pour l'organisme. Le nombre de grossesses intervient également, ainsi une femme ayant eu plusieurs enfants aurait moins de risques de développer un léiomyome (Marshall, Spiegelman et al. 1998; Blake 2007; Parker 2007; Templeman, Marshall et al. 2009).

Tous ces résultats sont à prendre en compte avec précaution car ils sont étudiés individuellement et proviennent d'études épidémiologiques, qui sont très difficiles à normaliser.

Les stéroïdes

Les léiomyomes se développent sous l'effet des hormones stéroïdes, œstrogène et progestérone. Il est acquis que l'intervention des œstrogènes, dans la croissance et le maintien des léiomyomes, soit essentielle et fasse intervenir des facteurs de croissance comme le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), l'Epidermal Growth Factor (EGF), le TGF- β (Transforming Growth Factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) ou encore les Insulin-like Growth Factor-1 et 2 (IGF1 et IGF2) (Schéma 5) (Maruo, Ohara et al. 2004). En effet, des études ont montré que les deux récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β étaient exprimés dans le myomètre mais leur expression est plus importante dans les léiomyomes. De plus, un traitement induisant une hypo-œstrogénie diminue leur taille (Olive, Lindheim et al. 2004; Rackow and Arici 2006).

Le rôle de la progestérone et des progestatifs dans la croissance des léiomyomes est encore mal connu. Cependant il est admis que la progestérone agit comme les œstrogènes via la production de facteurs de croissance. Il a été observé que les récepteurs à la progestérone PR-A et PR-B étaient aussi bien exprimés dans le myomètre que dans les léiomyomes. De plus, des études ont montré que l'utilisation d'antagonistes provoquait une diminution des léiomyomes (Porter, Tsibris et al. 1995). Les voies de signalisation et les mécanismes impliqués dans les réponses à la progestérone sont mal connus. Dans les leiomyomes, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est augmentée par la progestérone (Maruo, Ohara et al. 2004). En revanche, la progestérone diminue l'expression de la protéine pro-apoptotique TNF- α (Blake 2007).

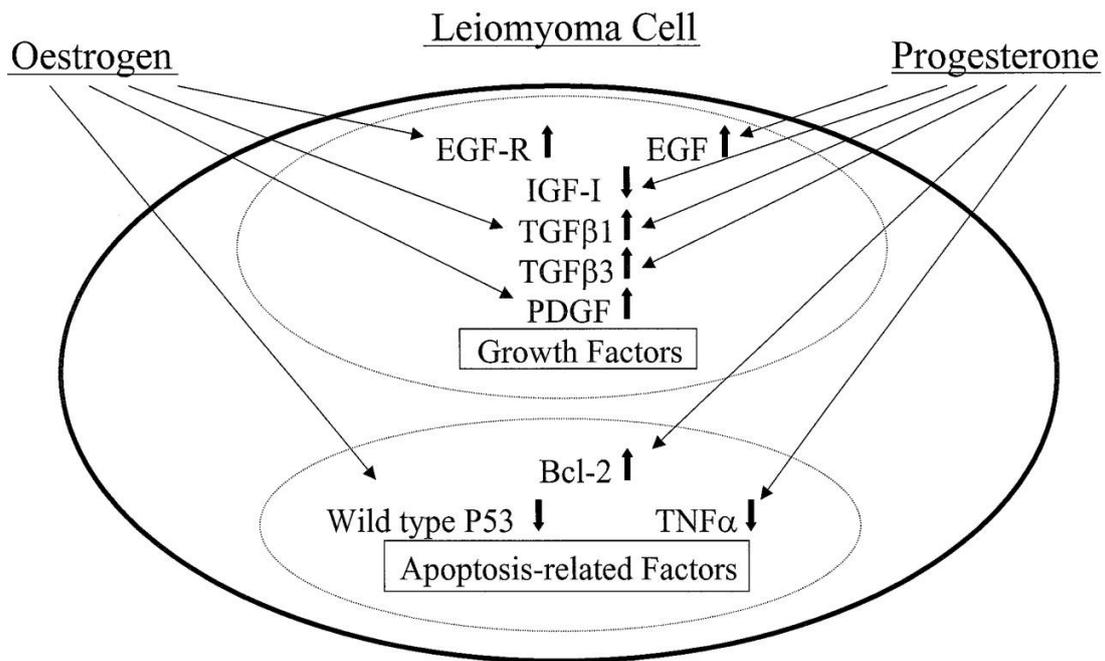


Schéma 5. Régulation des facteurs de croissance et facteurs apoptotiques par les hormones stéroïdiennes. ↑ = effets stimulateurs, ↓ = effets inhibiteurs. (D'après Maruo T et al., 2004).

Une étude récente, sur des xénogreffes de léiomyomes humains dans des souris, montre que l'œstradiol n'aurait pas d'effet direct sur la croissance du léiomyome mais plutôt un effet de synergie pour la progestérone en stimulant la synthèse de récepteur à la progestérone. (Ishikawa, Ishi et al. 2010).

Des facteurs environnementaux peuvent aussi influencer l'évolution des léiomyomes via la signalisation des hormones stéroïdes. En effet, des composants issus de l'alimentation, ou ayant des origines pharmaceutiques ou industrielles sont connus pour être des xénoestrogènes. Ils peuvent ainsi se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes et avoir des effets agonistes, ce qui entraîne une prolifération accrue des cellules de léiomyomes (Blake 2007; Taran, Brown et al. 2010).

Physiopathologie des léiomyomes

Les léiomyomes sont caractérisés par un pouvoir prolifératif exacerbé. En plus des hormones stéroïdes, elles répondent de manière exagérée aux facteurs de croissance tels que le PDGF, le VEGF, le TGF-β et l'EGF (Parker 2007). Ces

facteurs de croissance sont surexprimés dans les léiomyomes, et ils agissent de manière combinée sur la prolifération cellulaire. L'EGF et le PDGF augmentent la synthèse d'ADN, le TGF- β stimule la synthèse de matrice extracellulaire et le VEGF induit l'angiogenèse. L'ensemble de tous ces facteurs est donc un paramètre très important pour la croissance des léiomyomes.

Traitements des léiomyomes

Il existe différents traitements pour les léiomyomes qui sont plus ou moins invasifs.

Les traitements médicamenteux :

Les anti-estrogènes et/ou anti-progestatifs. Comme nous l'avons déjà décrit, les léiomyomes sont, entre autre, sous le contrôle des hormones sexuelles. Des études expérimentales effectuées sur des cellules de léiomyomes en culture ainsi que sur des modèles de rats ont montré un rôle de ces hormones (Howe, Everitt et al. 1995; Barbarisi, Petillo et al. 2001; Di, Yu et al. 2008). De ce fait, il est apparu que ces stéroïdes étaient des cibles thérapeutiques de premier choix. Cependant les contraceptions oestroprogestatives et progestatives développées à ce jour ont plutôt un effet sur les symptômes que sur la tumeur elle-même. En plus de l'absence d'effets de ces anti-progestatifs et anti-oestrogéniques, on a observé de nombreux effets secondaires indésirables dont le principal est une prise de poids non négligeable chez les patientes.

Les limites thérapeutiques des anti-stéroïdes mettent en lumière les nombreuses controverses suscitées quant à l'impact réel de ces hormones.

Les analogues de la GnRH. Le traitement par des agonistes de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) est le plus efficace dans la prise en charge des fibromes (Olive, Lindheim et al. 2004; Rackow and Arici 2006). Ces agonistes diminuent la production des œstrogènes par les ovaires ce qui entraîne une diminution des myomes d'environ 30% à 55%. Ces agonistes sont utilisés le plus souvent comme traitement pré-opératoire pour une réduction du volume du fibrome ou pour arrêter une hémorragie résistante aux progestatifs facilitant l'intervention chirurgicale. Ils ont un effet rapide sur les saignements et sur les fibromes mais ils ne

sont que transitoires, la récurrence est aussi rapide après leur arrêt. De plus, ils possèdent de nombreux effets secondaires dus à la ménopause artificielle (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale, troubles de l'humeur (Rackow and Arici 2006)).

Les traitements chirurgicaux :

La chirurgie est nécessaire lorsque les symptômes sont majeurs : saignements incontrôlables, infertilité ou fortes douleurs pelviennes. Il y a alors différentes interventions possibles :

La chirurgie conservatrice :

-La myomectomie consiste en l'ablation du fibrome. Ce qui permet à la femme de conserver son utérus et donc de garder la possibilité d'avoir des enfants. Mais la myomectomie ne constitue pas toujours une solution définitive.

-L'ablation de l'endomètre. Cette opération est surtout pratiquée en cas de saignements abondants et de fibromes sous-muqueux nombreux et peu volumineux. Lorsqu'il est enlevé par chirurgie, les saignements menstruels disparaissent définitivement, et la possibilité de procréer aussi.

Chirurgie non conservatrice

-L'hystérectomie. Cela consiste en une ablation de l'utérus, uniquement pour les cas les plus lourds. Elle peut être partielle ou totale. Les ovaires sont conservés, si possibles, pour leur fonction endocrine, sauf s'ils sont en mauvais état ou porteurs de kystes.

Les nouvelles techniques

-L'embolisation est un nouveau procédé médical qui consiste à assécher le léiomyome en bloquant les veines afférentes, ce qui permet de réduire sa taille et ainsi de faire disparaître les symptômes. Pour cela, on injecte des micro-billes qui ont

pour effet de bloquer l'apport d'oxygène et de nutriments. En plus de permettre de conserver l'utérus, cette intervention est moins pénible que la myomectomie et permet une convalescence plus rapide. Cependant, il y a certaines contre-indications (fibromes trop volumineux, positionnés vers l'extérieur de l'utérus).

-La myolyse par laser est basée sur la combinaison d'un traitement médical préalable par un analogue de la GnRH suivi d'une dévascularisation du fibrome effectuée par des tirs de laser sur sa couronne vasculaire.

-Le traitement par ultrasons focalisés guidés par résonance magnétique. Cette technique repose sur le pouvoir thermique des ultrasons. Le médecin va cibler la tumeur avec un faisceau d'ultrasons focalisés. Ainsi la tumeur va être détruite de manière thermique (Fennessy, Tempny et al. 2007). Cette technique semble avoir des résultats convaincants sur le long terme en réduisant les léiomyomes et leurs symptômes.

I-2 Les modèles d'étude des léiomyomes utérins

I-2 1 Les rates EKER et la lignée de cellules ELT3

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier les léiomyomes, à savoir le modèle du rat Eker (Everitt, Wolf et al. 1995), du porc de Guinée (Dallenbach and Thomas 1982) et de souris transgéniques (Romagnolo, Molina et al. 1996).

Parmi tous ces modèles, celui de rates Eker est d'un intérêt particulier et demeure à ce jour le meilleur pour l'étude des léiomyomes (Walker, Hunter et al. 2003; Crabtree, Jelinsky et al. 2009). En effet les rates Eker développent spontanément et fréquemment des léiomyomes en raison d'une mutation germinale au niveau du gène suppresseur de tumeurs Tsc-2 (Tuberous sclérosis 2). Cette mutation résulte de l'insertion d'un rétrovirus endogène entre les exons 30 et 31 du gène Tsc-2 (Kobayashi, Hirayama et al. 1995).

En outre les léiomyomes utérins des rates Eker possèdent de nombreuses caractéristiques phénotypiques et histologiques communes aux léiomyomes humains. Ils sont souvent multiples, sensibles aux stéroïdes et se transforment rarement en tumeur cancéreuse (Everitt, Wolf et al. 1995). Plus récemment, des études de transcriptomes par « microarray » comparant les léiomyomes et le myomètre sain provenant de tissus humains et de rates, montrent que la majorité des gènes dérégulés en condition pathologique sont identiques chez les deux espèces (Crabtree, Jelinsky et al. 2009).

Les lignées cellulaires issues de ces tumeurs (Tableau 1) maintiennent les caractéristiques de ces fibromes. En particulier les cellules de la lignée ELT3 (Eker Leiomyoma Tumor-derived) expriment les récepteurs à l'oestrogène et à la progestérone et elles ont été utilisées avec succès dans de nombreuses études pour étudier les modulations hormonales des léiomyomes (Howe, Everitt et al. 1995; Walker 2002; Robin, Chouayekh et al. 2005). De plus, la xénogreffe de cellules ELT3 dans des souris Nudes immuno-déficientes permet la formation de tumeurs (Salama,

Kamel et al. 2007; Tsuiji, Takeda et al. 2010), permettant ainsi d'évaluer in vivo, à long terme, l'impact de molécules thérapeutiques sur la régression de la taille de ces tumeurs.

	ELT-3	ELT-4	ELT-6	ELT-9	ELT-10
Actine de Muscle lisse	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Desmine	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Récepteur aux œstrogènes	Positive(Kd = 0.7 nM)	Positive	Négative	Positive	Positive
Récepteur aux progestérones	Positive (Kd = 1.3 nM)	Positive	Négative	Positive	Positive
Tumorigénicité dans des souris nude	Tumorigène	Non tumorigène	Non tumorigène	Non tumorigène	Non tumorigène

Tableau 1. Caractéristiques des lignées ELT

INTRODUCTION PARTIE 2

II Les Lipides Bioactifs

Les lipides sont connus depuis longtemps pour leur rôle structural déterminant dans la constitution des membranes biologiques (phospholipides et cholestérol) et leur rôle fondamental dans le stockage de l'énergie, principalement sous forme de triglycérides, dans les organes de réserve des plantes et des animaux. Durant les dernières décennies, les lipides se sont vus reconnaître un rôle de médiateurs capable d'induire différentes activités biologiques et pouvant être synthétisés en réponse à un stimulus primaire leur permettant d'agir en tant que second messenger. Ces médiateurs lipidiques sont principalement issus de la transformation de lipides membranaires, principalement des glycérophospholipides et des sphingolipides.

II-1 L'acide lysophosphatidique

L'acide lysophosphatidique (LPA) est le plus simple des glycérophospholipides naturels. Il est composé d'une molécule de glycérol phosphorylée en position 3 et acylée en position 1 ou en position 2, l'autre fonction alcool restant libre. Le LPA a d'abord été caractérisé en tant qu'intermédiaire de synthèse des glycérides et de phospholipides plus complexes tels que la phosphatidylcholine ou la phosphatidylsérine. Il s'est avéré par la suite que le LPA n'avait pas seulement un rôle de précurseur, mais qu'il était capable d'induire des phénomènes comme la prolifération cellulaire ou la contraction de cellules musculaires lisses mais aussi de provoquer l'agrégation plaquettaire. Au cours des années 80-90, il a été observé que les effets cellulaires du LPA faisaient intervenir des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) activant une multitude de voies de signalisation conduisant à de nombreux effets cellulaires.

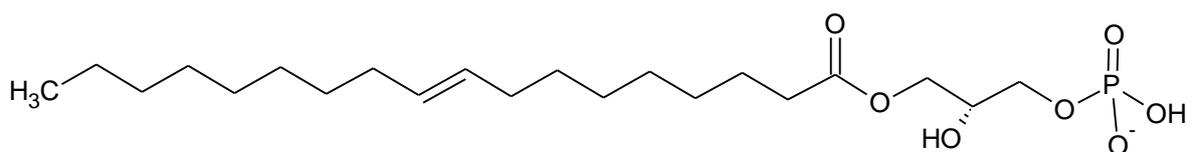


Schéma 6. Acide Lysophosphatidique (acide oléique, LPA18:1)

II-1 1 Synthèse du LPA

Les mécanismes de synthèse du LPA ont été pendant de longues années peu connus. En effet, le LPA peut être synthétisé à l'intérieur de la cellule mais aussi à l'extérieur de la cellule, dans les fluides biologiques, lieu de nombreuses réactions où il était difficile d'isoler les réactions propres au LPA (Schéma 7).

II-1_1_1 Synthèse intracellulaire

La synthèse intracellulaire de LPA correspond à la première étape commune de biosynthèse des glycérides et de certains phospholipides. La réaction consiste en l'acylation du glycérol-3-phosphate par la Glycérol-3-Phosphate AcylTransférase (GPAT) (Coleman and Lee 2004). Le LPA ainsi formé est ensuite acylé en position 2 du glycérol sous l'action de l'acylglycérol-phosphate acyltransférase (AGPAT = LPAAT).

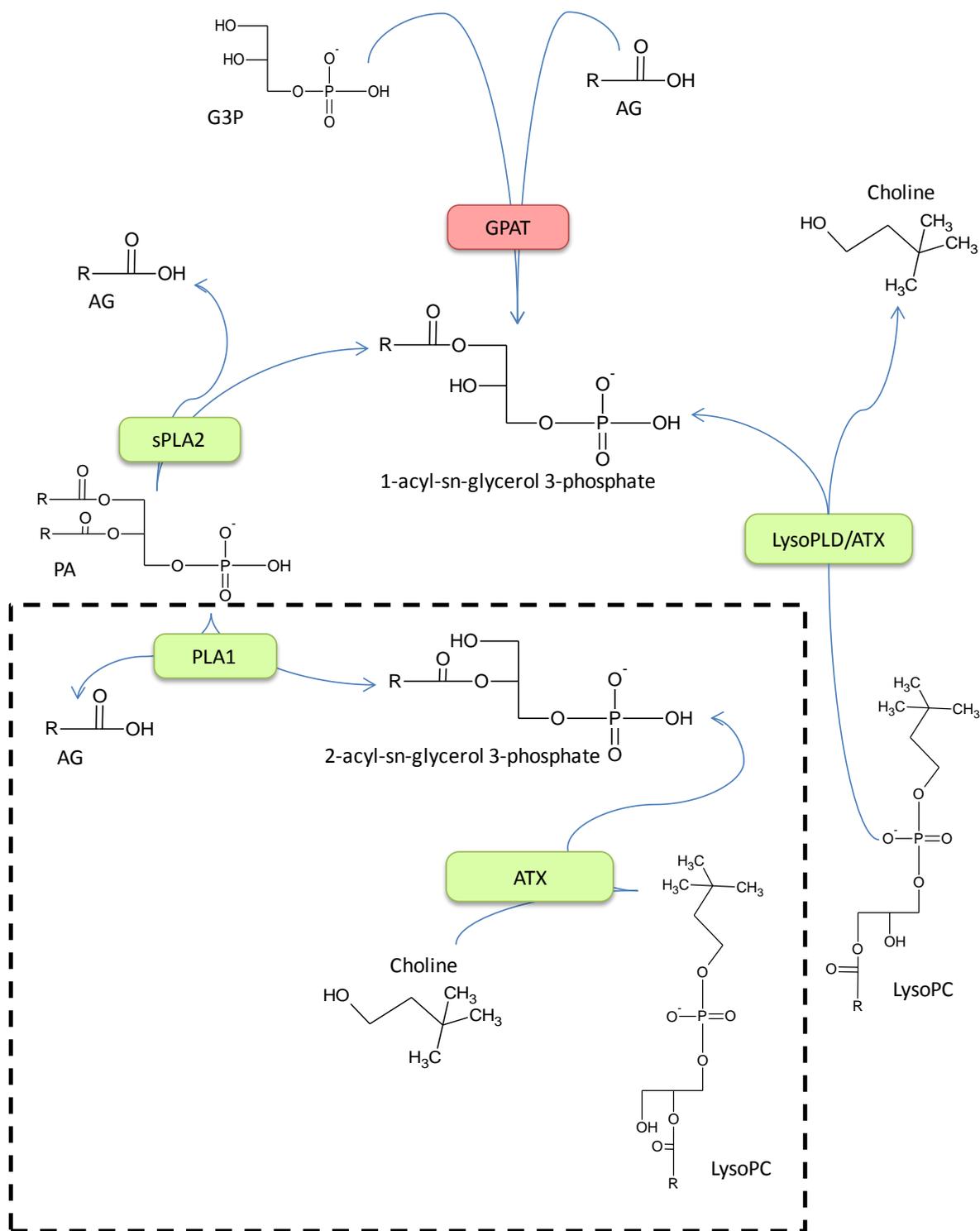


Schéma 7. Voie de synthèse de l'acide lysophosphatidique. Dans l'encadré mécanisme de synthèse de l'acide phosphatidique acylé en position 2 du glycérol. AG, acide gras; ATX, Autotaxine; GPAT, Glycérol 3-phosphate Acyl Transférase; G3P; glycerol 3-phosphate; LysoPC, lysophosphatidyl Choline; PA, phosphatidic acid; PLA1, phospholipase A1; sPLA2, phospholipase A2 sécrétée.

II-1_1_2 L'autotaxine (ATX) ou lysophospholipase D

Déjà au milieu des années 80 l'équipe de Tokomura avait mis en évidence, dans le plasma, une activité lysophospholipase D (LysoPLD) capable de synthétiser du LPA par hydrolyse de la lysophosphatidylcholine (LPC) (Tokomura, Harada et al. 1986). Ce n'est que dans les années 2002 que l'autotaxine (ATX), une enzyme connue comme un facteur de stimulation de la motilité des cellules tumorales, a été identifiée comme la lysoPLD présente dans le plasma et responsable de la production de LPA (Tokomura, Majima et al. 2002; Umezu-Goto, Kishi et al. 2002). L'ATX fait partie de la famille des Ecto-Nucléotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (ENPP). Cette famille est caractérisée par des activités enzymatiques capables d'hydrolyser les liaisons phosphodiesters de nombreux nucléotides comme l'ATP ou l'ADP. Cependant l'ATX montre des capacités à hydrolyser la LPC en LPA avec une très forte affinité. La spécificité enzymatique de l'ATX semble être liée à la disponibilité de son substrat, la LPC, qui est présente en très grande quantité dans le plasma et le sérum ($> 100 \mu\text{M}$). Cependant l'ATX ne semble pas discriminer la tête des lysophospholipides et par conséquent serait capable d'hydrolyser d'autres substrats lysophospholipidiques tels que la lysophosphatylsérine et la sphingosylphosphorylcholine (Tania, Khan et al. 2010). L'ATX est une protéine constitutivement active, mais un des mécanismes pouvant réguler son activité serait une auto-inhibition par son produit : le LPA (van Meeteren, Ruurs et al. 2005).

L'ATX a été initialement caractérisée dans des cellules de mélanome humain (Stracke, Krutzsch et al. 1992). C'est une enzyme soluble de 125 kDa codé par un seul gène présent sur le chromosome 8 chez l'homme et sur le chromosome 15 chez la souris. La transcription du gène de l'ATX dépend de plusieurs facteurs de transcription comme NFAT-1, Hoxa13 et v-jun qui produisent 3 variants d'épissage (α , β et γ) (Giganti, Rodriguez et al. 2008). L'ATX possède 2 domaines somatomedine-B like (SMB), un domaine comprenant l'activité PLD/phosphodiesterase (PDE) et un domaine nucléase-like. Les domaines SMB sont responsables de l'interaction de l'ATX avec les plaquettes activées. Très récemment

deux équipes ont révélé la structure tridimensionnelle de l'ATX (Schéma 8). L'analyse de la structure montre que le domaine PDE interagit avec le domaine nucléase like et avec les 2 domaines SMB. De plus, la structure révèle que l'ATX possède un « tunnel » hydrophobe qui permet aux lipides d'accéder au site catalytique. Ce tunnel n'est pas présent dans les autres protéines de la famille ENPP, ce qui expliquerait la propriété unique de l'ATX d'utiliser des lipides comme substrat. Par ailleurs, l'ATX interagissant avec la membrane plasmique via les domaines SMB, le tunnel pourrait aussi servir à « déposer » directement le LPA nouvellement formé tout proche de son récepteur (Hausmann, Kamtekar et al. 2011; Nishimasu, Okudaira et al. 2011).

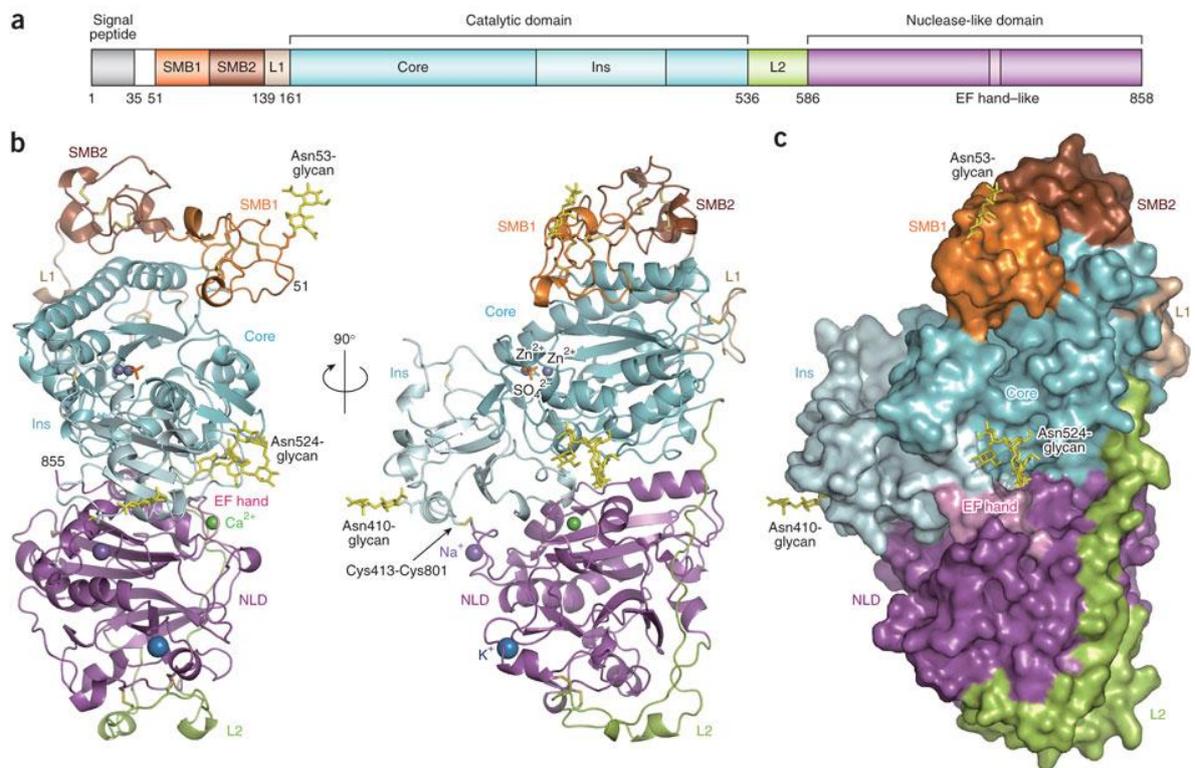


Schéma 8. Structure de l'autotaxine. A, représentation schématique des différents domaines de l'ATX. B, représentation 3D de l'ATX (D'après Nishimasu, Okudaira et al. 2011).

L'ATX est exprimée dans de nombreux tissus (Mills and Moolenaar 2003) : on trouve une importante quantité d'ARN messagers de l'ATX dans le cerveau, les ovaires, les poumons, les intestins ou les reins. La surexpression de l'autotaxine

entraîne de graves troubles physiologiques, et le KO chez la souris est létal. En effet, des souris ATX-déficientes meurent au stade embryonnaire de 9,5 jours avec une absence de système vasculaire et de gros défauts du tube neural. Tout cela révèle un rôle critique de l'autotaxine dans le développement du système vasculaire et du système nerveux qui s'explique par une absence de signalisation régulée par le LPA (via la protéine $G_{12/13}$) activant la petite protéine G RhoA impliquée dans l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire. D'autre part, l'autotaxine intervient dans le développement de nombreux cancers et tumeurs où elle est surexprimée (sein, rein, thyroïde, lymphome de Hodgkin). Elle semble accroître le caractère invasif et métastatique de certaines tumeurs, comme le cancer du sein (Yang, Lee et al. 2002), via une production de LPA qui va stimuler la chimio-attraction, l'angiogenèse, la mobilité cellulaire et donc l'invasion de nouveaux tissus par des cellules cancéreuses (Nam, Clair et al. 2001). Son caractère proangiogénique permet également aux tumeurs de se développer plus rapidement en leur créant un microenvironnement hypervascularisé, qui leur fournit tous les nutriments nécessaires à une prolifération cellulaire importante. Il semble que les effets cellulaires liés à une surexpression de l'autotaxine soient directement liés à une production excessive de LPA et d'une activation plus importante des différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie ou la migration (Mills and Moolenaar 2003). A l'heure actuelle, l'autotaxine fait l'objet de nombreuses recherches, afin de trouver des inhibiteurs pharmacologiques pour créer de nouvelles thérapies anti-cancer qui permettraient de réduire son effet dans le développement des tumeurs.

L'ATX malgré sa ressemblance avec les phosphodiesterases (PDE), reste insensible aux inhibiteurs connus des PDE. Jusqu'à maintenant, peu d'inhibiteurs de l'ATX ont été caractérisés notamment à cause de l'absence d'information sur la structure 3D de la protéine. Cependant, quelques inhibiteurs, comme le palmitoyl α -bromométhylène phosphonate (BrP-LPA), le NSC 48300 ou le FTY-720, ont été testés. Ils diminuent la croissance tumorale chez la souris, réduisent la motilité de cellules tumorales *in vitro*, ou encore diminuent la progression de métastases (Saunders, Ouellette et al. 2008; van Meeteren, Brinkmann et al. 2008; Zhang, Xu et al. 2009). Ces trois inhibiteurs sont efficaces à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentration élevée pour une éventuelle utilisation en *in vivo*. Un

nouvel inhibiteur, le S32826, plus prometteur a été mis en évidence par l'équipe de G Ferry (Ferry, Moulharat et al. 2008). En effet, il est actuellement le seul inhibiteur capable de réduire significativement l'activité de l'ATX à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Cette molécule est capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales en culture en inhibant la synthèse de LPA. Cependant cette molécule à une structure très hydrophobe et une très faible solubilité et stabilité dans les milieux aqueux (Ferry, Moulharat et al. 2008). Récemment des composés dérivés du S32826 ont montré une meilleure inhibition de l'ATX ainsi qu'une meilleure solubilité dans les milieux aqueux, comme le plasma où la molécule a une demi-vie de l'ordre de 10 h (Gupte, Patil et al. 2011). La publication récente de la structure 3D de l'ATX devrait contribuer fortement à la synthèse de nouveaux inhibiteurs encore plus spécifiques.

II-1_1_3 Les phospholipases A2 secrétées

Une autre possibilité pour former du LPA est la déacylation de l'acide phosphatidique (PA) par des enzymes de type phospholipase A2 secrétée (sPLA2). Les phospholipases A2 forment une grande famille d'enzymes qui hydrolysent les glycérophospholipides au niveau de la liaison ester en position 2 du glycérol. Les PLA2 se décomposent en trois groupes, Les PLA2 calcium indépendantes (iPLA2), les PLA2 cytosoliques (cPLA2) et les PLA2 secrétées (sPLA2). Actuellement 11 sPLA2 différentes ont été caractérisées (sPLA IB, IIA, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, et XIIB). Elles sont divisées en 3 sous-groupes : le groupe des conventionnelles qui comprend les sPLA2 I, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, Y, et X ; le groupe des sPLA2 atypique III et le groupe des atypique XII comprenant sPLA2 XIIA et XIIB. Les sPLA2 sont de petites protéines qui font entre 13 et 20kDa, excepté pour la sPLA2 III qui avoisine les 55 kDa dû à une extension en N et en carboxy-terminale. Les sPLA2 sont caractérisées par la présence de 6 ponts disulfures extrêmement conservés. Initialement découverts dans le venin de certains serpents ou scorpions, on retrouve les sPLA2 dans de nombreux fluides biologiques comme les sucs pancréatiques ou le liquide synovial (Lambeau and Gelb 2008; Burke and Dennis 2009; Murakami, Taketomi et al. 2011). Les sPLA2, en hydrolysant le PA, qui est lui-même issu du métabolisme des glycérophospholipides, produisent un acide gras et du LPA.

Cependant, on trouve ces protéines dans le milieu extracellulaire ou associées au feuillet externe de la membrane plasmique et par conséquent loin du PA qui, lui, est plutôt supposé se trouver dans le feuillet interne de la membrane. Cependant, dans certaines situations où l'asymétrie membranaire est perturbée (apoptose, inflammation, activation des plaquettes) le PA peut être présent dans le feuillet externe de la membrane ou être libéré dans des microvésicules (Fourcade, Simon et al. 1995; Saulnier-Blache 2004).

II-1_1_4 Les phospholipases A1

Les Phospholipases A1 (PLA1) sont définies par une activité catalytique qui hydrolyse la fonction ester des phospholipides en position 1 du glycérol. Il existe des PLA1 intracellulaires et des PLA1 sécrétées extracellulaires. Parmi les PLA1 extracellulaires, certaines hydrolysent spécifiquement le PA en 2-acyl LPA, il s'agit des PA-PLA1 α appelées aussi Lipase H (LIPH) et PA-PLA1 β ou Lipase I (LIPI). Elles ont été découvertes par homologie de séquence avec les PS-PLA1 qui sont des phospholipases A1 spécifique de la phosphatidylsérine (PS) et qui forment du 2-acyl-lysophosphatidylserine (LPS) (Sonoda, Aoki et al. 2002; Hiramatsu, Sonoda et al. 2003). Ces lipases ont montré un rôle dans la croissance et le développement des follicules capillaires. En effet, LIPH, via la formation de LPA et l'activation du récepteur LPA6/P2Y5, induit une synthèse de TGF α qui influence la croissance capillaire (Inoue, Arima et al. 2011).

II-1_2 Dégradation du LPA

La principale voie de dégradation du LPA correspond à sa déphosphorylation en monoacylglycérol. Cette déphosphorylation est essentiellement catalysée par les enzymes de la famille des LPP. Toutefois, des données récentes indiquent que les enzymes de la famille des Epoxyde Hydrolases solubles sont aussi capables de réaliser cette réaction de déphosphorylation. Par ailleurs, même en absence de

preuves expérimentales on peut supposer que des enzymes de la famille des phospholipases A pourraient hydrolyser le LPA en glycérol-3 phosphate et acide gras (Schéma 9).

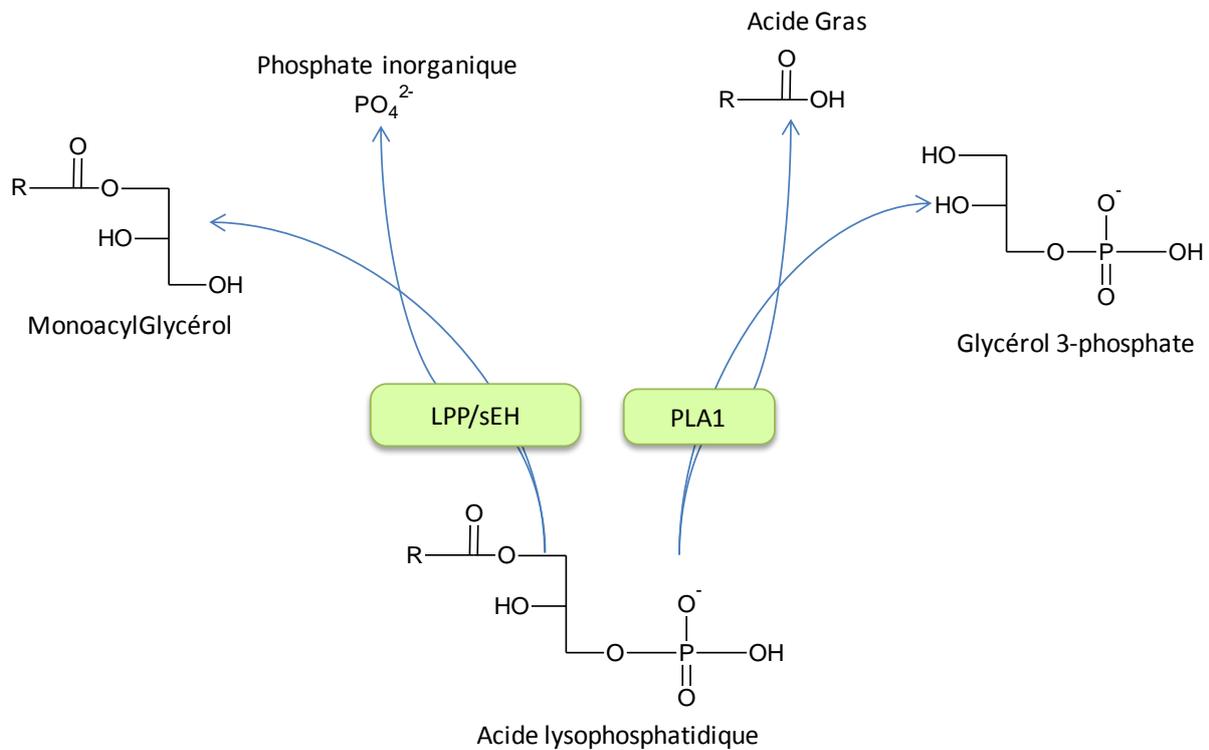


Schéma 9. Voies de dégradation de l'acide lysophosphatidique. LPP, Lipide-phosphate phosphatase; sEH, soluble époxyde Hydrolase; PLA1, phospholipase A1.

II-1_2_1 Les Lipides-Phosphates Phosphatases

Il existe trois isoformes de LPPs, ce sont des protéines transmembranaires qui déphosphorylent de nombreux phospholipides, tels que le LPA, le PA, la S1P ou la céramide-1-phosphate (Pyne, Kong et al. 2004). Ce sont des enzymes qui possèdent une ecto-activité, c'est-à-dire que leur site catalytique se situe à l'extérieur de la cellule ou dans la lumière des compartiments membranaires internes. Cette caractéristique leur permet d'hydrolyser les lipides extracellulaires ou situés dans le feuillet externe de la membrane (Brindley, English et al. 2002). Du fait de leur activité catalytique envers certain lipide bioactifs comme le LPA ou la S1P, les LPPs vont

influencer certains processus cellulaires comme la prolifération, la survie, l'apoptose, la différenciation ou la migration en régulant la quantité de ces lipides (Pyne, Kong et al. 2004). Ces enzymes sont décrites plus loin (paragraphe III, page 68)

II-1_2_2 Les Epoxyde Hydrolases Solubles (sEH)

L'époxyde hydrolase a été initialement découverte comme une enzyme capable de dégrader les lipides contenant des époxydes. C'est une protéine de 63 kDa, qui possède une activité différente à chaque extrémité. On retrouve côté carboxy-terminal l'activité initiale, c'est-à-dire, l'activité époxyde hydrolase et côté amino-terminale on trouve une activité phosphatase. Tout récemment, il a été observé par l'équipe de Morisseau, que l'activité phosphatase de la sEH, nécessitait la présence d'ions magnésium et qu'elle était capable non seulement de dégrader le LPA, mais que cette activité était supérieure au LPP dans des études *in vitro* (Morisseau, Schebb et al. 2012). Ces résultats sont encore très préliminaires, et des études supplémentaires sont nécessaires, mais ceci ouvre une nouvelle possibilité de régulation du LPA et de ces effets cellulaires.

II-1_3 La signalisation du LPA

Il est maintenant bien admis que le LPA est une molécule de signalisation capable d'induire un large panel d'effets cellulaires, à travers l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Le LPA étant majoritairement extracellulaire, il va se fixer sur des récepteurs pour induire ces effets, cependant, il semble aussi capable d'avoir quelques effets intracellulaires indépendants des récepteurs membranaires.

II-1_3_1 Les récepteurs membranaires du LPA

Les récepteurs aux LPA sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). A l'heure actuelle 9 récepteurs au LPA ont été caractérisés, avec la possibilité d'en découvrir d'autres dans les années à venir. Les récepteurs au LPA peuvent être classés en 2 familles. Tout d'abord la famille EDG (Endothelial Differentiation Gene) qui comprend les 3 premiers récepteurs découverts et les mieux caractérisés à ce jour. Ces récepteurs sont de la même famille que ceux de la S1P, un autre médiateur lipidique. La seconde famille est une famille apparentée aux récepteurs purinergiques P2Y. Le premier récepteur, le LPA₁, fut caractérisé vers 1996 par l'équipe de J. Chun (Hecht, Weiner et al. 1996) suivi par les récepteurs LPA₂ et LPA₃ (An, Bleu et al. 1998; Bandoh, Aoki et al. 1999). Ce n'est que plus tard que des récepteurs orphelins de la famille des récepteurs purinergiques ont été desorphelinisés. Notamment le récepteur LPA₄ ou p2y9/GPR23 (Noguchi, Ishii et al. 2003) ne partage que 20-24 % d'identité de séquence avec les récepteurs de la famille EDG. Le récepteur LPA₅/GPR92 (Kotarsky, Boketoft et al. 2006; Lee, Rivera et al. 2006) possède environ 35 % d'identité de séquence avec le récepteur LPA₄. En 2007, un nouveau récepteur au LPA, le GPR87/LPA₆, possédant une forte homologie avec les autres récepteurs P2Y au LPA, fut desorphelinisé (Tabata, Baba et al. 2007). L'année d'après, les récepteurs purinergiques P2Y₅/LPA₇ et P2y10/LPA₈ le furent également (Murakami, Shiraishi et al. 2008; Pasternack, von Kugelgen et al. 2008). Enfin tout récemment le récepteur GPR35/LPA₉ fut découvert par l'équipe d'Oka en 2010 comme un récepteur au LPA (Oka, Ota et al. 2010). Tous ces récepteurs peuvent se coupler à différentes protéines G. Ainsi les récepteurs LPA₁ et LPA₂ peuvent se coupler aux protéines G_{12/13}, Gi et Gq. Le récepteur LPA₃ peut se coupler aux protéines Gq et Gi. Le récepteur LPA₄/P2y9 peut se coupler aux protéines G_{q/11} et G_{12/13}. Le récepteur LPA₅/GPR92 peut se coupler à la protéine Gq. Le récepteur LPA₆ semble pouvoir se coupler aux protéines G_q et G₁₆. Le LPA₇/P2Y₅ active les protéines G_q, G_s et G_{12/13}. Le LPA₈/P2Y10 les protéines Gq et G₁₆. Et enfin, le récepteur GPR35/LPA₉ n'a pas été suffisamment caractérisé pour le moment et les protéines G auquel il est couplé n'ont pas été déterminées.

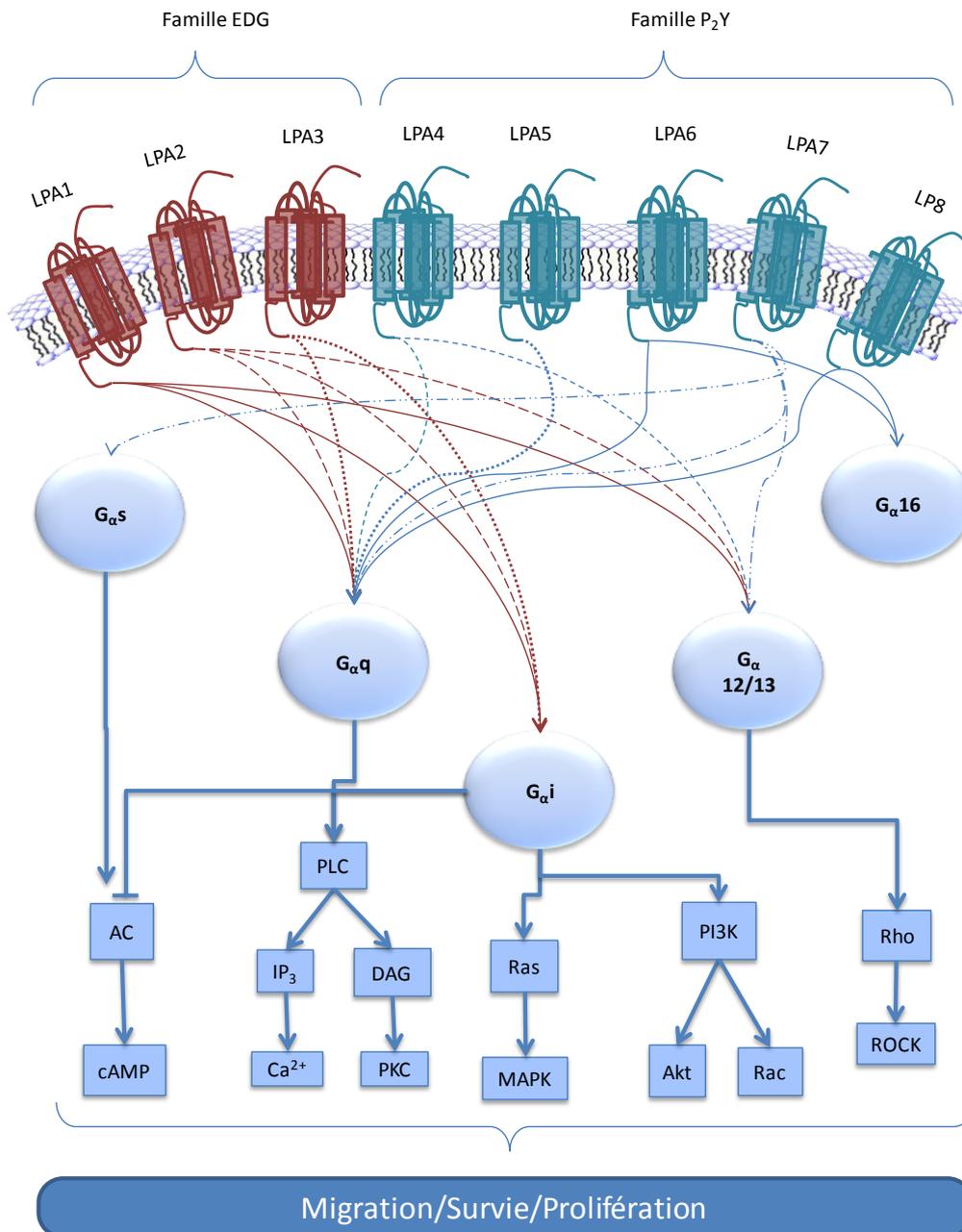


Schéma 10. Voies de signalisation cellulaire de l'acide lysophosphatidique. AC, Adenylate Cyclase; cAMP, AMP cyclique; DAG, diacylglycérol; IP₃, Inositol triPhosphate, MAPK, Mitogen activated protein kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protéine Kinase C; PLC, phospholipase C; ROCK, Rho Kinase (D'après Blaho and Hla 2011).

L'activation des récepteurs entraîne l'activation de la protéine G à laquelle ils sont couplés et induit l'activation de différentes voies de signalisation. Parmi ces voies de signalisation on trouve la voie de la phospholipase C (PLC), activée par la protéine Gq, et qui va induire une production du second messenger l'IP₃ et de DAG,

provoquant l'activation de la protéine kinase C (PKC) et un influx de calcium. L'activation des protéines $G_{12/13}$ entraîne l'activation de la petite protéine G Rho. L'activation de la protéine G_i peut activer la voie PI3K ou la voie MAP kinases ERK1/2 et peut inhiber la voie adénylate cyclase. L'activation de la protéine G_s permet l'activation de l'adénylate cyclase et la production de l'AMP cyclique comme second messenger, ce qui induit l'activation de la protéine kinase A (PKA). L'activation de ces différentes voies de signalisation entraîne différents effets cellulaires tels que la survie, la prolifération, la migration et la contraction (Okudaira, Yukiura et al. 2010).

Le récepteur nucléaire PPAR γ

Le peroxysome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ) est un récepteur nucléaire qui, une fois activé, induit la transcription de certains gènes. Dans les années 2004, une équipe a montré par des études *in vitro* que le LPA était capable d'induire l'activation de ce récepteur (McIntyre, Pontsler et al. 2003). Cependant, l'idée que le LPA pouvait activer le récepteur PPAR γ reste très controversée notamment parce que le LPA extracellulaire est supposé ne pas pouvoir traverser la membrane plasmique pour rentrer dans la cellule. De plus, il était acquis que le LPA intracellulaire n'avait qu'un rôle d'intermédiaire métabolique. Cependant, une nouvelle étude a pu montrer que le LPA intracellulaire formé par la GPAT était également capable d'induire une activation de PPAR γ (Stapleton, Mashek et al. 2011). Des études plus approfondies seront nécessaires pour établir définitivement le rôle du LPA intracellulaire.

II-1_3_2 Les voies de signalisation impliquées

Le module MAP kinase ERK $_{1/2}$

Les Mitogen-Activated Protein kinases (MAPK) de la famille ERK interviennent dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Kyriakis and Avruch 2012). Elles sont activées par différents stimuli

provenant de l'interaction de ligands avec des récepteurs (RTK, GPCR) ou en réponse à des stress extérieurs. Ces MAPK constituent le dernier élément d'une « cascade » (ou module) composé de trois kinases qui sont successivement activées par phosphorylation (schéma 11). La première de ces kinases est une MAPK kinase (MAPKKK ou MAP3K). Les MAP3K sont des ser/thr kinases qui une fois activées vont phosphoryler une MAPK kinase (MAPKK ou MAP2K). Les MAP2K sont des kinases particulières qui possèdent une double spécificité puisqu'elles phosphorylent les résidus thréonine et tyrosine d'un motif Thr-X-Tyr situé dans la boucle d'activation du domaine catalytique des MAPK. Les MAPK sont des ser/thr kinases qui phosphorylent leurs substrats sur des résidus sérine ou thréonine immédiatement suivis d'une proline, d'où leur nom de « proline-directed kinase ». Cependant, la spécificité des MAPK pour leurs substrats physiologiques est principalement dictée par la présence de sites de liaison souvent assez distants des sites de phosphorylation.

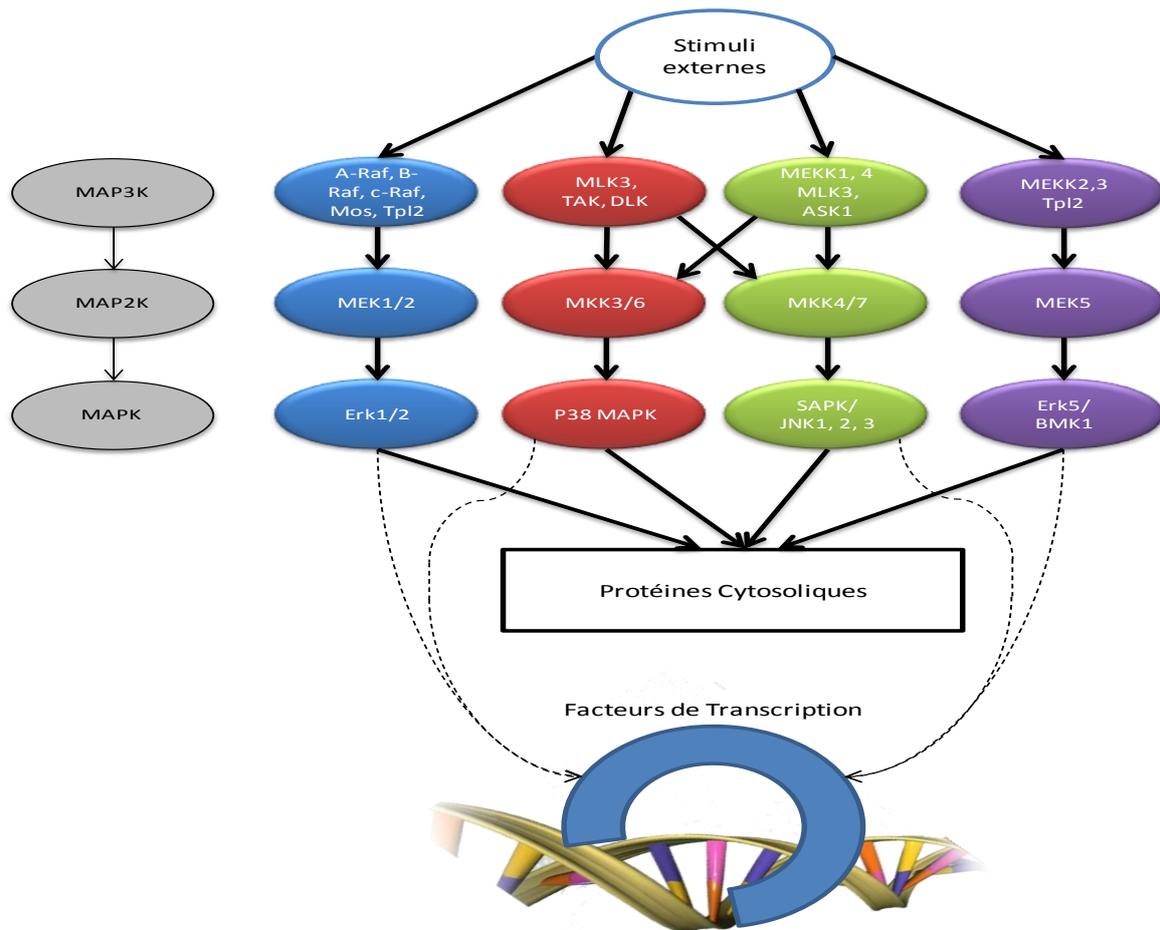


Schéma 11. Voies des MAP kinases.

La première étape d'activation de ce module fait intervenir des petites protéines G (également appelé MAPKKKK ou MAP4K). Les petites protéines G composent la superfamille des protéines Ras parmi lesquels Ras, Rho, Rab, Arf et Ran. Ce sont des GTPases monomériques qui sont associées à la face interne de la membrane plasmique grâce à un groupement isoprényl en C-terminal. Le module MAP kinase ERK est principalement activé par la protéine Ras. Quatre isoformes de Ras ont été identifiées chez les mammifères: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A et K-Ras4B, qui présentent des niveaux d'expression différents suivant le type cellulaire (Bar-Sagi 2001). L'activité biologique de Ras, ainsi que celle de tous les membres de sa famille, est contrôlée par un cycle GDP/GTP régulé par deux types de protéines : les protéines GEF (guanine nucleotide exchange factors) et les protéines GAP (GTPase activating proteins). Dans la signalisation cellulaire impliquant les récepteurs à

activité tyrosine kinase, l'activation de Ras fait intervenir GEF et SOS. En réponse à un stimulus, la protéine SOS est recrutée à la membrane grâce à l'interaction avec les protéines Grb2, qui est une protéine adaptatrice interagissant avec les tyrosines phosphorylées des récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette translocation à la membrane permet à SOS de faciliter l'échange GDP/GTP. Dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G, la voie d'activation de Ras n'a pas encore été totalement déterminée. Certaines études montrent une participation de la protéine Src via l'activation d'une protéine Gi (Kranenburg and Moolenaar 2001).

Une fois les protéines Ras activées, elles vont interagir directement avec les protéines Raf (A-Raf, B-Raf et c-Raf connue aussi sous le nom de Raf1) qui sont des MAP3K. Les protéines Raf sont des protéines qui sont localisées dans le cytosol sous leurs formes inactives. Les protéines Raf inactives ont leur partie N-terminale en interaction avec la partie C-terminale (où se situe l'activité catalytique) et ainsi s'auto-inhibent. Cette conformation, stabilisée par la liaison d'un dimère 14-3-3, permet non seulement de maintenir la protéine inactive mais permet aussi de dégager le motif de liaison de la protéine Ras active. Ainsi, la liaison de Ras à Raf induit le relargage du dimère 14-3-3 ce qui entraîne l'activation de la protéine Raf.

Dans la suite de la cascade, la protéine Raf active, phosphoryle deux résidus sérine ou thréonine situés dans la boucle d'activation des MEK1/2 (MAP2K spécifique du module ERK). En plus du domaine kinase, MEK1/2 contient trois régions qui sont essentielles pour la régulation de son activité. Le ERK1/2 binding domain aussi appelé Docking domain ou D domain, est localisé au niveau de la queue N-terminale de l'enzyme et intervient dans l'interaction de MEK1/2 avec ERK1/2 (Tanoue et al., 2000). Un domaine riche en proline situé dans la partie C-terminale du domaine catalytique de MEK1/2 regroupe des sites qui favorisent l'association de MEK1/2 à des protéines de liaison. C'est le cas de la protéine MP-1 (MEK-Partner 1), une protéine essentielle dans l'initiation de l'interaction de MEK1 et ERK1. Par ailleurs, une séquence très active d'exportation nucléaire réside dans la région N-terminale et elle est principalement responsable de la localisation cytosolique de MEK1/2 (Roskoski 2012).

Enfin, cette cascade se termine par l'activation des MAP Kinases, les protéines ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). Il existe deux isoformes qui possèdent plus de 83% d'homologie, appelé ERK1 et ERK2 correspondant aux MAPK p44 et p42 respectivement. Les protéines ERK1/2 vont être activées via la phosphorylation catalysée par les MEK1 et 2. En effet, les MEK1/2 phosphorylent les protéines ERK1/2 sur des résidus thréonine et tyrosine appartenant au motif Thr-Glu-Tyr (TEY) localisé dans la boucle d'activation de l'enzyme (Canagarajah, Khokhlatchev et al. 1997). Cette double phosphorylation entraînera alors la dimérisation et l'activation de l'enzyme. Lorsque les protéines ERK ne sont pas phosphorylées, c'est-à-dire dans un état inactif, elles sont localisées dans le cytoplasme des cellules. Lors de leur activation, une grande majorité d'entre elles vont rapidement transloquer dans le noyau. (Chen, Sarnecki et al. 1992; Lenormand, Sardet et al. 1993). Une fois activées, elles vont pouvoir phosphoryler un grand nombre de substrats différents notamment les membres des familles des « S6 Ribosomal kinases » (RSK), « Mitogen and Stress activated Kinase » (MSK) ainsi que les « MAPK interacting kinases » (MNK). Etant donné le nombre et la diversité des substrats des protéines ERK1/2 dans les cellules, les conséquences biologiques de leur activation sont elles aussi très variées.

Il a été mis en évidence récemment l'intervention de protéines d'échafaudage dans l'activation du module MAP Kinase. En effet des protéines comme KSR1 (kinase suppressor of Ras 1), MEP1 (MEK-partner 1), sef et la Paxillin interagissent avec les différentes protéines et participent à la transduction du signal. KSR1 est une protéine qui interagit avec les protéines Raf, MEK et ERK et ainsi facilite la phosphorylation de ERK. A l'état de repos, la protéine KSR1 est localisée dans le cytosol et associée à différentes protéines : avec MEK de façon ubiquitaire, mais aussi avec 14-3-3, la protéine phosphatase 2 et la protéine IMP, une ubiquitine ligase. L'activation de Ras-GDP en Ras-GTP entraîne la translocation de KSR1 à la membrane. RasGTP va également rompre l'interaction de KSR1 avec IMP via le recrutement de IMP à la membrane et son auto-ubiquitination. Ras-GTP active aussi la protéine phosphatase 2 (PP2A) qui déphosphoryle KSR1 au niveau de l'interaction avec 14-3-3. Cette déphosphorylation entraîne un changement de conformation de KSR1 qui permet l'interaction avec la protéine ERK. Enfin, l'interaction de ce

complexe avec la protéine Raf active va entraîner l'activation de MEK et de ERK (Schéma 12) (McKay and Morrison 2007). Comme décrit ci-dessus, il existe d'autres protéines d'échafaudage. Ainsi, la protéine MP1 est capable d'interagir avec ERK1 et MEK1 au niveau des endosomes tardifs issus du recyclage de récepteurs, via l'interaction avec la protéine p14, marqueur spécifiques des endosomes tardifs, et ainsi participer à l'activation de ERK via Ras-GTP, Raf, et MEK. D'autres protéines comme la Paxillin au niveau des adhérences focales ou la protéine Sef au niveau du golgi forment des complexes avec les protéines Raf, MEK et ERK, et facilitent, en réponse à Ras-GTP, l'activation de ERK (McKay and Morrison 2007).

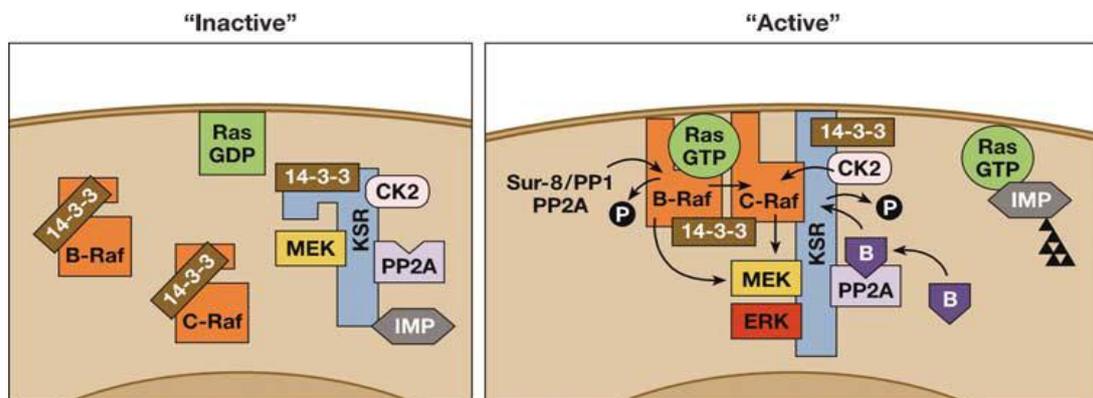


Schéma 12. Activation de la voie MAP kinase ERK via la protéine d'échafaudage KSR (McKay, MM et Morrison, DK. 2007).

Rôle de la voie PLC/PKC dans l'activation des MAPK

La voie PLC/PKC peut également participer à l'activation des protéines ERK1/2 en réponse aux RCPG. En effet, certains de ces RCPG sont couplés à la protéine Gq qui va activer la phospholipase C (PLC). Les PLC sont des enzymes qui hydrolysent la liaison ester entre le glycérol et le phosphate d'un phospholipide. Les PLC hydrolysent principalement le phosphatidyl-inositol 4, 5, diphosphate (PIP₂) générant ainsi deux messagers intracellulaires: l'InsP₃ et le DAG. L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ par l'InsP₃ peut contribuer à l'activation de la tyrosine kinase Ca²⁺-dépendante Pyk2, et à la stimulation des protéines ERK médiée par Pyk2 et la transactivation du récepteur à l'EGF (Eguchi, Numaguchi et al. 1998). De plus, certaines protéines GEF spécifiques de Ras peuvent être activées par le

Ca²⁺ et le DAG (Farnsworth, Freshney et al. 1995; Ebinu, Bottorff et al. 1998). Dans les cellules exprimant ces isoformes de GEF, la petite protéine G Ras peut donc être activée suite à la stimulation des PLC par un mécanisme indépendant de Sos et de la transactivation d'un RTK (Marais, Light et al. 1998). Les PKC peuvent également contribuer à l'activation de la voie Ras/ERK en réponse à la stimulation des RCPG par un mécanisme impliquant cette fois l'inactivation de Ras-GAP (Downward, Graves et al. 1990). De plus, plusieurs isoformes de PKC peuvent phosphoryler et activer directement Raf (Sozeri, Vollmer et al. 1992; Kolch, Heidecker et al. 1993; Ueda, Hirai et al. 1996), et MEK (Takeda, Matozaki et al. 1999; Monick, Carter et al. 2000), conduisant ainsi à l'activation des ERK1/2 indépendamment de l'activation de Ras.

Les PI3K

Plusieurs études ont montré que les activités PI3K sont également impliquées dans l'activation de ERK1/2 en réponse à de nombreux agonistes (Hawes, Luttrell et al. 1996; Cussac, Newman-Tancredi et al. 1999; Yamboliev, Wiesmann et al. 2000) mais les mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont encore mal connus. D'après les résultats de plusieurs études, les PI3K interviennent en amont des petites protéines G (Hu, Klippel et al. 1995; Hawes, Luttrell et al. 1996; Lopez-Illasaca, Crespo et al. 1997). L'activation de Ras par les PI3K fait intervenir des tyrosines kinases qui phosphorylent Shc et permettent le recrutement du complexe Grb2/Sos (Lopez-Illasaca, Crespo et al. 1997). Les produits lipidiques des PI3K pourraient également interagir avec le domaine PH du facteur d'échange Sos, favorisant sa colocalisation avec Ras à la membrane plasmique, bien que cela ne soit pas encore démontré.

D'autre part, la découverte de la PI3K γ , qui est activée par les protéines G hétérotrimériques, suggère que cette kinase pourrait intervenir dans la voie d'activation des ERK1/2. Différents travaux ont montré l'implication de cette isoforme de PI3K dans la stimulation des protéines ERK induite par les RCPG (Lopez-Illasaca, Crespo et al. 1997; Yamboliev, Wiesmann et al. 2000). Certains auteurs suggèrent que c'est l'activité protéine kinase de la PI3K γ plutôt que son activité lipide kinase qui

est responsable de l'activation des ERK1/2. Elle interviendrait en aval de Ras en stimulant la phosphorylation de MEK (Bondeva, Pirola et al. 1998).

Les PI3K pourraient également activer les protéines ERK via la petite protéine G Rac. En effet, le PI(3,4,5)P₃, produit des PI3K, stimule Rac qui va se lier aux protéines Pak et les activer. Il a été récemment démontré que la protéine Pak3 phosphoryle Raf-1 au niveau de la sérine 338, un des sites requis pour l'activation de Raf (King, Sun et al. 1998).

II-1_3_3 Effets physiologiques et physiopathologiques du LPA

Le LPA permet la prolifération de nombreux types cellulaires. En agissant sur ses récepteurs il peut activer les MAP kinases ERK1/2. Cet effet peut être renforcé par transactivation du récepteur de l'EGF. Cet effet s'exerce via l'activation d'une métalloprotéase qui clive le précurseur membranaire de l'EGF et permet sa libération dans le milieu extracellulaire, pour qu'il aille activer de manière autocrine ou paracrine son récepteur (Prenzel, Zwick et al. 1999). Le LPA permet également la prolifération de cellules tumorales ou cancéreuses (Mills and Moolenaar 2003). Ces cellules ont souvent un pouvoir prolifératif plus important et sont très réceptives à des doses normales de LPA, car elles expriment beaucoup plus de récepteur au LPA (van Meeteren and Moolenaar 2007). De la même manière, le LPA stimule la survie de nombreux types de cellules qu'elles soient normales ou transformées. L'activation des récepteurs au LPA peut entraîner l'activation de la voie ERK1/2 ou de la voie PI3K qui sont impliquées dans la survie. Le LPA peut également inhiber l'activité des caspases 3/7 et inactiver la protéine pro-apoptotique Bad (Rusovici, Ghaleb et al. 2007).

Le LPA intervient également dans les phénomènes de migration cellulaire, autant pour le recrutement de cellules du système immunitaire que pour l'invasion de cellules tumorales. Par exemple, le LPA permet l'activation des MAP kinases ERK1/2 et P38 α dans le développement de métastases osseuses (Boucharaba, Serre et al. 2006).

Le LPA est présent en grande quantité dans le sérum puisqu'il peut être produit par les plaquettes en grande quantité. Il permet la cicatrisation de nombreux tissus comme l'épithélium intestinal, la cornée, le derme (Mills and Moolenaar 2003). Le LPA augmente aussi la prolifération, la migration et la cohésion de cellules endothéliales ce qui permet la ré-endothélialisation et le maintien de l'intégrité vasculaire de vaisseaux lésés. On attribue au LPA des propriétés angiogéniques aussi parce qu'il permet la production de VEGF, qui est un puissant facteur pro-angiogénique (Sako, Kitayama et al. 2006).

On trouve du LPA en forte concentration dans le liquide folliculaire. Il semble être impliqué dans la maturation de l'ovocyte. D'autre part, la présence de LPA au niveau des ovaires permet la fusion membranaire entre l'ovocyte et le spermatozoïde lors de la réaction acrosomale (Budnik and Mukhopadhyay 2002). De plus, le LPA peut induire la COX-2 durant l'implantation, ce qui induit la production de prostaglandines et permet d'augmenter la perméabilité vasculaire, l'adhésion à la paroi utérine et donc facilite l'implantation. Des études ont mis en évidence une augmentation de l'activité lysoPLD au cours de la gestation capable de produire une quantité plus importante de LPA. En effet le sérum de femmes enceintes incubé *in vitro* en présence de LPC engendre une plus grande quantité de LPA. De plus, cette activité augmente en relation avec la grossesse, ce qui semble suggérer que le LPA joue un rôle important dans le maintien et le développement de l'embryon (Tokumura, Kanaya et al. 2002). Malgré la présence d'une activité plus élevée *in vitro*, la concentration de LPA dans le sérum des femmes enceintes est similaire au sérum de femmes non gestantes. Ceci suggère que le LPA est produit très localement et il est par la suite dégradé rapidement pour éviter d'engendrer des effets périphériques indésirables (Tokumura, Kanaya et al. 2002). Ainsi, Il a également été observé dans la brebis gestante, aux stades précoces de la gestation, une augmentation des taux de LPA dans l'utérus. Cette augmentation de LPA est corrélée avec une augmentation de l'activité lysoPLD, activité que l'on retrouve à la fois dans les cellules épithéliales utérines et au niveau de l'œuf fécondé (Liszewska, Reinaud et al. 2009). Les récepteurs aux LPA jouent également un rôle dans ces processus de « perpétuation de l'espèce ». En effet, l'expression des récepteurs sont régulées en fonction des phases de la grossesse. Ainsi, il a été montré chez la brebis

au douzième jour de gestation une diminution de l'expression des récepteurs 1 et 3 en comparaison avec des brebis non gestantes. Par contre au 16^e jour de gestation, l'expression du récepteur au LPA3 augmente (Liszewska, Reinaud et al. 2012) ainsi que chez la truie (Kaminska, Wasielak et al. 2008). Cette modification d'expression engendre des modifications de l'endomètre qui semblent favoriser la nidation de l'œuf et son développement.

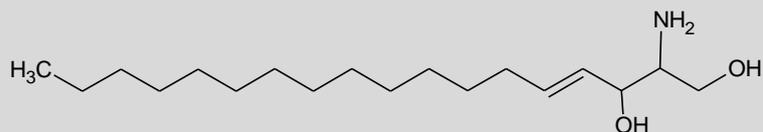
Il a été démontré que le LPA est impliqué dans le développement ou la progression de nombreux cancers et tumeurs tels que le cancers des ovaires, de la prostate, du sein, de la thyroïde ou le mélanome (Mills and Moolenaar 2003). On trouve des taux très élevés de LPA dans les ascites de cancers ovariens (de 1 à 80 μ M) ou dans les cancers de la prostate. De plus, on observe dans ces cancers une expression beaucoup plus importante de l'autotaxine (Mills and Moolenaar 2003), ce qui permet d'augmenter les taux de LPA dans les tumeurs. On observe aussi une surexpression des récepteurs au LPA dans certaines cellules de cancer ovarien (Fang, Schummer et al. 2002). Le LPA ayant des propriétés mitogéniques et angiogéniques, il permet la croissance des cellules cancéreuses et l'expansion des tumeurs en induisant une hypervascularisation. En stimulant la migration cellulaire, le LPA permet la dissémination des tumeurs et donc entraîne l'apparition de métastases (Saulnier-Blache 2004). D'autre part, le LPA est un agent anti-apoptotique ce qui favorise le processus de tumorigénèse. Le LPA apparaît donc comme un marqueur de tumeur, en permettant leur progression (Murph and Mills 2007), et semble être une cible importante dans le développement de thérapies anti-tumorales et anti-cancéreuses. Il est essentiel de connaître les voies de signalisation impliquées dans ces effets afin de déterminer plus finement son implication dans les pathologies. La description de ces voies de synthèse et leur régulation, est également importante (Mills and Moolenaar 2003).

II-2 La sphingosine-1 phosphate

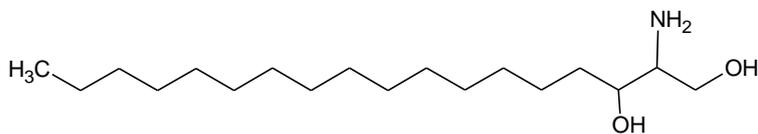
II-2 1 Métabolisme

Au même titre que les glycérophospholipides, les sphingolipides sont présents dans toutes les membranes des cellules eucaryotes et procaryotes. Les sphingolipides sont composés d'une base sphingoïde liée ou non par une liaison amide à un acide gras, on trouve dans cette famille la sphingosine, la céramide, ou la sphingomyéline. Il existe plusieurs types de sphingosines (schéma 13), mais chez les mammifères, on trouve principalement la sphingosine possédant une insaturation en $\Delta 4$ ainsi que la dihydrosphingosine qui ne possède pas d'insaturation. Chez les plantes la forme principale est la phytosphingosine qui n'a pas d'insaturation mais une fonction alcool sur le carbone 4. Ces sphingosines peuvent être phosphorylées sur le carbone 1 pour donner de la sphingosine 1-phosphate. La sphingosine est issue de l'hydrolyse de la liaison amide de la céramide par la céramidase. Chez les mammifères il existe 3 céramidases qui présentent des activités différentes en relation avec le pH : la céramidase acide est localisée dans les lysosomes, la céramidase neutre qui peut être sécrétée et enfin deux sous types de céramidases alcalines localisées dans le réticulum endoplasmique.

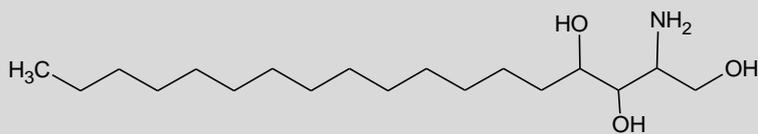
Sphingosine

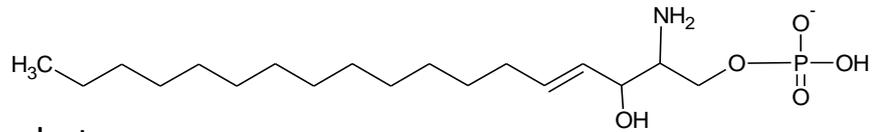


Dihydrosphingosine

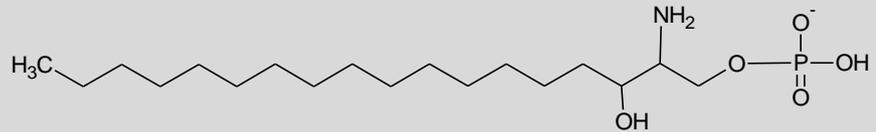


Phytosphingosine

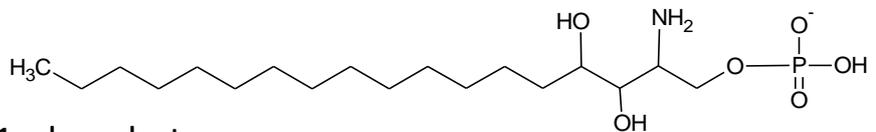




Sphingosine 1-phosphate



Dihydrosphingosine 1-phosphate



Phytosphingosine 1-phosphate

Schéma 13. Structure des principales sphingosines et leurs formes phosphorylées observées chez les plantes et les mammifères.

II-2_1_1 Synthèse de la S1P

Les Sphingosines Kinases

Chez les mammifères deux enzymes phosphorylant la sphingosine ont été caractérisées, les sphingosines kinases 1 et 2 (SphK1 et 2) qui sont responsables de la synthèse de la sphingosine-1-phosphate (S1P). Deux sphingosine kinases ont également été caractérisées chez les plantes, SPHK1, SPHK2 (également appelés LCBK1 ou LCBK2 pour Long Chain Base kinase 1 ou 2) (Berkey, Bendigeri et al. 2012) (Schéma 14).

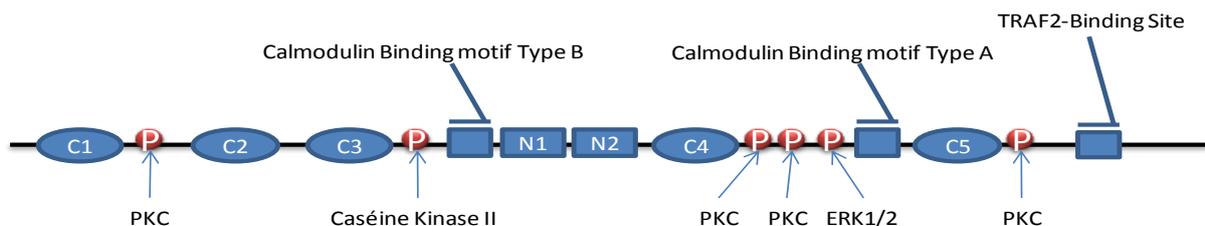


Schéma 14. Représentation schématique des différents domaines de la sphingosine kinase 1 humaine (D'après Taha, Hannun et al. 2006).

Chez l'homme, il existe plusieurs variants d'épissage, ainsi la SphK1 possède trois variants : SphK1a, SphK1b et SphK1c (Venkataraman, Thangada et al. 2006) ; et deux pour la SphK2 : SphK2a et SphK2b (appelées aussi SphK-S et SphK-L) (Okada, Ding et al. 2005). Tous ces variants d'épissage possèdent de fortes homologies de séquence et ne diffèrent que par leur partie N-terminale mais possèdent la même activité enzymatique (Billich, Bornancin et al. 2003). Les SphK possèdent 5 domaines C1 à C5 qui présentent des homologies avec d'autres enzymes. Les domaines C1 à C3 qui semblent porter l'activité catalytique montrent une homologie avec les DAG kinases et les céramide-kinases. De plus, il semble que le domaine C2 porte le site de liaison de l'ATP (Pitson, Moretti et al. 2002). Le domaine C4 semble, par contre être propre aux SphK et serait responsable de la reconnaissance et de l'interaction avec la sphingosine (Yokota, Taniguchi et al. 2004). Enfin, le domaine C5 est conservé à la fois dans les DAG kinases et les céramide-kinases (Sugiura, Kono et al. 2002). Les deux SphK ont des localisations différentes, la SphK1 est cytosolique ou associée aux membranes alors que la SphK2 serait plutôt nucléaire. En effet, la SphK1 possède deux séquences NES (Nuclear Export Signal) impliquées dans son export du noyau vers le cytoplasme alors que la SphK2 possède, dans sa partie N-terminale, une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal) permettant son accumulation dans le noyau (Igarashi, Okada et al. 2003; Inagaki, Li et al. 2003). Les souris KO pour les deux SphK (SphK1 et SphK2) ont un phénotype létal à des stades précoces de développement suggérant que les SphK sont les seules sources de S1P durant l'embryogénèse. En revanche, la délétion d'une seule isoforme n'engendre aucun phénotype particulier suggérant une redondance ou une compensation de ces kinases (Blaho and Hla 2011). L'activité des SphK est régulée par différents facteurs de croissance et agonistes de RCPG. La SphK1 possède des sites de phosphorylation qui participent à son activation et à sa translocation aux membranes où se trouve son substrat. Ainsi en réponse au TNF α , la SphK1 est phosphorylée sur la serine 225 par les MAP kinases ERK (Pitson, Moretti et al. 2003). Les PKC sont également capables d'induire une translocation de la SphK1 via la phosphorylation des résidus Thr54 et Asn89 (Pitson, Moretti et al. 2003). Les phosphorylations semblent intervenir en modifiant la conformation de l'enzyme facilitant ainsi l'interaction avec la

phosphatidylserine au niveau de la membrane (Stahelin, Hwang et al. 2005). Le calcium a aussi été impliqué dans la régulation de l'activité des SphK, en particulier l'isoforme SphK1a possède des sites de liaison de la calmoduline lui permettant de transloquer à la membrane (Young, Willets et al. 2003). En ce qui concerne l'activation de la SphK2, aucun mécanisme n'a été clairement établi à ce jour (Paugh, Paugh et al. 2008).

II-2_1_2 Dégradation de la S1P

A la différence de la synthèse de la S1P qui est catalysée par un seul type d'enzyme, sa dégradation fait intervenir plusieurs voies. En effet la S1P peut être déphosphorylée en sphingosine par les Sphingosine-1-Phosphate Phosphatases (SPP) ou les Lipide-Phosphate Phosphatases (LPP). Ces activités lipide-phosphatases contrebalancent le rapport entre la S1P et la sphingosine, régulée par les SphK. Ces réactions de déphosphorylation sont réversibles, ainsi la sphingosine redeviendra de la S1P en cas d'activation d'une SphK. L'autre voie de dégradation fait intervenir la S1P lyase. Cette voie est par contre irréversible. En effet, la S1P lyase catalyse l'hydrolyse de la S1P entre les carbones 2 et 3 pour donner de la phosphoéthanolamine et de l'hexadécénal (Schéma 15). Chez les plantes, les mêmes activités enzymatique sont présentes, elles sont appelées LCB-P lyase et LCB-P phosphatase (Berkey, Bendigeri et al. 2012).

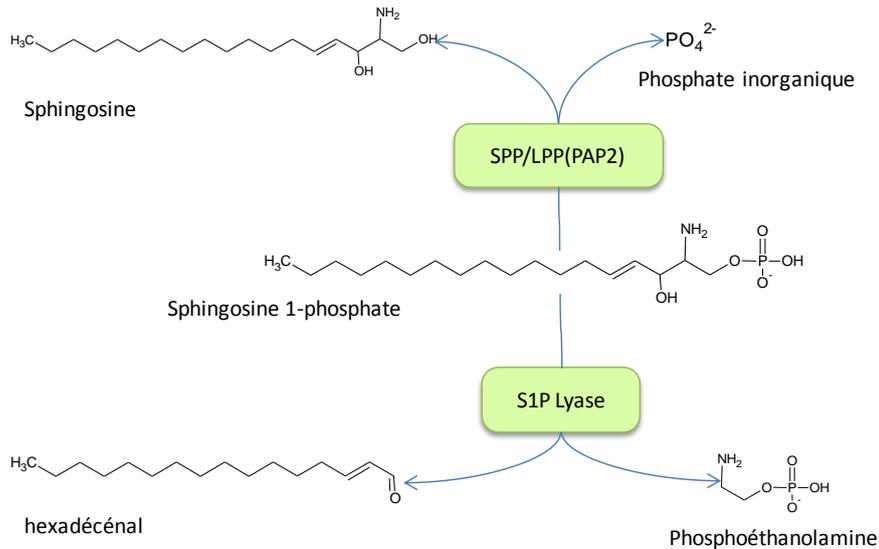


Schéma 15. Voies de dégradations de la sphingosine 1-Phosphate. LPP, Lipide-phosphate phosphatase; PAP2, phosphatidate phosphatases de type 2; SPP, Sphingosine 1-phosphate phosphatase.

II-2 2 Signalisation et effets cellulaires de la S1P

La sphingosine-1 phosphate (S1P) est un sphingolipide capable d'induire un grand nombre d'effets cellulaires via l'activation de différentes voies de signalisation. Chez les mammifères 5 récepteurs à la S1P ont été caractérisés (S1P1-5). Ce sont tous des récepteurs couplés aux protéines G appartenant à la famille des Endothelial Differentiation Genes (EDG). Les récepteurs S1P1, S1P2 sont exprimés de façon ubiquitaire alors que le récepteur S1P3 semble être exprimé dans le système cardiovasculaire, les poumons, les reins, les intestins, la rate et le cartilage. Le récepteur S1P4 est plutôt exprimé dans le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques et le poumon. Enfin le S1P5 est exprimé dans le cerveau et la peau.

Tous ces récepteurs sont couplés à différentes protéines G. Le S1P1 est exclusivement couplé à la protéine G_i . La liaison de la S1P sur ce récepteur active la voie des MAP kinases ERK via l'activation de la protéine G Ras, mais active également la protéine G Rac et la kinase Akt via la Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K). Le récepteur S1P1 peut également activer la PLC qui, en hydrolysant le PIP2 en DAG et en IP3, régulera la concentration de calcium intracellulaire et activera les PKC. Les récepteurs S1P2 et S1P3 sont, quant à eux, couplés à la protéine G_i et

activent les voies décrites ci-dessus, mais ils peuvent également être couplés à la protéine Gq, qui activera la PLC ou être couplés à la protéine G12/13 qui activera la cascade de signalisation Rho/ROCK/PTEN. Enfin les récepteurs S1P4 et S1P5 sont couplés aux protéines Gi et G12/13 (Strub, Maceyka et al. 2010; Blaho and Hla 2011).

A travers ces voies de signalisation, la S1P va pouvoir réguler différentes fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, la migration et la contraction. Un des effets les plus décrits de la S1P est de protéger de la mort par apoptose. En effet, de nombreuses études montrent que la S1P via ses récepteurs membranaires est capable de réduire les processus apoptotiques. Cet effet peut s'exercer via l'activation des voies PI3K et ERK1/2 et en réduisant l'activité de la voie des stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) (Spiegel and Milstien 2003). La S1P est également capable d'induire une prolifération cellulaire. En effet, la S1P en interagissant avec ses récepteurs S1P1 et S1P3 induit l'activation du module MAP kinase ERK. Il a été montré que cette activation était totalement inhibée en présence de toxine pertussique, suggérant l'intervention exclusive d'une protéine Gi. Selon certaines études il semblerait que seul le récepteur S1P1 soit capable d'induire une prolifération cellulaire via l'activation de ERK en réponse à la S1P (Kimura, Watanabe et al. 2000). De plus, l'axe S1P/SphK1 provoque une entrée en phase S du cycle cellulaire en facilitant le passage G1/S (Olivera, Kohama et al. 1999). La S1P est également un contracturant des muscles lisses. La S1P peut induire une contraction du muscle lisse gastrique via l'activation des récepteurs S1P1 et S1P2 et l'activation des protéines Gi, Gq et G12/13 via les voies de signalisation Rho/ROCK et PLC /PKC. L'activation de ces voies entraîne une augmentation du calcium cytosolique, et l'interaction du Ca^{2+} avec la calmoduline activera alors la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) qui en phosphorylant la MLC (Myosin Light Chain) permettra la contraction (Zhou and Murthy 2004). La S1P peut aussi réguler la contraction du muscle lisse vasculaire via les récepteurs S1P2 et S1P3 entraînant l'activation de Rho/ROCK et la mobilisation de Ca^{2+} (Watterson, Ratz et al. 2005). De même, dans le myomètre de rate, la S1P induit une contraction par l'intermédiaire du récepteur S1P2 et de la voie Rho/ROCK (Leiber, Banno et al. 2007).

Par ailleurs, il semblerait que la S1P intracellulaire soit capable d'induire directement des effets cellulaires. En effet, des études ont montré que la S1P induit une libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique. Cependant, aucune cible directe de la S1P intracellulaire n'a pour le moment été caractérisée (Maceyka, Sankala et al. 2005).

Chez les plantes, la phyto-S1P est capable de réguler l'ouverture des stomates et ainsi de contrôler la turgescence dans les cellules de garde chez *A. thaliana* en réponse à l'acide abscissique (ABA). En effet, l'ABA en activant la SphK augmente la concentration de phyto-S1P qui modifie la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et réduit le flux de potassium via l'interaction avec la protéine G GPA1 entraînant une fermeture des stomates (Lynch, Chen et al. 2009). A l'heure actuelle aucun récepteur à la phyto-S1P n'a été caractérisé.

II-2_2_1 Rôle de l'axe SphK1/S1P dans les cancers

L'axe SphK1/S1P ayant des effets prolifératifs et anti-apoptotiques importants dans les cellules, on le retrouve sans surprise dérégulé dans de nombreux cancers. Par exemple, la SphK1 voit son expression augmenter dans des cancers de l'estomac, des poumons, du cerveau, du colon, des reins et du sein (Long, Edwards et al. 2010; Watson, Long et al. 2010). Dans le cancer du sein ER+ (qui exprime les récepteurs aux œstrogènes), il a été observé récemment que l'expression élevée de SphK semblait diminuer le taux de survie des patients et induisait une résistance au tamoxifène (Long, Edwards et al. 2010; Watson, Long et al. 2010), un antagoniste des récepteurs aux oestrogènes utilisé dans le traitement des cancers mammaires. Toujours dans le cancer du sein mais aussi dans les tumeurs gliales (gliome), l'axe SphK1/S1P participe aux caractères cancéreux via l'augmentation de l'expression du Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) en réponse à l'EGF. La S1P peut également intervenir dans les cancers ovariens. En effet, il a été montré que la concentration de la S1P était fortement augmentée dans les ascites ovariens. De plus, elle régule la migration des cellules épithéliales de cancer ovarien en fonction de leurs ancrages cellulaire via les fibres de stress. Ainsi, la S1P va inhiber la migration cellulaire des

cellules ayant des fibres de stress. Par contre, la S1P va pouvoir augmenter la migration des cellules cancéreuses de l'épithélium ovarien qui n'ont pas de fibres de stress (Wang, Zhao et al. 2008). La S1P peut également avoir un rôle dans le cancer prostatique car l'axe SphK1/S1P via les récepteurs S1P1 et S1P3 exerce un effet anti-apoptique sur des cellules de cancers de la prostate. Cet effet anti-apoptotique entraîne une résistance à la camptothecin, un agent anti-cancereux (Akao, Banno et al. 2006). Ainsi la S1P participe à la chimiorésistance des cellules cancéreuses de la prostate. En revanche, une down-régulation de la SphK1 dans ces cellules tumorales entraîne une apoptose (Eto, Bennouna et al. 2006). Dans un modèle de mélanome de souris, le FTY720-P, un agoniste des récepteurs S1P, qui induit une down-régulation des récepteurs S1P, inhibe l'angiogenèse de la tumeur, induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose dans la tumeur (LaMontagne, Littlewood-Evans et al. 2006). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules de carcinome pulmonaire (Schmid, Guba et al. 2007).

II-3 L'acide Phosphatidique

II-3_1 Métabolisme du PA

L'acide phosphatidique ou PA est un des phospholipides les plus simples. En effet, il est composé d'une molécule de glycérol phosphorylée en position 3 et acylé en position 1 et 2.

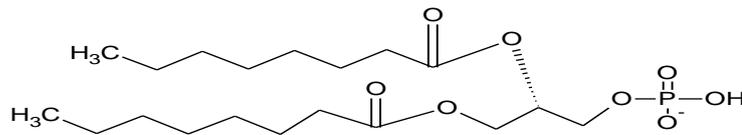


Schéma 16. Acide phosphatidique (dioctanoyl, PA8:0).

Initialement, le PA a été caractérisé comme intermédiaire dans le métabolisme des glycérolipides (synthèse des triglycérides) ainsi que dans la synthèse des phospholipides membranaires. Mais depuis plusieurs années le PA a montré d'autres rôles puisqu'il est également capable de réguler certaines fonctions cellulaires en tant que médiateur lipidique. Le PA peut être synthétisé par différentes enzymes comme la phospholipase D (PLD), la diacylglycerol kinase (DAG Kinase) et l'acylglycérol phosphate acyl transférase (AGPAT), également appelée lysophosphatidic acid acyl transférase (LPAAT). L'AGPAT est une enzyme qui estérifie la position 2 du glycérol de l'acylglycérol phosphate (acide lysophosphatidique) avec un acide gras. Cependant il semblerait que cette voie de synthèse du PA ne soit pas majoritaire et n'intervienne que dans la synthèse *de novo* des glycérides et des phospholipides. La DAG Kinase, quant à elle, phosphoryle le diacylglycérol en position 3 du glycérol. Ainsi les deux voies principales de synthèse du PA font intervenir la PLD et la DAG Kinase (Schéma 17).

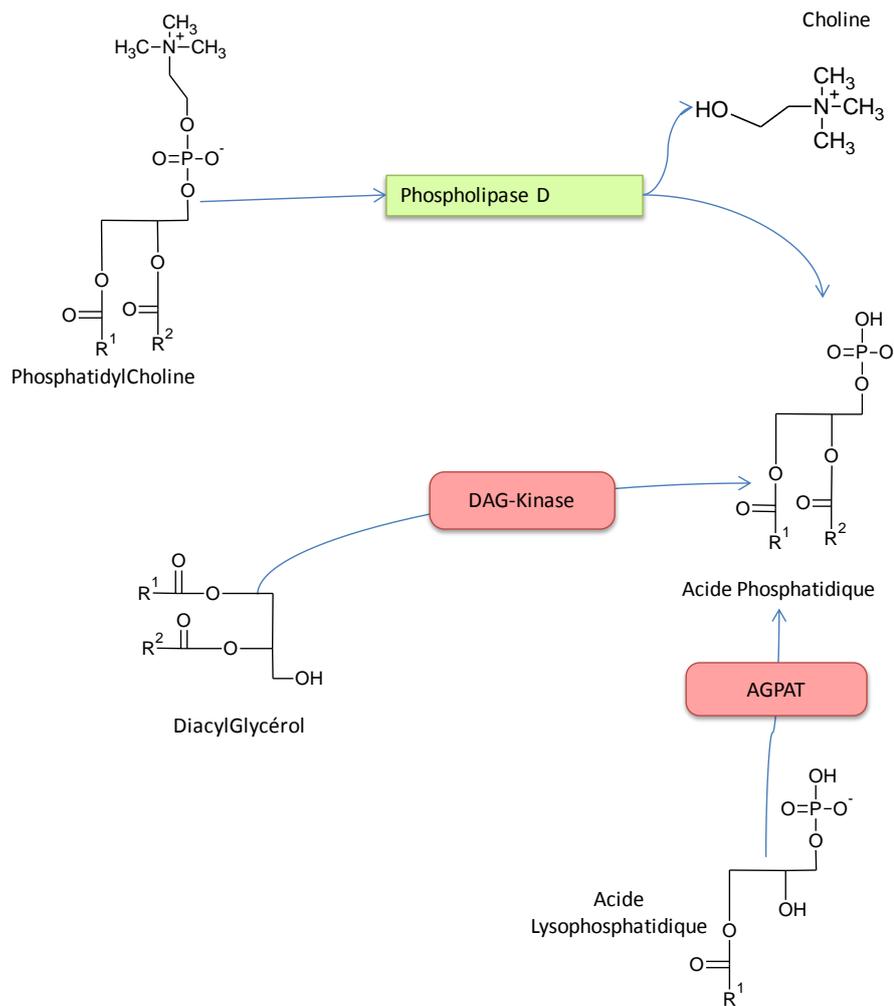


Schéma 17. Voies de synthèse de l'acide phosphatidique. AGPAT, Acylglycérol phosphate Acyl Transférases; DAG Kinase, Diacylglycérol Kinase.

II-3_1_1 La Phospholipase D (PLD)

La PLD est une enzyme qui hydrolyse certains phospholipides membranaires, principalement la phosphatidylcholine (PC) mais aussi la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine, en acide phosphatidique et en choline (ou autre en fonction du phospholipide). Elle a été initialement découverte dans les plantes dans les années 45-50 (Liscovitch, Czarny et al. 2000). Par la suite, elle fut découverte dans tous les types d'organisme comme les virus, les bactéries et les eucaryotes supérieurs. Chez les plantes il existe plusieurs gènes susceptibles de coder pour des PLD ayant des poids moléculaires allant de 90 à 125 kDa en fonction de l'espèce.

Par exemple, *Arabidopsis thaliana* possèdent douze gènes codant pour trois PLD α , deux PLD β , trois PLD γ , une PLD δ et PLD ϵ , et enfin deux PLD ζ (Li, Lin et al. 2007) ; ou encore comme dans le riz où 17 gènes sont présents et codent pour 17 PLD huit PLD α , deux PLD β , trois PLD δ , deux PLD ζ et une PLD ϕ et PLD κ (Li, Lin et al. 2007). Chez les mammifères, on ne trouve que 2 gènes codant pour deux PLD : PLD1 et PLD2 pour lesquels des variants d'épissage notés a et b ont été décrits (Colley, Sung et al. 1997).

Toutes les PLD ont des structures communes, notamment la présence de 4 séquences d'acides aminés, nommé I à IV, caractéristiques principales pour la classification dans la grande famille des PLD. Par ailleurs, les PLD sont divisées en 4 classes. La classe 1 est composée des PLD de champignons et des eucaryotes supérieurs. Les PLD de cette première classe ont des parties N-terminale incluant des domaines de liaison aux lipides et aux ions calcium. La classe 2 comprend les PLD de bactérie. Les classes 3 et 4 contiennent des enzymes intervenant dans la synthèse des lipides comme la cardiolipine synthase de bactérie (Ponting and Kerr 1996). Ainsi dans les plantes et les mammifères, seules les PLD de classe 1 sont observées. Parmi les séquences conservées de ces PLD, deux sont extrêmement conservées et portent l'activité catalytique des PLD. Il s'agit des séquences II et IV qui portent le motif répété HxKxxxxDxxxxxxGSxN, connu sous le nom de motif HKD. Les trois résidus histidine, lysine et l'acide aspartique sont responsables de l'hydrolyse de la liaison phosphodiester des phospholipides. Cette activité est régulée par différents facteurs, notamment le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4,5P₂) qui agit en tant que cofacteur. Chez les mammifères la séquence PBR1 (PI4,5P₂ Binding region) responsable de la liaison de ce cofacteur se situe entre les domaines III et IV. Chez les plantes, l'emplacement de PBR1 varie en fonction de l'isoforme (Schéma 18). Le domaine C2, que l'on retrouve coté N-terminal des PLD de plantes va également interagir avec différents lipides en relation avec la concentration en calcium. Les PLD1 et 2 des mammifères ainsi que la PLD ζ de plantes possèdent aussi un domaine PX (Phox Homology Domain). Ce domaine interagit avec les phosphoinositides (PI3P, PI5P, PI3,4P₂) et certains phospholipides (PA et Phosphatidylsérine). Le domaine PX de la PLD1 de mammifère régule son

association à la membrane. (Selvy, Lavieri et al. 2011). On retrouve également dans les PLD1, 2 et PLD ζ , du côté C-terminal, à côté du domaine PX, un domaine PH (Pleckstrin homology domain), capable lui aussi d'interagir avec des phosphoinositides et régulant la localisation de la protéine.

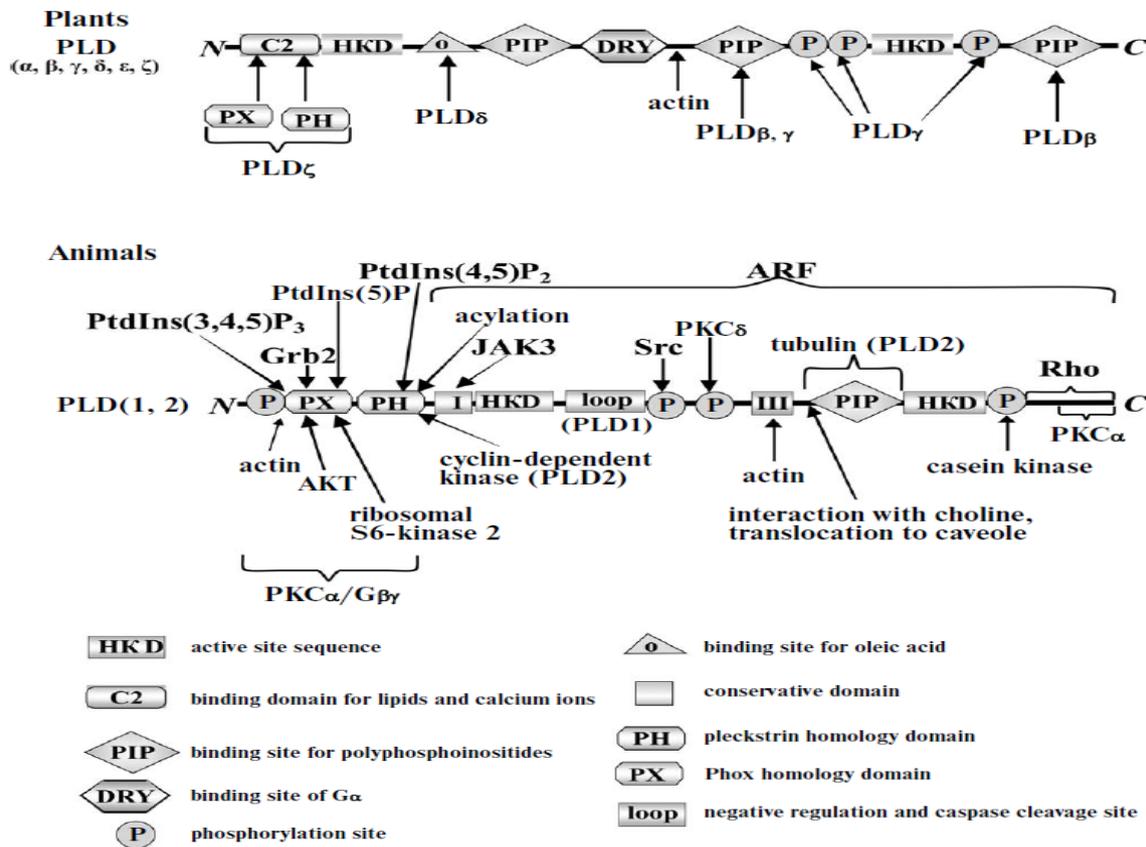


Schéma 18. Les différents domaines de la PLD de mammifères (A) et de plantes (*Arabidopsis*) (B) (D'après Kolesnikov, Nokhrina et al. 2012).

La régulation de la PLD n'est pas associée à la disponibilité de son substrat préférentiel la PC car c'est un lipide très abondant dans la membrane cellulaire mais plutôt via les interactions avec les autres phospholipides cités et surtout par l'interaction avec des protéines régulatrices. En effet, au-delà de l'interaction avec les phospholipides ou phosphoinositides, la PLD de mammifère interagit avec un grand nombre de protéines. Notamment les petites protéines G comme les ARF (ADP-ribosylation Factor) et les protéines de la famille Rho : RhoA, Rac1 et CDC42 qui vont stimuler l'activité PLD. Les PLD de mammifères peuvent également être régulées via leur phosphorylation par des protéines kinases telles que les PKC ou les

protéine tyrosine kinases Src et JAK3 (Janus Kinase 3) (Jang, Lee et al. 2012). En effet, la PLD1 peut être phosphorylée par la PKC ce qui augmente son activité phospholipase, par contre la phosphorylation sur les tyrosines du domaine PX ne semble pas modifier l'activité PLD1. La PLD2 possède également des sites de phosphorylation. Ainsi la phosphorylation des tyrosines 169 et 179 par les kinases Fyn et Fgr entraîne une augmentation de l'activité PLD2 (Choi, Hiragun et al. 2004). De plus la phosphorylation de ces résidus tyrosine permet le recrutement de la protéine Grb2 par son domaine SH2, et ainsi va permettre l'activation de SOS et de la voie MAP kinase. Tout récemment, il a été démontré que la PLD2 avait aussi une activité GEF (Guanosine Exchange Factor) capable d'augmenter la liaison du GTP à la protéine Rac2 et ainsi participer à la polymérisation de l'actine (Peng, Henkels et al. 2011).

II-3_1_2 La DAG Kinase

L'autre voie de synthèse du PA fait intervenir des diacylglycerol kinases qui phosphorylent le DAG pour former du PA. Ces enzymes sont retrouvées dans tous les organismes. En effet, à l'origine identifiées dans les bactéries, elles ont été ensuite caractérisées par homologie de séquence chez les plantes, les mammifères (Cai, Abramovici et al. 2009) et plus récemment chez la levure (Han, O'Hara et al. 2008). Chez les mammifères neuf DGK ont été caractérisées. Le rôle de la DGK est double, elle peut agir sur les quantités de PA mais aussi de DAG présentes dans la cellule. En effet, la DGK peut réduire l'effet induit par le DAG en le convertissant en PA. Notamment le DAG issu de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate par la phospholipase C, qui est capable d'activer les protéines kinase C.

II-3-1-2 Dégradation du PA

Comme sa synthèse, la dégradation du PA fait intervenir plusieurs types d'enzymes : les phosphatidates phosphatases de type 1 et 2 (PAP1, PAP2), et les

PA-PLA1 α et PA-PLA1 β aussi appelées LipI et LipH (Sonoda, Aoki et al. 2002; Hiramatsu, Sonoda et al. 2003). Les enzymes de la famille PAP1, ou lipines, sont des phosphatases cytosoliques caractérisées par une dépendance vis-à-vis des ions magnésium et une sensibilité au N-éthylmaléimide (NEM). Elles dégradent exclusivement le PA en DAG. En opposition aux PAP1, les PAP2, plus récemment appelées Lipide-Phosphate Phosphatases (LPP), sont des enzymes transmembranaires possédant une activité insensible au NEM et indépendante des ions magnésium. Comme les PAP1, ces enzymes dégradent le PA en DAG mais sont capables d'utiliser d'autres substrats. (Voir paragraphe III pages 68). Enfin, le PA peut également être dégradé par la PA-PLA1, famille de phospholipases incluant deux isoformes, LipI (PA-PLA1 α) et LipH (PA-PLA1 β). Ces enzymes désestérifient le PA en position 1 du glycérol pour donner de l'acide lysophosphatidique et un acide gras libre (Wang, Devaiah et al. 2006).

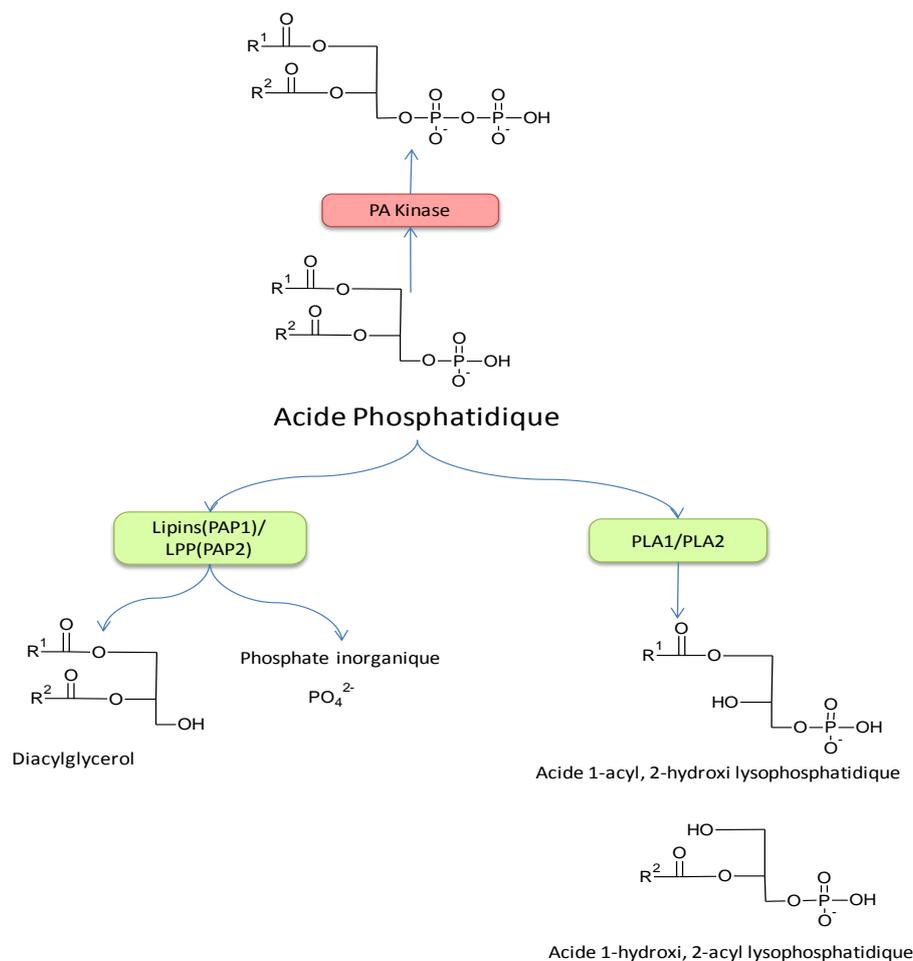


Schéma 19. Dégradation de l'acide phosphatidique. PAP, phosphatidate phosphatase; PLA, phospholipase A.

La concentration cellulaire de PA peut également être régulée par des réactions de synthèse. En effet le PA est le précurseur de synthèse de certains phospholipides comme les phosphoinositides. Dans cette voie métabolique le PA est transformé en CDP-DAG sous l'action d'une phosphatidate cytidyltransférase. Le PA peut aussi être phosphorylé en diacylglycérol pyrophosphate (DGPP) sous l'action de la PA-Kinase. A l'heure actuelle, cette enzyme n'a pas été totalement caractérisée et les gènes codant cette protéine n'ont pas encore été identifiés. De plus, son activité n'a pas été détectée chez les mammifères, mais seulement dans les plantes, les bactéries et les levures. Dans la plante *Arabidopsis thaliana* elle joue un rôle important en transformant le PA en DGPP, voie métabolique intervenant dans la signalisation de l'acide abscissique (Zalejski, Zhang et al. 2005).

II-3 2 Signalisation et effets cellulaires de l'axe PLD/PA

Initialement considéré comme un simple intermédiaire de synthèse, le PA est capable d'activer différentes voies de signalisation et de participer dans de nombreux processus cellulaires. C'est le cas notamment dans les plantes où le PA, issue de la PLD1 α , va réguler des fonctions cellulaires importantes en réponse à des signaux cellulaires. En effet, il a été montré que le PA était capable d'induire la fermeture des stomates, organes qui régulent les échanges gazeux entre la plante et l'air ambiant, ainsi que la transpiration de la plante. Dans les plantes déficientes en PLD1 α , une transpiration plus importante est observée, qui diminue lorsque du PA exogène est ajouté (Sang, Zheng et al. 2001). La régulation de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA fait également intervenir les ROS (Reactive Oxygen species). En effet, l'activation de la PLD par ABA entraîne la formation de PA qui active Rboh (respiratory burst oxydative homolog) et ainsi augmente la production de H₂O₂. Parallèlement, le PA formé interagit avec la protéine ABI, la séquestre à la membrane et ainsi empêche ses effets inhibiteurs sur les réponses NO (Zhang, Zhu et al. 2009). Le PA intervient également dans la protection des cellules contre les ROS. En effet, il a été observé que le PA formé par l'activation de la PLD δ en

réponse à l'H₂O₂ protégeait les cellules et induit une meilleure tolérance au froid des plantes (Zhang, Wang et al. 2003). Toujours dans les plantes, le PA intervient aussi dans la croissance, notamment dans la croissance racinaire. En effet, l'expression de la PLD ζ 1 semble être sous contrôle du facteur de transcription GLABRA2 (GL2) et l'activité PLD est essentielle pour le développement des racines : dans des plantes où la PLD ζ 1 est down-régulée, les poils des racines se développent de façon anarchique et globulaire. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque les plantes sont cultivées en présence de butanol-1, qui inhibe la formation de PA (Ohashi, Oka et al. 2003). De plus, l'axe PLD/PA régule un très grand nombre de gènes en réponse à l'acide salicylique. L'acide salicylique est une phytohormone qui peut intervenir dans de nombreux phénomènes comme le développement de la plante, la photosynthèse, la transpiration et dans la réponse immunitaire. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, l'acide salicylique induit une activation des PLD, entraînant l'activation d'un très grand nombre de gènes. Parmi lesquels le NPR1 qui intervient dans la régulation de la résistance systémique acquise, l'équivalent de la réponse immunitaire innée chez les mammifères (Krinke, Flemr et al. 2009).

Les effets cellulaires induits par le PA se retrouvent également chez les mammifères. De nombreuses études montrent que le PA participe à des processus cellulaires majeurs tel que la prolifération. En effet, le PA joue un rôle dans l'activation du module MAP kinase ERK1/2, protéines kinases essentielles à l'induction de la prolifération cellulaire. Il a été montré que le PA interagit avec plusieurs protéines impliquées dans l'activation du module des MAP kinases ERK1/2. Le PA permet la translocation à la membrane de la protéine c-Raf-1 (Ghosh, Strum et al. 1996) activateur direct de MEK1/2. Récemment, il a été montré que le PA participe à l'activation de Ras par le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth factor). En effet, le PA interagit avec le domaine PH (pleckstrin homology domain) de la protéine SOS-1, le facteur d'échange de Ras, ce qui permet son recrutement à la membrane et l'activation de Ras (Zhao, Du et al. 2007). Le PA est aussi capable d'interagir avec la protéine Kinase Suppressor of Ras (KSR), protéine d'échafaudage liant c-Raf, MEK et ERK. La mutation de son domaine de liaison au PA empêche sa translocation à la membrane et inhibe l'activation de ERK en réponse à l'insuline (Kraft, Garrido et al. 2008). Enfin, il a été démontré que le PA interagit et active

plusieurs isoformes de PKC telles que PKC α , PKC ϵ et PKC ζ . Les PKC ont été démontrées depuis longtemps comme étant capables de stimuler l'activation de ERK1/2 en phosphorylant cRaf, MEK ou la protéine inhibitrice de Raf, RKIP (Rozengurt 2007).

Le PA peut également interagir et activer la protéine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et ainsi activer ses effecteurs comme la kinase 1 ribosomale (S6K1) et la protéine 4E-BP1 qui se fixe sur le facteur d'initiation de la transcription 4E (Fang, Vilella-Bach et al. 2001). L'activation de cette voie de signalisation participe aux phénomènes de survie et de prolifération cellulaire. Le PA peut également induire la survie cellulaire en activant la sphingosine kinase 1, ce qui augmente la concentration de sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingolipide connu pour son effet anti-apoptotique et prolifératif.

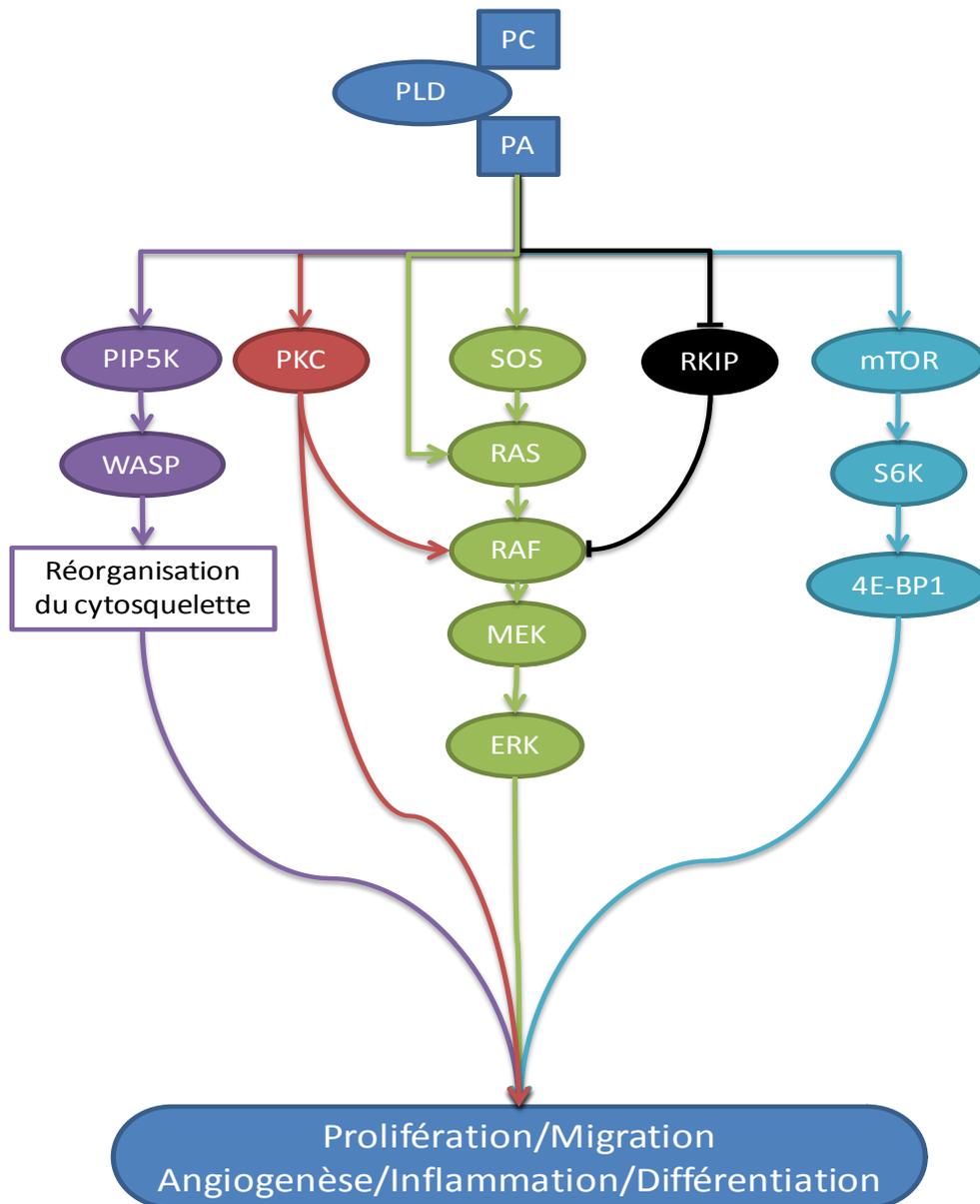


Schéma 20. Signalisation de l'acide phosphatidique. 4E-BP1, 4E binding protein 1; ERK, Extracellular signal-regulated kinases ; mTOR, mammalian target of rapamycin; PA, acide phosphatidique; PC, phosphatidylcholine; PIP5K, Phosphatidyl 4-phosphate 5-Kinase; PKC, protein kinase C; PLD, phospholipase D; RKIP, Raf Kinase Inhibitory Protein; S6K, S6 kinase; SOS, son of sevenless homologue ; WASP, Wiskott–Aldrich syndrome protein.

Une étude récente a mis en évidence que le PA pouvait interagir avec la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase de type I (PIP5K), enzyme qui synthétise du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂). En effet, la protéine PIP5K possède un domaine d'interaction avec le PA, qui permet sa localisation à la membrane et son activation. Ainsi, à travers la protéine PIP5K, le PA va réguler la réorganisation du cytosquelette d'actine (Roach, Wang et al. 2012).

II-3_2_1 L'acide Phosphatidique dans le cancer.

Au-delà de ses effets physiologiques cellulaires, le PA peut également intervenir dans le développement de cancers. Notamment, il a été montré que dans les cancers rénaux, HIF2 α (Hypoxia Inducible Factor), une protéine qui favorise le développement cancéreux, est activée par mTOR2 et que cette activation est insensible à la rapamycine, inhibiteur de mTOR. Le complexe protéique mTORC2 est composé de mTOR, Rictor (insensible à la rapamycine), G β L (stabilisant l'interaction mTOR/Rictor) et de mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1). Il a été montré que le PA active mTOR et donc plus largement le complexe mTORC2, ce qui augmente la survie des cellules tumorales. L'inhibition de l'activité PLD dans ces cellules, accompagné par une diminution de la concentration de PA, rend mTORC2 sensible à la rapamycine et inhibe la survie cellulaire (Toschi, Lee et al. 2009). L'axe PLD/PA est capable de supprimer les effets apoptotiques dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 ainsi que dans les fibroblastes transformés par v-Src (forme oncogénique de Src) (Zhong, Shen et al. 2003). De plus la PLD est fortement exprimée dans les cancers du sein (Noh, Ahn et al. 2000), ainsi que dans les cancers gastriques et rénaux (Uchida, Okamura et al. 1999; Zhao, Ehara et al. 2000). L'inhibition de la PLD dans les cellules MDA-MB-231 (cancer du sein) engendre une apoptose de ces cellules (Noh, Ahn et al. 2000). L'axe PLD/PA est également impliqué dans la formation de métastases. En effet la PLD est capable d'induire une modification du cytosquelette d'actine, et la PLD2 stimule l'invasion, en favorisant la migration de cellules transformées par v-Src (Shen, Zheng et al. 2002). De plus, les cellules MDA-MB-231 du cancer du sein possédant une forte activité PLD, donc une forte production de PA, sont capables de migrer et d'envahir un complexe artificiel représentant la matrice extracellulaire (Matrigel) (Zhong, Shen et al. 2003). En revanche, les MCF-7, une autre lignée de cellules de cancer du sein, qui ont une faible activité PLD n'ont pas cet effet invasif (Sliva, Rizzo et al. 2002).

II-4 Le Diacylglycerol Pyrophosphate

Le Diacylglycerol PyroPhosphate (DGPP) est un glycérophospholipide possédant un groupement pyrophosphate sur le carbone 3 du glycérol, et deux acides gras en position 1 et 2 (Schéma 21).

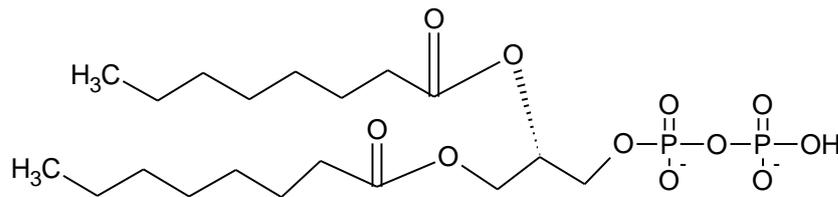


Schéma 21. Diacylglycerol Pyrophosphate (dioctanoyl DGPP8:0)

Le DGPP a été découvert dans les années 90 par Wissing et Behrbohm dans des membranes de *Catharanthus roseus* connues sous le nom de pervenche de Madagascar (Wissing and Behrbohm 1993). Il est formé par phosphorylation du PA sous l'action de la Phosphatidic Acid Kinase (PAK). Cette formation de DGPP a tout d'abord été interprétée comme un moyen de réguler la concentration du PA. En effet, dans les plantes, la production de DGPP est précédée par une augmentation transitoire du PA intracellulaire. Cependant, le DGPP peut également engendrer des effets cellulaires. En effet dans la signalisation de l'ABA le DGPP est un second messenger au même titre que le PA (Zalejski, Zhang et al. 2005). Le DGPP et la PAK ont aussi été caractérisés dans les levures et dans les bactéries où ils jouent un rôle dans le métabolisme de ces organismes. Par contre à l'heure actuelle, ni le DGPP ni la PAK n'ont été caractérisés chez les mammifères. Malgré cela le DGPP est capable, chez les mammifères, d'induire l'activation des phospholipase A2 entraînant la production de prostaglandine dans des macrophages (Balboa, Balsinde et al. 1999). Au-delà de ces effets cellulaires, le DGPP a été montré pouvant agir comme un antagoniste. En effet, il a été mis en évidence que le DGPP sous sa forme dioctanoyl (C8 :0) était capable d'avoir un effet antagoniste sur les récepteurs LPA1

et LPA3 avec un K_i plus faible pour le récepteur 3 du LPA (Fischer, Nusser et al. 2001).

Le DGPP, en tant que second messenger, peut être dégradé, pour cela il est déphosphorylé en PA par plusieurs enzymes. En 1996, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Wu et al. ont décrit une DGPP phosphatase qui a été appelée par la suite DPP. Elle est codée par le gène DPP1 et est caractérisée par une insensibilité aux N-Ethylmaleimide (NEM) et est indépendante des ions Mg^{2+} (Wu, Liu et al. 1996; Toke, Bennett et al. 1998). Peu de temps après, la lipide-phosphate phosphatase-1 fut découverte dans la levure par homologie de séquence avec la DPP1 (Toke, Bennett et al. 1998). Ces 2 enzymes appartiennent à la grande famille des phosphatidate phosphatases. Elles dégradent le DGPP en PA, et le PA en DAG. Chez les mammifères, les LPP qui déphosphorylent les glycérophospholipides et sphingolipides dégradent également le DGPP (van Schooten, Testerink et al. 2006). Récemment, deux nouvelles enzymes, ayant une forte homologie avec l'enzyme DPP1 de levure ont été mise en évidence chez les mammifères. Appelées DPPL1 et DPPL2, elles sont capables de dégrader différents substrats mais ont une activité plus grande envers le DGPP. Ces enzymes ont une activité indépendante des ions magnésium mais contrairement aux DPP1 leur activité est sensible au NEM (Takeuchi, Harigai et al. 2007). A ce jour, leur rôle dans les cellules de mammifères reste encore à élucider.

INTRODUCTION PARTIE 3

III Les lipides phosphatases

III-1 Les phosphatidates phosphatases

L'activité phosphatidate phosphatase (PAP) a été pour la première fois décrite dans la dégradation de l'acide phosphatidique (PA) en diacylglycérol (DAG). Cette activité a été caractérisée dans les années 1950 par Smith et al qui remarquèrent que les équipes de Pricer, WE (Kornberg and Pricer 1953) et Kennedy, EP (Kennedy 1953) avaient observé une synthèse de PA dans leurs conditions expérimentales alors que d'autres équipes comme Marinetti ou Dawson ne trouvaient aucune trace de PA dans leur extrait de tissus. Ils ont donc émis l'hypothèse que le PA avait une demi-vie très courte. Il a été par la suite démontré qu'il existait deux activités PA phosphatase différentes PAP1 et PAP2 portées par des enzymes distinctes (Kennedy 1953; Kornberg and Pricer 1953; Dawson 1954; Marinetti and Stotz 1956; Smith, Weiss et al. 1957).

III-1_1 PAP1/Lipines

Les enzymes de type PAP1 dégradent l'acide phosphatidique (PA) en diacylglycerol (DAG), précurseur nécessaire à la synthèse des triglycérides, ou des phospholipides comme la phosphatidylcholine (PC) ou la phosphatidyléthanolamine (PE). Dans les années 1950, l'équipe de Kennedy (Kennedy 1953), fut la première à montrer une activité enzymatique, à partir d'échantillon de foie, capable de dégrader le PA en DAG et ainsi démontrer que le PA était un phospholipide essentiel dans la synthèse d'autres phospholipides dans la plupart des cellules de mammifères. Par la suite, cette activité PAP1 a été caractérisée. Ainsi l'activité PAP1 est dépendante de la présence d'ions magnésium et est sensible au N-ethylmaléimide (Butterwith, Hopewell et al. 1984; Martin, Hales et al. 1987). Dans les années 2006, un gène PAH1 a été identifié dans la levure codant pour une enzyme ayant une activité PAP1 qui déphosphorylait de manière spécifique le PA via un motif DXDX(T/V) localisé dans le domaine HAD-like (Lin and Carman 1989; Han, Siniosoglou et al. 2007). Par homologie de séquence avec les PAP1 de la levure, des enzymes appelées

lipines (codées par les gènes Lpin1, Lpin 2 et Lpin3), dont la fonction était encore inconnue, ont été trouvées chez les mammifères. Le gène Lpin1, chez les mammifères, a été caractérisé en premier par l'équipe de Reue dans une pathologie du foie, où il est muté (Peterfy, Phan et al. 2001). La lipine 1 (codé par Lpin1) est capable de réguler le développement des tissus adipeux. En effet, une surexpression de celle-ci entraîne une obésité alors que sa sous expression engendre une lipodystrophie et une insulino-résistance. Actuellement trois lipines ont été caractérisées chez les mammifères : lipine 1, lipine 2 et lipine 3 codées respectivement par Lpin 1, Lpin 2 et Lpin 3. Le gène Lpin1 code pour deux protéines appelées lipine 1 A et lipine 1 B résultant de l'épissage alternatif de l'ARN messager primaire (Peterfy, Phan et al. 2005). Les trois lipines ont une expression tissulaire différente. La lipine 1 est exprimée dans le tissu adipeux, les muscles squelettiques, les testicules. Lipine 1A est également détectée dans le cerveau, dans la rate ou dans les préadipocyte, alors que la lipine 1B est présente dans le foie, le cœur, et les reins. La lipine 2, quant à elle, est exprimée dans le foie et le cerveau et enfin, la lipine 3, dans le foie et le tractus intestinal. Bien que ces isoformes aient une homologie importante, elles n'ont pas la même affinité pour le PA. Ainsi la lipine 1 est celle qui a la plus grande affinité, ensuite vient la lipine 2 puis la lipine 3 (Donkor, Sariahmetoglu et al. 2007).

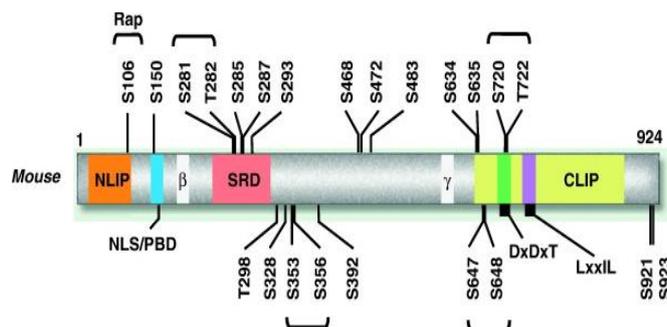


Schéma 22. Représentation schématique des différents domaines des lipines de souris (Harris and Finck 2011).

Les lipines sont des protéines dont la séquence comprend 848 résidus (94 kDa) pour la lipine 3 à 924 (102 kDa) résidus pour la lipine 1B chez la souris (Schéma 22).

Ce sont des protéines cytosoliques maintenues sous forme hyperphosphorylée dans le cytosol et qui sont transloquées à la membrane du réticulum endoplasmique après déphosphorylation. Elles possèdent deux domaines extrêmement conservés : N-terminal lipine (N-LIP) et C-terminal lipine (C-LIP). La lipine 1 possède une séquence de localisation nucléaire. Chez toutes les espèces le domaine C-LIP possède un motif DxDxT qui porte l'activité catalytique. Dans ce même domaine C-LIP, le motif LxxIL est responsable de l'interaction entre lipine 1 et PPAR α (Finck, Gropler et al. 2006) conférant à la lipine 1 un rôle de cofacteur transcriptionnel capable de transloquer dans le noyau et d'interagir avec PPAR α pour réguler l'expression de certains gènes (Harris and Finck 2011). La lipine 1 peut également interagir avec PPAR γ , sans faire intervenir le motif LxxIL (Koh, Lee et al. 2008).

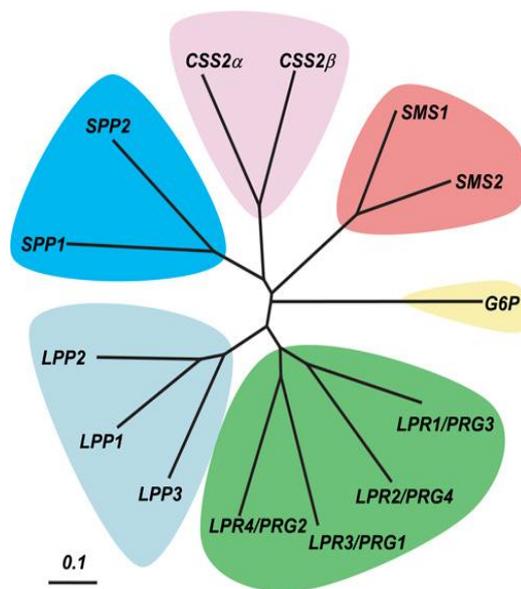
III-1_2 PAP2

III-1_2_1 Caractéristiques/Spécificités générales

Les phosphatidates phosphatases de type 2, appelées également Lipide-Phosphate Phosphatases (LPP) sont des enzymes capables de déphosphoryler un grand nombre de phospholipides comme le LPA, le PA, le DGPP, la S1P ou la C1P. A ce jour, trois LPP ont été caractérisées : LPP1, avec un variant d'épissage LPP1a, LPP2, et LPP3 codés par 3 gènes, respectivement, PPAP2A, PPAP2C et PPAP2B. Contrairement aux PAP1/lipines, les LPP ont une activité catalytique indépendante des ions magnésium et insensible au NEM (Brindley and Waggoner 1998). Au niveau structural, les LPP sont des protéines transmembranaires de 33 à 40 kD. Elles sont composées de 6 domaines transmembranaires reliés par de petites boucles extramembranaires. Elles possèdent 3 domaines extrêmement conservés : C1 KXXXXXXXXRP, C2 SXH et le domaine C3 RXXXXXHXXXD situé sur la 3ème et la 5ème boucle (Schéma 23). Elles font partie d'une grande famille de lipides phosphatases/phosphotransférases (LPT) incluant les sphingosine-1-phosphate phosphatases, la glucose-6 phosphatase chez les mammifères, LPP et DPP chez les plantes, phosphatidate phosphatase et DPP de bactérie et levure et enfin la protéine

Wunen chez la drosophile (Stukey and Carman 1997; Zhang, Pilquil et al. 2000). L'activité catalytique est portée par la boucle 3 au niveau des domaines C2 et C3, alors que le domaine C1 semble être responsable de la reconnaissance du substrat (Schéma 23). En Effet, lorsque les domaines C2 et C3 sont mutés, l'enzyme perd toute capacité à hydrolyser les phospholipides (Waggoner, Xu et al. 1999; Sigal, McDermott et al. 2005). Les LPPs peuvent être localisées dans la membrane plasmique avec leur site catalytique à l'extérieur de la cellule, ou bien dans des organites intracellulaires avec le site catalytique dirigé vers la lumière de l'organite. Les LPP possèdent, dans la 2^{ème} boucle extracellulaire, un résidu asparagine conservé correspondant à un site de glycosylation dont le rôle reste inconnu (Zhang, Pilquil et al. 2000).

A



B



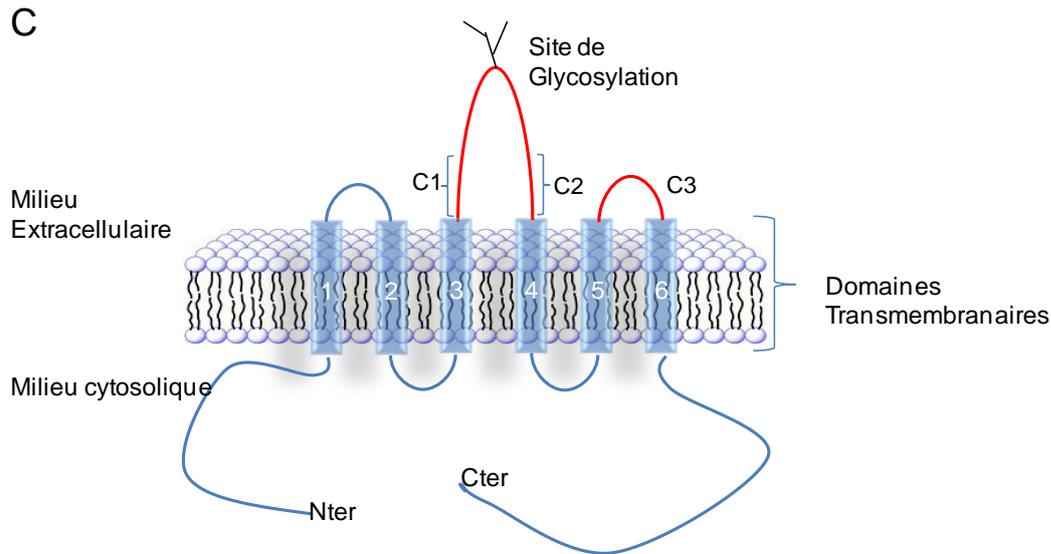


Schéma 23. Phylogénie et structure des lipides-phosphate phosphatases. A. la famille des lipides phosphatases/phosphotransférases. B représentation schématique des différents domaines des LPP. C. représentation de la structure prédite des LPP. (d'après Brindley and Waggoner 1998; Zhang, Pilquill et al. 2000)

Les LPP sont capables d'interagir pour former des oligomères. Le groupe de Burnett a été le premier à montrer, chez la drosophile, que les LPP sont capables de se dimériser sans pour autant que cela influence l'activité catalytique. La partie C-terminale de la protéine semble être nécessaire à l'oligomérisation, car lors de l'ablation de ce domaine les LPP ne peuvent plus interagir. Toutefois, dans ces conditions, l'activité catalytique n'est pas affectée (Burnett, Makridou et al. 2004). Il a été décrit que les LPP1 et LPP3 formaient des homo-oligomères, et que l'on pouvait également observer la formation des hétéro-oligomères suivant : LPP1-LPP2, LPP1-LPP3 et LPP2-LPP3. Cependant, il semblerait que l'activité catalytique soit complètement indépendante de l'état d'oligomérisation (Long, Pyne et al. 2008). Un rôle possible de l'interaction entre les différentes LPP concernerait leur localisation subcellulaire. En effet, les LPP1 et 3 peuvent être associées à différents rafts lipidiques. Dans les premières études menées sur la localisation des LPP dans les rafts lipidiques seule la LPP3 semblait être localisée dans les rafts lipidiques puisqu'elle était présente dans les DRM, fractions membranaires résistant à 1% de Triton X-100. Par la suite, il s'est avéré que la LPP1 localisée également dans des rafts lipidiques, différents de ceux de la LPP3, puisque la LPP1 était observée dans

des culots insensibles au CHAPS, un autre détergent non ionique, mais pas dans les DRM. De plus elle co-localise avec la choléra toxine B, un marqueur des rafts lipidiques. Cette spécificité de localisation serait portée par la première boucle extracellulaire (Kai, Sakane et al. 2006). La LPP1 semble être principalement localisée au niveau des membranes plasmiques, alors que la LPP2 et la LPP3 seraient exprimées à la fois au niveau de la membrane plasmique et au niveau de structures intracellulaires. Dans des cellules polarisées MDCK, la LPP1 est exprimée du côté apical des cellules alors que la LPP3 est localisée au niveau basolatéral (Jia, Kai et al. 2003). Ainsi, l'oligomérisation LPPx-LPPy pourrait permettre une modification de la localisation cellulaire en fonction des LPP présentes dans le complexe.

Les LPP peuvent également avoir un effet indépendamment de leurs activités catalytiques. En effet, la LPP3 possède dans sa boucle extracellulaire 2 un motif RGD (RGE chez la souris), motif capable d'interagir avec les intégrines, qui permet à la LPP3 d'interagir avec les intégrines indépendamment de son activité catalytique (Long, Darroch et al. 2005).

III-1_2_2 Les effets cellulaires des LPP

Les LPPs ne sont pas de simples phosphatases, elles interviennent dans la régulation de la signalisation lipidique. Du fait de leur ecto-activité, les LPP sont capables de moduler la concentration des phospholipides extracellulaires et ainsi de moduler leurs effets cellulaires. La LPP1 est capable de dégrader le LPA extracellulaire et ainsi réduire son effet sur son récepteur et sur ses effecteurs. La dégradation du LPA par la LPP1 a été mise en évidence récemment dans un modèle *in vivo* de KO inducible de la LPP1. Dans les souris LPA1+/+ le turn-over du LPA est de l'ordre de 3 minutes alors qu'il est de 12 minutes dans des souris LPP1^{-/-}. (Tomsig, Snyder et al. 2009). Par ailleurs, il a été décrit que, dans les cancers ovariens, l'activité LPP est diminuée ce qui augmente l'activité du LPA et par conséquent ses effets cellulaires associés (migration, prolifération) (Tanyi, Hasegawa et al. 2003). Dans ce même modèle pathologique, il a été montré que la Gonadotropin Releasing

Hormone (GnRH), connue pour réduire la croissance des carcinomes ovariens, induisait une augmentation de l'activité LPP dans la membrane plasmique. Cette activité LPP, en réduisant le taux de LPA au voisinage de la cellule pourrait réduire l'effet prolifératif du LPA. Ce mécanisme pourrait participer à l'effet antiprolifératif de la GnRH (Imai, Furui et al. 2000). Cet effet antiprolifératif des LPP a également été décrit par Tanyi qui, toujours dans les cancers ovariens, montrent qu'une surexpression de la LPP3 entraîne une réduction de la croissance cellulaire et de la survie, et par conséquent diminue la croissance tumorale (Tanyi, Morris et al. 2003).

Au delà de leurs effets directs sur les phospholipides extracellulaires, les LPP peuvent réguler des processus de signalisation intracellulaire dépendant de seconds messagers de nature phospholipidique. En effet, les LPP intracellulaires peuvent réguler les pools de seconds messagers en jouant sur la balance entre leurs formes phosphorylées et déphosphorylées comme c'est le cas pour le balances PA/DAG ou S1P/Sphingosine. Par exemple il a été montré que la LPP3 pouvait être co-localisée avec la PLD2 et ainsi déphosphoryler le PA formé et réduire ses effets sur l'activation de Raf-1 (Pyne, Long et al. 2005). Aussi, la LPP2 intracellulaire est capable, via la régulation du pool de PA interagissant avec la SphK1, de réguler la production de S1P. La LPP3 est capable de réguler l'action de la S1P : elle peut déphosphoryler la S1P nouvellement formée par la SphK1 et ainsi réguler la balance entre l'effet apoptotique de la sphingosine et l'effet anti-apoptotique de la S1P (Pyne, Long et al. 2005). La LPP1 est également capable de réduire la migration des fibroblastes induite par le LPA. Cet effet est indépendant de la dégradation du LPA à la surface cellulaire, et serait plutôt un effet intracellulaire de la LPP1. En effet, la LPP1 réduit les pools de PA formés par la PLD ainsi que l'activation Rho induite par le LPA. La LPP1 est également capable de réduire l'effet du PDGF notamment sur l'activation PLD et les voies de signalisation en aval (ERK1/2, Rho, flux calcique) (Pilquil, Dewald et al. 2006).

Récemment, il a été mis en évidence un effet des LPP indépendant de leur activité catalytique. C'est le cas pour la LPP3, qui possède sur la seconde boucle extracellulaire un domaine de liaison aux intégrines caractérisé par la présence du tripeptide RGD chez l'homme (RGE chez la souris). La présence de la LPP3 induit une agrégation cellulaire via l'interaction avec des intégrines. Actuellement le

mécanisme précis reste inconnu, mais la LPP3 semble jouer un rôle prépondérant car dans les cellules endothéliales vasculaires l'absence de LPP3 abolit

complètement cette agrégation (Humtsoe, Bowling et al. 2005). De plus, la LPP3 active les protéines β -caténine et cycline-D1 ce qui engendre une prolifération des cellules tumorales. Actuellement, la relation entre la LPP3 et ces protéines n'a pas été élucidée (Chatterjee, Humtsoe et al. 2011).

A ce jour, les LPP1 et LPP3 sont les plus caractérisés car ce sont les seules à provoquer des phénotypes pathologiques dans des souris KO. Cependant, la LPP2 possède également des effets cellulaires. En effet, elle permet de réguler l'entrée du cycle cellulaire en phase S. La surexpression de la LPP2 entraîne une entrée en phase S plus rapide et à l'inverse sa down-régulation retarde ce passage et ce de façon spécifique à la LPP2, car ni la LPP1, ni la LPP3 n'ont d'effet sur la progression du cycle (Morris, Schang et al. 2006).

Actuellement le mode de régulation des LPP reste peu connu. Il n'y a pas de preuve de régulation par des phénomènes de phosphorylation ou de déphosphorylation. En revanche, il peut y avoir des régulations indirectes par la modification de la membrane plasmique ou de la cavéoline (Nanjundan and Possmayer 2001). Dans les cancers ovariens, la GnRH qui agit sur un récepteur de type RCPG, est capable d'activer les LPP dans des membranes plasmiques purifiées. Cet effet est dépendant de la présence de GTP, ce qui pourrait suggérer l'existence d'un mécanisme de régulation des LPP par les protéines G (Imai, Furui et al. 2000).

INTRODUCTION PARTIE 4

IV La Signalisation Endothéline

IV-1 Les endothélines

Les endothélines ont été caractérisées dans les années 1988 par l'équipe de Yanagisawa (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Elles avaient été mises en évidence quelques années auparavant via leur effet vasoconstricteur sur les artères coronaires (Hickey, Rubanyi et al. 1985; O'Brien, Robbins et al. 1987). L'endothéline-1 (ET-1) est la première à avoir été isolée à partir de cellules endothéliales d'aorte de porc (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Actuellement 3 endothélines différentes ont été caractérisées, l'endothéline-1 (ET-1), l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3) (Inoue, Yanagisawa et al. 1989).

IV-1 1 Structure et métabolisme des endothélines

Au niveau structural les endothélines (ET) sont composées de 21 acides aminés, parmi lesquels 4 cystéines conservées (en position 1, 3, 11, 15) qui en formant des ponts disulfures (Cys1-Cys15 et Cys3-Cys11) forment une structure bicyclique. La partie C-terminal libre est hydrophobe, notamment à cause de la présence d'un tryptophane (Schéma 24). Les ponts disulfures ne sont pas essentiels à l'activité du peptide, par contre la partie C-terminal doit garder son caractère hydrophobe pour la fonctionnalité de l'ET (Kimura, Kasuya et al. 1988; Kloog and Sokolovsky 1989). ET-2 et ET-3 diffèrent de l'ET-1 par la présence de deux acides aminés différents en position 5 et 6 (Trp, Leu) et de 6 acides aminés différents en position 2, 4, 5, 6, 7, et 14 (Thr, Phe, Thr, Tyr, Lys, Tyr) (Schéma 24). Les trois ET sont produites à partir de gènes distincts codant pour des précurseurs appelés prépro-endothélines. Ces trois prépro-endothélines doivent subir plusieurs coupures protéolytiques pour donner la forme active de l'endothéline.

Endothéline 1

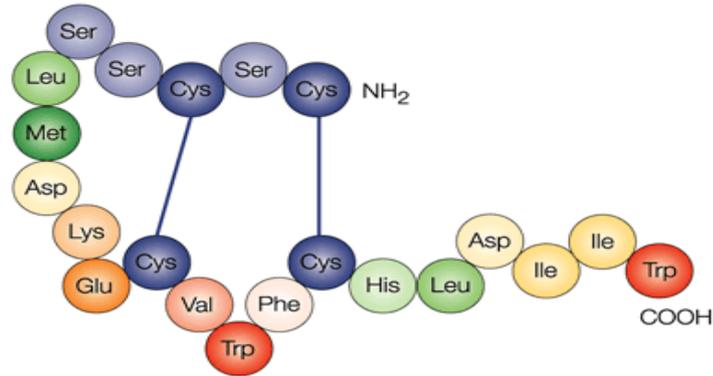


Schéma 24. Structure de l'endothéline-1.

Parallèlement à l'étude des ET, il a été découvert les sarafotoxines, molécules possédant de fortes homologues structurales et fonctionnelles avec les ET. Elles ont été caractérisées à partir d'une famille de peptides cardiotoxiques présents dans le venin du serpent *Atractaspis engaddensis*, également appelé la vipère taupe (Takasaki, Tamiya et al. 1988; Kloog and Sokolovsky 1989) (Schéma 25).

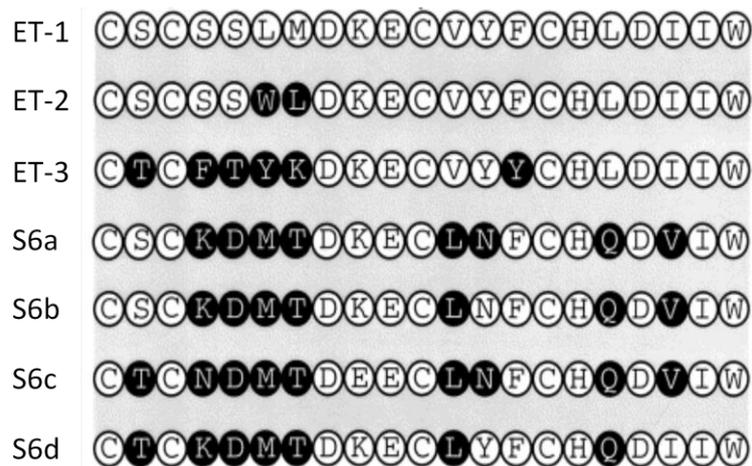


Schéma 25. Structure comparative des ETs (ET-1, ET-2, ET-3) et des Sarafotoxines (S6a, S6b, S6c, S6d).

IV-1 2 La signalisation de l'axe endothéline

La régulation de la synthèse des endothélines se fait majoritairement au niveau transcriptionnel, avec une production *de novo* en réponse à une stimulation des cellules productrices. Ainsi, la libération d'ET-1 est favorisée par des agents vasoconstricteurs (angiotensine II, vasopressine) (Teplyakov 2004), d'autres facteurs tels que la thrombine (Emori, Hirata et al. 1992), le TNF- α (Marsden and Brenner 1992), l'insuline (Oliver, de la Rubia et al. 1991), ou des facteurs physico-chimiques comme l'hypoxie (Zhang, Narayan et al. 2009) ou le shear stress (Yoshizumi, Kurihara et al. 1989). Au niveau de l'utérus, la synthèse d'ET-1 est augmentée par l'estradiol (Cameron, Bacon et al. 1995). A l'inverse, la synthèse de ET-1 est inhibée par les prostaglandines PGE2 et PGI2 (de Nucci, Thomas et al. 1988) et le monoxyde d'azote (NO) (Wagner, Buz et al. 2004).

La signalisation induite par les ET fait intervenir deux récepteurs couplés aux protéines G qui possèdent environ 60% d'identité de séquence (Arai, Hori et al. 1990; Elshourbagy, Lee et al. 1992). ETA et ETB ont des affinités différentes pour les ET : ETA montre une préférence pour l'ET-1 ($ET-1 \geq ET-2 > ET-3$) alors que l'ETB a la même affinité pour les trois peptides (ET-1, ET-2, ET-3). Ces deux récepteurs sont généralement couplés aux protéines G de type Gq/11, Gi/o et G12 /13. Après leur liaison à l'ET les récepteurs sont rapidement désensibilisés par phosphorylation puis endocytés via un mécanisme dépendant de la clathrine (Freedman, Ament et al. 1997). Par la suite le récepteur ETA va être recyclé à la membrane plasmique alors que l'ETB va être dégradé dans les lysosomes (Paasche, Attramadal et al. 2001). Les récepteurs de l'ET sont exprimés dans la majorité des tissus de mammifères et peuvent interagir pour former des hétéro et homo-dimères. La formation d'hétérodimères va entraîner une modification de la mobilisation calcique en réponse à l'ET-1 (Evans and Walker 2008). La liaison de l'ET à ses récepteurs va activer différentes voies de signalisation cellulaire. En effet, l'ET-1 active la voie de la PLC β , induisant la libération de calcium à partir des pools intracellulaires et l'activation de la PKC. L'ET-1 stimule également la voie des MAP kinases, qui régule la croissance et la prolifération cellulaire (Smollich and Wulfing 2007; Bagnato and Rosano 2008). De plus, dans les cellules musculaires utérines, ET-1 augmente la PLD et induit une

synthèse de PA qui participe à l'activation ERK (Robin, Chouayekh et al. 2005) (Schéma 26).

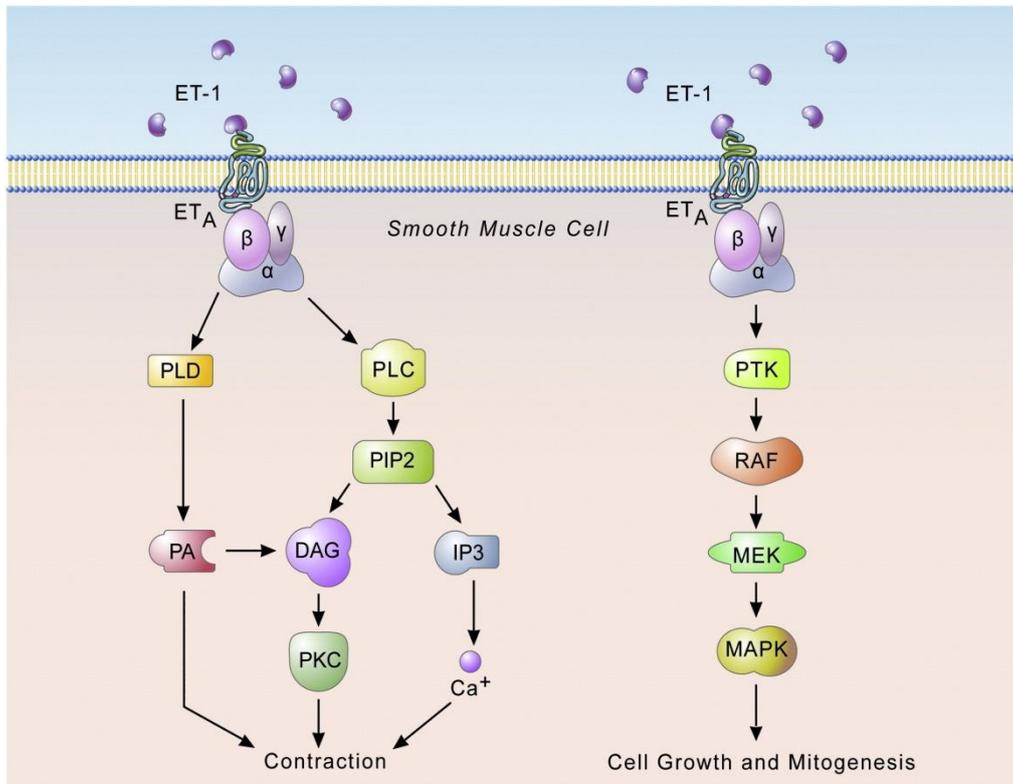


Schéma 26. Voies de signalisation impliquées dans les effets à court terme (contraction) ou long terme (prolifération cellulaire, survie ...) de l'ET-1 (D'après Al Karim Khimji et al., 2010). DAG, diacylglycerol; ET-1, endothéline-1, ETA, récepteur A à l'endothéline; IP3, inositol trisphosphate; MAPK, mitogen activated protein kinase; PA, acide phosphatidique; PIP2, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; PTK, protéine tyrosine kinase.

L'activation des voies de signalisation, par les ET, engendre différents effets physiologiques et pathologiques. Ainsi de nombreuses études montrent le rôle important de l'axe ET-1/ETR dans le maintien du tonus vasculaire basal et de la pression artérielle chez l'homme. En effet, les souris n'exprimant pas ET-1 au niveau de leurs cellules endothéliales ont une réduction importante de la pression artérielle systémique basale comparativement à des souris sauvages (Kisanuki, Emoto et al. 2010). ET-1 exerce également un rôle dans la reproduction. En effet, elle est synthétisée dans le cerveau, notamment au niveau de l'hypophyse où elle régule la sécrétion des hormones hypophysaires. Elle est capable de stimuler d'une part la production d'autres hormones adénohypophysaires, en particulier TSH (thyroid-

stimulating hormone), l'hormone de croissance (GH) et la prolactine, et d'autre part la sécrétion d'hormones gonadotropes (FSH et LH) (Stojilkovic, Merelli et al. 1990). De plus, ET-1 agit sur la neurohypophyse en provoquant la libération de vasopressine et d'ocytocine (Yoshizawa, Shinmi et al. 1990). L'ET-1 est aussi décrit comme l'agent contracturant le plus puissant de l'utérus (Calixto and Rae 1991). Cet effet fait intervenir exclusivement le récepteur ETA via l'activation des protéines Gi et Gq. Cette activation entraîne, par la voie PLC une mobilisation transitoire du Ca^{2+} intracellulaire nécessaire à l'induction de la contraction. Les ET ont un rôle important dans le développement embryonnaire. En effet, les souris ayant l'axe ET non fonctionnel (absence de sécrétion d'ET, ou KO pour les récepteurs A et B), développent des phénotypes létaux à cause d'anomalies du développement cardiovasculaire et crânio-facial (Clouthier, Hosoda et al. 1998).

L'endothéline dans les cancers

Le système endothéline intervient dans de nombreux phénomènes pathologiques tels que les troubles cardiovasculaires, la maladie de Hirschsprung. Il est également impliqué dans divers cancers humains, comme le cancer de la prostate (Nelson and Carducci 2000), du sein (Smollich and Wulfing 2007), du poumon (Ahmed, Thompson et al. 2000), col de l'utérus (Venuti, Salani et al. 2000), du colon (Asham, Shankar et al. 2001), de l'ovaire (Bagnato and Rosano 2008). Il a été observé que dans tous ces cancers l'expression et la concentration d'ET-1 est augmentée. Les effets directs de l'ET-1 dans la progression tumorale et le développement des cancers semblent concerner principalement la prolifération, la résistance à l'apoptose (Eberle, Fecker et al. 2002), la migration, et l'invasion (Rosano, Cianfrocca et al. 2010). Ces effets directs peuvent être liés à la régulation de différentes protéines kinases (Nelson, Bagnato et al. 2003) et lipides kinases (Kawanabe, Hashimoto et al. 2004). Au delà de ces effets directs, l'ET-1 peut avoir des effets indirects notamment sur la dissémination des métastases, via une action sur l'angiogenèse (Spinella, Rosano et al. 2010).

INTRODUCTION PARTIE 5

V Etat du sujet

Des travaux récents au laboratoire ont montré un rôle important de l'axe endothéline ainsi que de certains lipides bioactifs dans les cellules musculaires lisses utérines (cellules myometriales) et les cellules de léiomyome utérin (cellules ELT3). Tout d'abord, il a été montré que l'endothéline-1 (ET-1) était capable d'induire une activation des MAP kinases ERK1/2 et une prolifération dans les cellules de myomètre de rat (modèle sain). Ainsi, l'ET-1 en se fixant sur le récepteur ETA (seul récepteur exprimé dans le myomètre sain) active deux PKC (Robin, Boulven et al. 2002). En effet, le récepteur ETA couplé à la protéine Gq active la PLC γ , ce qui conduit à l'activation de la PKC δ . Ce récepteur est également couplé à une protéine Gi qui, par l'activation d'une PI 3-kinase active une autre PKC, la PKC ζ . Ces deux PKC vont coopérer pour induire l'activation de Ras et du module des MAP kinases ERK1/2 pour, au final, induire la prolifération des cellules de myomètre (Robin, Boulven et al. 2004). Le léiomyome utérin est la pathologie utérine la plus répandue et fait l'objet de nombreuses études visant à trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Les léiomyomes utérins sont étudiés au laboratoire à l'aide d'un modèle cellulaire murin, la lignée cellulaire ELT3, qui possède des caractéristiques communes avec les léiomyomes utérins humains. Dans ces cellules, l'ET-1 est capable d'induire une prolifération cellulaire plus importante que dans les cellules de myomètre. Cet effet fait intervenir les récepteurs ETA et ETB, qui dans ce modèle sont exprimés à un niveau équivalent, lui-même supérieur au niveau d'expression de ETA dans le myomètre sain (Robin, Chouayekh et al. 2005; Raymond, Robin et al. 2009). De plus l'activation de ERK et l'induction de la prolifération dans les cellules ELT3 font intervenir l'acide phosphatidique (PA) produit par la PLD, dont l'activité est exacerbée par rapport au modèle sain (Robin, Chouayekh et al. 2005). Au-delà de son effet prolifératif, il a également été montré que l'ET-1 possède un effet anti-apoptotique, et ceci uniquement dans les cellules ELT3 (Raymond, Bole-Feysot et al. 2006). Cet effet est dépendant de l'activité de la SphK1. En effet, dans des conditions d'induction de l'apoptose, l'activité SphK1 (SphK1) est diminuée, alors qu'en présence d'ET-1 dans ces mêmes conditions on observe une activité SphK normale. De plus, l'ajout de S1P exogène engendre des effets anti-apoptotiques similaires à ceux de l'ET-1 (Raymond, Bole-Feysot et al. 2006). Un effet de la S1P avait précédemment été observé sur la contraction du myomètre en réponse à l'ET-1. Dans ce tissu, la S1P exogène est capable d'induire

une contraction via l'interaction avec le récepteur S1P2 et l'activation de la voie RhoA/Rhokinase. La contraction induite par l'ET-1 fait intervenir la SphK1 et la synthèse de S1P mais celle-ci ne semble pas agir via un récepteur membranaire, mais directement sur la voie RhoA/ROCK (Leiber, Banno et al. 2007). Dans les cellules ELT3, il a été montré que l'activation de la SphK1 permet l'induction de la cyclooxygénase-2 (COX2) par un mécanisme mettant en jeu une libération de S1P dans le milieu extérieur et l'activation du récepteur S1P2. Cette libération de S1P, fait intervenir un transporteur de type ABC, le transporteur ABCC1 (Tanfin, Serrano-Sanchez et al. 2011).

Dans les cellules ELT3, le PA joue un rôle important dans la croissance cellulaire en participant à l'activation des MAP kinases ERK1/2. Le module MAP kinase ERK est également activé en réponse à un autre phospholipide, l'acide lysophosphatidique (LPA) (Billon-Denis, Tanfin et al. 2008). En effet, l'incubation des cellules ELT3 en présence d'une PLD bactérienne (PLD de *Streptomyces chromofuscus*) qui possède à la fois une activité PLD (dégradation de la PC en PA) et une activité LysoPLD (dégrade de la LPC en LPA) conduit à l'activation du module MAP kinase ERK1/2. Cependant, il a été montré que ce n'est pas la production de PA mais la synthèse de LPA qui est responsable de cette activation puisque l'effet de la scPLD était sensible aux antagonistes (Ki16425 et VPC32183) des récepteurs aux LPA1 et 3 (Billon-Denis, Tanfin et al. 2008). Par ailleurs, les cellules ELT3 synthétisaient de la lysophosphatidylcholine (LPC) qui était dégradée lorsqu'on incubait les cellules ELT3 en présence d'autotaxine (ATX) (Billon-Denis, Tanfin et al. 2008). De plus, le LPA active ERK via l'interaction avec le récepteur au LPA 1 couplé à une protéine Gi et l'activation de la voie Ras (données non publiées).

L'ensemble de ces travaux montrent un rôle important des lipides bioactifs, que ce soit en tant que seconds messagers ou en tant qu'inducteurs dans les cellules ELT3 et dans les cellules de myomètre. Dans de nombreuses pathologies, on observe que ces voies de signalisation sont dérégulées soit via une synthèse élevée, soit via des mécanismes de dégradation réduite.

Le but de ce travail est de caractériser les voies de dégradation des médiateurs lipidiques dans les cellules de myomètre et les cellules de léiomyome

ainsi que de déterminer si ces voies sont dérégulées dans les cellules tumorales de léiomyome. En effet, il a été montré au laboratoire que le PA généré par la PLD en réponse à l'ET-1 participait à l'activation des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules de léiomyome ELT3. Cet effet pourrait être augmenté dans ces cellules tumorales à cause d'une diminution d'activité des voies de dégradation du PA. Il en va de même pour l'effet anti-apoptotique de la S1P qui pourrait être augmenté dans les cellules ELT3 à cause d'une moindre efficacité de sa dégradation.

MATERIELS ET METHODES

I-1 Matériels

I-1 1 Produits

- [³H] 1-Oleoyl-2-sn-lysophosphatidic acid (40Ci/mmol), [¹⁴C] L-α-Dipalmitoyl, phosphatidic acid (150mCi/mmol), Guanosine 5'-(gamma-thio) triphosphate, [35S] 46.2 TBq/mmol Nitrocellulose 0,45 µm, Liquide scintillant Ultima-Flo™ AF : **Perkin Elmer**

- 1-oleoyl-2-sn-lysophosphatidic acid (LPA18 :1), 1,2-dioctanoylglycerol pyrophosphate (DGPP8 :0), 1,2-dioctanoil-sn-glycero-3-phosphate (PA8 :0), 1,2-dioctanoyl glycerol (DG8 :0), (S)-phosphoric acid mono-{2-octadec-9-enoylamino-3-[4-(pyridin-2-ylmethoxy)-phenyl]-propyl} ester (VPC32183), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (PA18 :1), D-erythro-sphingosine-1-phosphate (S1P) : Avanti Polar Lipid

- ON-TARGETplus SMARTpool rat PPAP2A (LPP1) siRNA (#L-095781-01) : **Dharmacon**

- DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR kit, Kit de dosage protéique BCA : **Thermo Scientific**

- Tous les consommable plastiques (cultures cellulaires, pointes de pipettes, tubes, microtubes, ...) : **VWR**

-: U0126 : **Promega**

- Filtre GF-C : **Millipore**

- MAFP, U-0126, Biomol Green : **Enzo Life Science**

- Collagénase (3,1 U/mg) : **Boehringer Mannheim S.A.**

- Tous les milieux nécessaires à la culture cellulaire, Anticorps anti- IgG de souris (H+L) couplés à l'Alexa Fluor 680, glutamine, trypsine, lipofectamine RNAimax, lipofectamine LTX plus, Phosphate Buffer saline (PBS) : **Life technologies.**

-Sérum de veau foétale : **Lonza**

-Platelet-derived growth factor (PDGF) BB, PDGF-AA : **Peprotech**

-Papier phosphocellulose P81 : **Whatman**

- sérum albumine bovine (BSA), 4 β -phorbol 12 myristate-13-acétate (PMA), 4 β -phorbol 12,13 dibutyrate (PdBu), acide éthylène glycol-bis (b-aminoéthyl éther) N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA), polyoxyéthylène sorbitan monolaurate (Tween 20), Triton X-100, leupeptine, aprotinine, phenylméthyl sulfonyl fluoride (PMSF), deoxyribonuclease I, pénicilline/streptomycine, inhibiteur trypsique du soja, catalase, N-ethylmaleimide (NEM), Ro31-8220, Toxine de pertussis (PTX), Inhibiteur de Raf GW5074, Farnesyl Pyrophosphate (FPP), Ki16425, : **Sigma-Aldrich**

-Anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris couplés à la peroxydase de Raifort, fluoroguard antifade reagent, standards de poids moléculaires SDS-PAGE, persulfate d'ammonium, sodium dodécyl sulfate (SDS), dithiothréitol, N,N,N',N' tetraméthyléthylène diamine (TEMED) , acrylamide/bisacrylamide, hydroxylapatite : **BioRad.**

- Amorces PCR, siRNA contrôle (sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'; antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3') (Raymond, MN et al., Endocrinology , 2006, 147 :5873-82): **Eurofins MWG Operon**

-Anticorps monoclonaux de lapin anti-ERK1/2 actives (anti-phospho-MAPK ERK1/2), Anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxidase : **Cell Signaling Technologie**

-Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre PDGF β , Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre ERK2 : **Santa Cruz Biotechnology**

-TransPass™ COS/293 Transfection Reagent, Enzymes de restrictions : **Biolabs**

-Anticorps de chèvre dirigés contre IgG de lapin couplé IRDye 800CW : **LiCor Biosciences**

Les différents réactifs et solvants utilisés sont des produits : Prolabo, Merck ou VWR

I-2 Méthodes

I-2 1 Culture cellulaire

Les cellules ELT3 proviennent d'une lignée cellulaire de léiomyomes utérins de rate Eker, elles nous ont été fournies par le Dr C.L. Walker (Anderson Cancer Center, University of Texas, Smithville, USA). Elles sont cultivées dans le milieu DF8 (DMEM 45%, HamF12 45%, sulfate ferreux $1,6 \cdot 10^{-6}$ M, sélénate de sodium $5 \cdot 10^{-8}$ M, vasopressine $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, cholestérol 10^{-8} M, hydrocortisone $2 \cdot 10^{-7}$ M, transferrine 10 µg/ml, insuline 25 mg/ml) avec 10% de SVF.

Pour l'entretien, les cellules sont détachées par traitement à la trypsine et remises en culture à une densité de 15000 cellules/cm², dans du milieu complet additionné de 10% de SVF sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂ à 37°C.

- dans les boîtes de 96 puits (0.33cm²/puits) pour le dosage d'activité phosphatase.

- dans des boîtes de 12 puits (9 cm²/puits) pour les MAP kinases.

- dans des boîtes de Pétri de 55 cm² pour la préparation d'extrait membranaire

Le milieu de culture est changé approximativement tous les 2 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent une confluence d'environ 95%. Les cellules sont alors « déprivées ». C'est-à-dire incubées dans du milieu MEM additionné de 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine, 2,5 µg/ml d'amphotéricine B et 2 mM de glutamine et dépourvu de SVF pendant 8 à 14h.

Les cellules COS-7 sont cultivées dans du milieu DMEM 45%, Ham F12 45% contenant 10 % de SVF et 100µg/ml de pénicilline/streptomycine.

Pour l'entretien, les cellules sont détachées par traitement à la trypsine et remises en culture à une densité de 10⁴ cellules/cm².

I-2 2 .Transfection Chimique

I-2_2_1 Lipofectamine LTX plus

Les cellules ELT3 sont transfectées avec le plasmide pCDNA 3.1 ou pEGFP vide ou le vecteur d'expression pCDNA ou pEGFP contenant la séquence d'intérêt. Les transfections sont réalisées avec de la lipofectamine LTX plus selon le protocole du fournisseur. Pour des cellules cultivées en plaque de 6 puits, 2.5 µg de plasmide sont mélangés avec 200 µL d'Opti-MEM et 2.5 µL de plus reagent. La solution est ensuite agitée doucement et incubée à température ambiante pendant 5 minutes. Après l'incubation, 8.75 µL de Lipofectamine LTX est ajoutée, après une légère agitation, la solution est de nouveau incubée à température ambiante pendant 20 minutes. Pendant ce temps, le milieu de culture des cellules à 80 % de confluence, est remplacé par du milieu de culture classique « frais » avec 10% de sérum de veau foetal sans antibiotiques (2 mL/puits). Une fois l'incubation du mélange ADN/PLUS reagent/Lipofectamine terminée, 200µL de cette solution sont ajoutés par puits. Après 1 nuit dans l'incubateur le milieu des cellules est remplacé par du milieu complet frais.

I-2_2_2 Lipofectamine RNAimax

Les cellules ELT3 sont transféctées avec les ARN interférence (ARNi) control ou avec des ARNi spécifiquement dirigés contre la LPP1. Les transfections sont réalisées avec de la lipofectamine RNAimax par reverse transfection selon le protocole du fournisseur. Pour une transfection en plaque 12 puits (Pour chaque puits) 30 pmol de ARNi sont mélangés avec 200 µL d'Opti-MEM et avec 2 µL de lipofectamine RNAimax directement dans le fond du puits. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules sont ajoutées à une densité de 21 900 cellules par cm² puis incubées à 37°C dans un incubateur dans un volume final de 1 mL de milieu de culture complet. Après une nuit dans l'incubateur, le milieu est remplacé par du milieu complet frais.

I-2_2_3 Transpass Cos/Hek

Les cellules COS7 ou HEK 293 sont transfectées avec le plasmide pCDNA 3.1 vide ou le vecteur d'expression pCDNA contenant la séquence d'intérêt. Le milieu de culture des cellules à 70-80% de confluence est changé par 500 µL de milieu frais (DMEM/Ham F12 avec 10% SVF sans antibiotiques ni antiphongiques). Les transfections sont réalisées avec du réactif de transfection transPass selon le protocole du fournisseur. Pour des cellules cultivées en boîte de 12 puits, le plasmide (1.5 µg par puits) est mélangé à 100µl de DMEM sans sérum. Après une légère agitation, 4 µl de Transpass sont ajoutés, puis mélangés sans vortex et incubés 20 à 30 min à température ambiante. Le contenu du tube est ensuite mis en présence des cellules et le tout est incubé dans un incubateur à 37°C. Après une nuit d'incubation, le milieu de transfection est remplacé par du milieu frais.

I-2_3 Analyse de l'activité phosphatase

I-2_3_1 Préparation d'extrait membranaire

Les cellules confluentes dans des boîtes de pétrie ($1 \cdot 10^6$ cellules) sont rincées 3 fois avec 5ml de tampon Tris/NaCl (Tris 20mM et NaCl 150mM). Les cellules sont ensuite grattées dans ce même tampon et centrifugées à 5000 tours/min. Le culot est repris dans 1 ml de tampon Tris/NaCl avec inhibiteurs de protéases (10µg/ml), puis soniquées avec un sonicateur à sonde Vibra-Cell 72412 (Fisher Bioblock scientific). L'homogénat est transféré dans un tube à ultracentrifugeuse et centrifugé à 100 000g pendant 25 minutes à 4°C. Le culot est ensuite repris à 1mg/ml après quantification des protéines via le test de BCA.

I-2_3_2 Dosage de phosphate

Test *in vitro*

La réaction s'effectue dans une plaque de 96 puits dans un volume réactionnel de 50µL. 1µg d'extrait membranaire est mis en présence d'un lipide donné aux temps et aux concentrations indiqués dans la légende des figures. La réaction est arrêtée par l'ajout de 200µl de réactif de dosage de phosphate BioMol Green. Après 30 minutes d'incubation, les DO (densités optiques) sont mesurées à 590nm sur un lecteur de plaque (Wallac - ThermoFisher). Les Do sont ensuite rapportées à une quantité de phosphate libre grâce à une gamme étalon de phosphate libre.

Test *in cell*

Les cellules confluentes dans des plaques de 96 puits, déprivées la veille, sont délicatement rincées 3 fois avec du tampon Tris/NaCl/CaCl₂ (20 mM, 150 mM, 1 mM) préchauffé à 37°C, puis ré-incubées dans 50µl de ce même tampon avec les lipides aux concentrations indiquées dans la légende des figures. La plaque est mise dans un bain-marie afin que la réaction se fasse à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 200 µL de BioMol Green directement dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les DO (densités optiques) sont mesurées sur un lecteur de plaque (Wallac - ThermoFisher) à la longueur d'onde de 590 nm. La quantité de phosphate libéré durant la réaction est déduite grâce à l'utilisation d'une gamme étalon. Parallèlement, 4 puits sontensemencés dans les mêmes conditions et sont utilisés pour déterminer la quantité de protéines afin de standardiser les résultats.

I-2_3_3 Chromatographie sur couche mince

La réaction s'effectue dans des tubes en verre borosilicaté de 5 mL dans un volume réactionnel de 100 μ L. L'extrait membranaire (1 μ g) est mis en présence d'un lipide et des autres agents à tester aux temps et aux concentrations indiqués dans la légende des figures. La réaction est arrêtée par l'ajout de 400 μ l de HCl/Chloroforme/Méthanol (0.28/40/40). Les tubes sont ensuite centrifugés à 6000 tours.min⁻¹ pendant 25 minutes. La phase organique est récupérée puis évaporée au « speedvac ». Les culots « secs » sont repris dans 35 μ l de chloroforme/méthanol (1/1), puis déposés sur une plaque de silice de chromatographie. Pour la séparation des différents lipides, la base de la plaque est mise dans un tampon Chloroforme/Méthanol/ammoniaque/Eau (130/50/1.8/6). La radioactivité est ensuite comptée sur un compteur de radioactivité sur plaque (Berthold). Enfin le rapport entre la radioactivité des pics correspondant aux produits initiaux et celle des pics correspondant aux produits issus de la dégradation est divisé par la radioactivité totale de la piste.

I-2_4 Analyse des MAPK ERK1/2

I-2_4_1 Caractérisation immunologique de l'activation de ERK1/2

La caractérisation immunologique de l'activation de ERK1/2 se fait à l'aide d'un anticorps dirigé sélectivement contre les MAPK ERK1/2 actives car phosphorylées sur résidus thréonine et tyrosine.

I-2_4_2 Incubation et extraction des protéines cellulaires

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes 12 puits. A confluence, elles sont privées de sérum une nuit avant d'être incubées en présence des différents agents à tester aux temps et aux concentrations indiqués dans la légende des figures. Après élimination du milieu d'incubation, les réactions sont arrêtées en ajoutant 50 μ l de tampon de lyse (HEPES 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM;

orthovanadate de sodium 20 μ M; pyrophosphate de sodium 10 mM; EDTA 10 mM; Triton X-100 1%; glycérol 10 %; NaF 100 mM; PMSF 0,5 mM; aprotinine 10 μ g/ml; leupeptine 10 μ g/ml). Les cellules sont grattées au froid puis centrifugées à 15.000x g pendant 5 min à 4°C.

I-2_4_3 Electrophorèse et électrotransfert

Les protéines provenant de chaque extrait sont chauffées à 100°C pendant 5 min en présence de tampon de Laemmli (60 mM Tris, 10% Glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bleu de bromophenol) et sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) en conditions dénaturantes (SDS) dans un tampon glycine 200 mM; Tris 25 mM; SDS 0,1 %. La migration a lieu pendant 1h30 à 25 mA /gel.

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (porosité 0,45 μ m) pendant 1 heure à 400 mA (tampon : glycine 385 mM; Tris 50 mM; éthanol 20% (v/v)). La qualité et l'uniformité du transfert sont vérifiées par coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau.

I-2_4_3 Analyse immunologique

La membrane de nitrocellulose est bloquée pendant 30 minutes à température ambiante avec une solution de tampon salin Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M; Tween 0,1 % (TTBS) contenant 5 % de lait écrémé (w/v). Elle est ensuite incubée 2h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C avec l'anticorps de souris anti-ERK1/2 actives (Cell Signaling 1/5000) et avec l'anticorps de lapin qui reconnaît les formes phosphorylées et non phosphorylées de ERK de chez SantaCruz dilué au 1/5000 dans du TTBS contenant 5% de lait écrémé (w/v). La nitrocellulose est ensuite hybridée avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin couplé à la IRDye 800 (pour ERK totale) et avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à l'AlexaFluor 480 (pour P-ERK) dilués dans du TTBS contenant 5% de lait, 1h à température ambiante.

Après 2 lavages de la membrane avec du TTBS, la fluorescence est visualisée par un scanner de fluorescence Odissey (Li-Cor). L'intensité des bandes est mesurée par analyse du scan par le logiciel Odissey V1.2. L'activation de ERK1/2 correspond au signal révélé par l'anticorps anti-ERK1/2 actives rapporté à la quantité totale de protéines ERK1/2 de chacun des extraits, et elle est exprimée en « facteur de stimulation » par rapport au contrôle.

I-2_5 RT-PCR

I-2_5_1 Extraction des ARNs

Les ARN de cellules confluentes dans des boîtes de 55 cm² ou dans des plaques de 12 puits sont purifiés avec des kits de purification NucleoSpin® RNA II (Machery Nagel) selon les indications du fournisseur. Les cellules sont lysées par addition de 1 ml de réactif Trizol (Invitrogen). Après incubation de 5 minutes à température ambiante, 200 µl de chloroforme sont ajoutés et le mélange est vortexé 15 à 30 s. La phase aqueuse est récupérée dans 500 µL d'éthanol 70%. Les tubes sont mélangés et 700 µL de lysat sont chargés sur les colonnes NucleoSpin® RNA II. Les colonnes sont ensuite centrifugées 30 secondes à 8000x g (cette étape est renouvelée jusqu'à utilisation de la totalité du lysat). Selon le protocole du fournisseur, 700 µL de tampon RA2 sont mis sur les colonnes. Après centrifugation 1 minute à 8000x g, 500 µL de tampon RA3 sont ajoutés et les colonnes sont centrifugées de nouveau à 8000x g pendant 1 minute (cette étape est répétée deux fois). Enfin les colonnes sont séchées et éluées par centrifugation à 13 000x g. La concentration d'ARNs est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

I-2_5_2 Réaction de reverse transcription

Les ARNs (5 µg) sont dénaturés 10 min à 70°C en présence de 100 pM d'amorces hexamériques aléatoires puis rapidement refroidis à 4°C. La réaction de

synthèse de l'ADNc est initiée par addition de dNTPs, de 100U de transcriptase inverse (M-MLV RnaseH-) et de son tampon (1X). Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 h 30, puis à 94°C pendant 10 min.

I-2_5_3 Réaction de PCR

Les séquences des amorces permettant d'amplifier une partie des séquences des Lipide-Phosphate Phosphatases (LPP), spécifiquement chez le rat, ont été choisies à partir de séquences publiées.

Un dixième du mélange de la réaction de reverse transcription est utilisé comme matrice pour la réaction de PCR. La réaction a lieu en présence de dNTPs (1 mM), 2,5U de Taq polymérase, de son tampon (1X) et de 10 pmoles des amorces spécifiques (MWG Biotech) de la molécule à amplifier, dans un volume final de 25 µl. Le programme de PCR comprend 5 min de dénaturation à 94°C puis 30 à 40 cycles comportant 3 étapes : 30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à 60°C et 30 s d'élongation à 72°C. Une étape finale d'élongation de 5 min à 72°C termine la réaction. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% dans le TAE (Tris Acétate EDTA) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). L'électrophorèse a lieu dans le même tampon sous une tension de 80V. Les bandes d'ADN sont visualisées sous éclairage UV.

	Sens (5'-3')	Reverse (5'-3')
LPP1	GGTCAAAAATCAACTGCAG	TGGCTGAAGATAAAAAGTGC
LPP2	GGGTCAACTGCTCTGGCTAG	CGCTCCGACTCTTCA TTCTC
LPP3	CCGGCGCTCAACAACAACC	TGTCTCGATGATGAGGAAGGG
GAPDH	CTGCACCCACCAACTGCTTAG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

I-2_6 PCR quantitative

Les expériences de PCR quantitative sont réalisées en PCR temps réel dans un stepone Plus de marque Applied Biosystem. Les réactions de PCR sont effectuées en utilisant les réactifs DyNAmo™ ColorFlash SYBR®Green qPCR Kit de chez Thermo Scientific selon les instructions du fournisseur. Les analyses des courbes de fusion se font à la fin des réactions d'amplification. Le taux de cDNA cible de chaque échantillon est déterminé à l'aide d'une courbe de standardisation effectuée en simultanée. Les courbes de standardisation sont obtenues par amplification de produits de PCR (obtenus par PCR conventionnelle), dont la quantité est connue.

I-2_7 Mesure de la translocation de la PKC

Des cellules confluentes en plaque de 6 puits sont privées de sérum la veille et sont incubées avec les agents à tester et aux temps indiqués dans la légende des figures. La réaction est arrêtée par aspiration du milieu d'incubation et par ajout de 1 ml de tampon « PKC » froid (Tris-HCL 20 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, 10 µg/mL aprotinin et leupeptin et 0.5 mM PMSF). La plaque est immédiatement congelée dans de l'azote liquide. Après 3 cycles de congélation-décongélation, les extraits cellulaires sont récupérés et centrifugés à 800 xg pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite centrifugé à 100 000 xg pendant 20 minutes à 4°C. Le culot (protéines membranaires) est repris dans du Laemmli et analysé par western blot en SDS-PAGE 7.5 %. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose qui sera incubée avec un anticorps anti PKC α , anti PKC ϵ ou anti-PDGF β receptor.

I-2_8 Liaison du GTP γ ³⁵S

I-2_8_1 Préparation des membranes

Les cellules contenues dans un flacon de 75 cm² sont déprivées pendant une nuit, puis lavées et grattées dans 3 fois 5 ml de tampon B (PBS, 2.7 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1 μM GDP). Les cellules sont ensuite récupérées et centrifugées 10 min à 1200 rpm. Le culot est repris dans 2 ml de tampon B complété avec 10 μg/ml de leupeptine. Les cellules sont lysées par sonication (Sonicateur à sonde BioRad) et le lysat est centrifugé pendant 40 min à 100.000g à 4°C. Le culot est repris dans 1 ml de tampon de réaction (50 mM Hepes pH 7.4, 100mM NaCl, 10 mM MgCl₂). Les protéines sont dosées avec le kit BCA.

I-2_8_2 Liaison du GTPγ³⁵S

On utilise 30 μg de protéines par essai, la réaction se fait dans 1 ml de tampon de réaction (complété avec 25 μg/ml de saponine, 10 μM de GDP et 0.1 nM de GTPγ³⁵S). Les membranes sont ajoutées à t=0. La réaction a lieu à 30°C pendant 45 min. On arrête la réaction par filtration sous vide (filtres GF/C 25 mm de diamètre, Whatman) puis les filtres sont lavés 3 fois avec 5 ml de PBS. La radioactivité retenue sur les filtres est comptée en présence de 5 ml de liquide scintillant Quick Safe A.

I-2_9 Immunoprécipitation par GFP-TRAP®

Les cellules cultivées en boîtes diamètre 55 cm², à 70% de confluences sont transfectées avec la LPP1 couplée à la GFP et la LPP3 couplée à un tag HA. Deux jours après la transfection, les cellules sont décollées par traitement avec une solution de PBS-EDTA (5mM) et centrifugées 10 minutes à 500x g. Le culot est ensuite mis en présence de GFP-trap® pour immunoprécipitation selon le protocole du fournisseur. Le culot est repris dans du tampon de lyse (Tris/HLC 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, NP40 0.5%) et placé dans la glace pendant 30 minutes. Après l'incubation, le lysat est centrifugé à 20 000x g pendant 5-10

minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite dilué dans du tampon de dilution (Tris/HCL 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, PMSF 1 mM, aprotinine 10 µg/ml; leupeptine 10µg/ml) pour un volume final de 500 à 1000 µL. Le lysat cellulaire est ensuite mis en présence des billes GFP-Trap® (après équilibrage) et incubé 2h à 4°C sous légère agitation. Après une centrifugation à 10 000x g pendant 4 minutes, le surnageant est ensuite éliminé et le culot lavé deux fois avec du tampon de lavage froid (Tris/HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150-500 mM, EDTA 0.5 mM, PMSF 1 mM, aprotinine 10 µg/ml; leupeptine 10µg/ml). Pour finir, le culot de billes est repris dans du Laemmli et analysé par western Blot en SDS-PAGE à 10%. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et hybridées avec un anticorps anti-GFP ou anti-HA.

I-2 10 Clonage des Lipide-Phosphate Phosphatases.

I-2_10_1 Les plasmides et primers utilisés pour les constructions.

Les constructions consistent à créer des plasmides contenant soit la LPP1, soit la LPP2 soit la LPP3. Ainsi, la LPP1 est insérée dans le vecteur pEGFPN1 par les sites de restriction HindIII et BamH1, afin d'obtenir une protéine de fusion LPP1-GFP, avec la GFP en partie carboxy-terminale de la LPP1. La LPP2, est quant à elle, insérée dans le vecteur pmCherryN1 par les sites de restriction HindIII et BamH1 afin d'avoir une protéine de fusion LPP2-mCherry, avec la protéine fluorescente en partie carboxy-terminale de la LPP2. La LPP3 est clonée en rajoutant en 5' de la séquence LPP3, la séquence d'un tag HA (5'-GGC GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA-3').

Les ADNc de la LPP1 et de la LPP3 sont obtenus par RT-PCR en utilisant des ARN de foie de rat comme matrice et les amorces (MWG Biotech Operon) suivantes :

LPP1_HindIII_sens, 3'-GCA AGC TTA TGT TCG ACA AGA CGC GGC TGC-5'
HindIII

LPP1_BamH1_Antisens, 3'-GCT GGA TCC CGG GGC TCA TGA TTC CTT GCG-5'
BamH1

LPP2_HindIII_sens, 3'-GCA AGC TTA TGG AGC GGA GGT GGG TCT TCG TG-5'
HindIII

LPP2_BamH1_Antisens, 3'-GCG GAT CCA AGG GTC GGT CAC CGA GGG TCA
AC-5
BamH1

LPP3_HindIII_sens, 3'-CCA AGC TTA TGC AAA GCT ACA AGT ACG ACA AGG
CG-5'
HindIII

LPP3_HA_BamH1_Anti sens, 3'-GCG GAT CC ^{Stop} **CTA** GGCGTAGTCGGGCACGTCG
BamH1 Tag HA
TAGGGGTA CAC CATG TTG TGG TGA TTG CT-5'

Un dixième du mélange de la réaction de reverse transcription effectué à partir de foie de rat est utilisé comme matrice pour la réaction de PCR. La réaction a lieu en présence de dNTPs (200 µM), 1U de Phusion High-Fidelity polymérase (Thermo Scientific), de son tampon (1X) et de 25 pmoles des amorces décrites précédemment, dans un volume final de 50 µl. Le programme de PCR comprend 30 s de dénaturation à 98°C puis 30 à 40 cycles comportant 3 étapes : 10 s de dénaturation à 94°C, 45 s d'hybridation et d'élongation à 72°C. Une étape finale d'élongation de 5 min à 72°C termine la réaction. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% dans le TAE (Tris Acétate EDTA) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). L'électrophorèse a lieu dans le même tampon sous une tension de 100 V. Les bandes d'ADN sont visualisées sous éclairage UV et les fragments amplifiés sont prélevés et purifiés à l'aide de colonnes NucleoSpin EXTRACT II selon les indications du fournisseur (Macherey Nagel).

I-2_10_2 Restriction des vecteurs et des inserts

Les vecteurs ainsi que les fragments issus de la PCR sont ensuite incubés avec les différentes enzymes de restriction. La réaction a lieu en présence des différents produits de PCR (pcr-LPP1, pcr-LPP2 ou pcr-LPP3) ou en présence de 5 µg de vecteur vide (pEGFP-N1, pmCherry-N1 ou pCDNA3.1), 20 U de BamH1 et 20 U de HindIII, du tampon NEB 2 (New England Biolabs), 100 µg.mL⁻¹ de BSA, dans un volume final de 40 µL. Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 2 h. Les fragments digérés sont purifiés sur colonnes NucleoSpin EXTRACT II comme décrit ci-dessus. Les vecteurs digérés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% dans le TAE. Les bandes correspondant aux vecteurs ouverts sont prélevées et purifiées sur des colonnes NucleoSpin EXTRACT II.

I-2_10_3 Ligation des inserts dans leurs vecteurs correspondants

Le vecteur pCDNA3.1 sera ligué avec la LPP3-HA, le vecteur pEGFP avec le fragment LPP1 et le vecteur pmCherry avec le fragment LPP2. Pour chaque réaction de ligation le vecteur ouvert et l'insert sont mélangés dans les rapports 1 pour 5 (plasmide/insert), avec 1 U de ligase T4, le tampon de la ligase (1X) le tout dans un volume final de 20 µL. Le mélange est incubé à température ambiante une nuit.

I-2_10_4 Transformation des plasmides.

Les bactéries *Escherichia coli* DH5α compétentes sont transformées par choc thermique. Pour cela 100 µL de bactéries compétentes DH5α (Takara) sont incubés avec 10 ng de plasmide pendant 30 minutes dans la glace. Le choc thermique comprend 45 secondes d'incubation à 42°C suivies de 2 minutes dans de la glace.

Au bout de ces 2 minutes, 1 ml de milieu super optimal broth enrichi en glucose et en $MgCl_2$ (SOC) est ajouté et les bactéries sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 h.

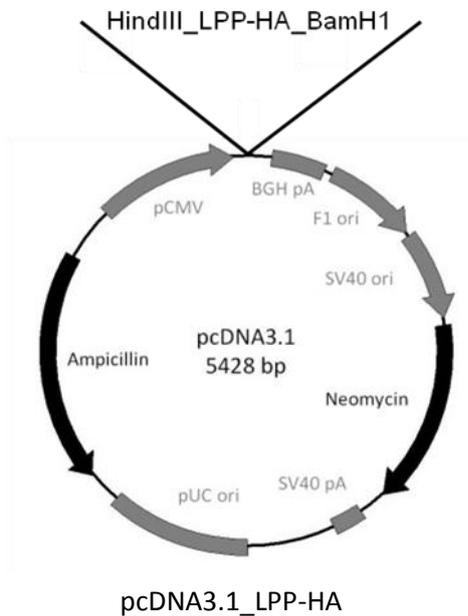
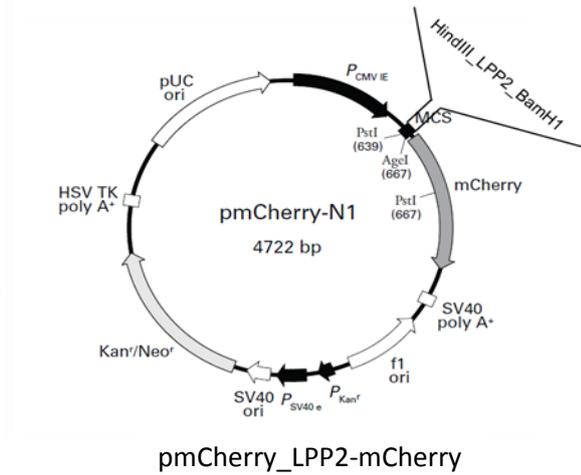
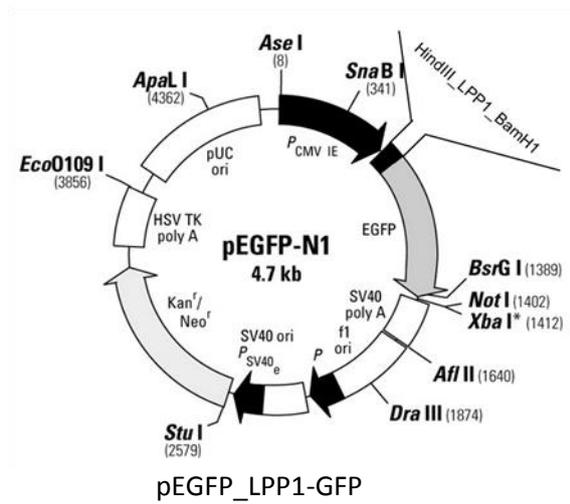
Après incubation, les cellules sont étalées sur des boîtes de LB-agar contenant un antibiotique de sélection ($100 \mu g.ml^{-1}$ d'ampicilline ou $50 \mu g.ml^{-1}$ de kanamycine) en fonction du gène de résistance porté par chaque vecteur. Une fois étalées, les bactéries transformées sont incubées une nuit à 37°C.

I-2_10_5 Extraction des plasmides à partir des colonies transformées.

Des colonies bactériennes bien distinctes sont prélevées sur les boîtes de LB-agar et mises dans 2 ml de milieu Lysogeny broth (LB) ($10 g.L^{-1}$ de tryptone, $5 g.L^{-1}$ d'extrait de levures, $10 g.L$ de NaCl) contenant l'antibiotique adéquate puis mises en culture à 37°C sous agitation 200 rpm pendant une nuit. Le lendemain, les tubes sont récupérés et les plasmides sont extraits grâce à un kit de purification Nucleospin plasmid (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les plasmides sont finalement repris dans 50 à 100 μL d'eau « DNase free ».

I-2_10_6 Contrôle de la ligation

Afin de vérifier la bonne insertion des fragments de PCR dans les vecteurs, une partie des plasmides purifiés est digérée avec les enzymes de restriction BamH1 et HindIII comme décrit précédemment. Après migration sur un gel d'agarose 1,5 % (TAE contenant du bromure d'éthidium $0,5 \mu g/ml$) la taille des fragments est estimée par rapport à la migration d'un marqueur de taille contenant différents acides nucléiques de taille connue. Si la taille observée est conforme à la taille attendue, le reste des plasmides purifiés correspondants est envoyé pour séquençage complet (Beckman Coulter Genomics). Les plasmides corrects sont ensuite produits en plus grande quantité et stockés à une concentration de $0,5 mg.mL^{-1}$



I-2 11 Immunofluorescence.

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre à une densité de 20 000 cellules par cm². Le lendemain, les cellules sont transfectées avec les différents plasmides. 24h après la transfection, les lamelles sont lavées 1 fois avec du PBS puis fixées avec du Paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS et incubées avec une solution de NH₄Cl 50 mM pendant 10 minutes à température

ambiante afin de neutraliser le PFA. Après un lavage au PBS, les lamelles sont incubées 15 minutes à température ambiante avec une solution de blocage/perméabilisation (tampon A) composée de PBS/1% BSA/0,2% triton X-100.

Dans le cas des cellules transfectées avec le plasmide pCDNA-LPP3-HA, les lamelles sont incubées en présence d'anticorps primaire anti-HA (Cell signaling Technology) dilué au 1/100 dans le tampon A et incubées à 37°C pendant 40 à 60 minutes. Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon A et incubées à 37°C pendant 40 à 60 minutes, en présence d'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au FITC (Sigma) dilué au 1/150 dans le tampon A. Enfin, les lamelles sont lavées 3 fois avec le tampon A et 1 dernière fois avec du PBS. Les lamelles sont ensuite montées sur lame avec quelque microlitre de Fluoroshield contenant du DAPI (life technologies).

Si les cellules sont transfectées avec les plasmides EGFP ou mCherry, les lamelles sont directement montées sur lame après l'étape de perméabilisation.

Enfin les lamelles sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss AxioPlan II équipé d'une caméra numérique AxioCam.

RESULTATS PARTIE I

I Mise en évidence et caractérisation de l'activité LPA-phosphatase

I 1 Activation des MAP kinases ERK1/2 par le LPA

Les études précédemment réalisées sur les cellules ELT3 ont montré que le LPA est capable d'induire une prolifération cellulaire en activant la voie des MAP Kinases ERK1/2 (Billon-Denis, Tanfin et al. 2008). En effet, lorsque les cellules ELT3 sont incubées en présence de LPA on observe une phosphorylation des protéines ERK1/2, phosphorylation qui reflète leur état d'activation. L'intensité de la phosphorylation varie au cours du temps. Elle culmine aux alentours de 3 à 4 minutes (Figure 1) puis diminue progressivement jusqu'à rejoindre le niveau basal après 20 min d'exposition au LPA. Cet effet transitoire est classiquement observé lors de l'activation des MAP kinases ERK par les RCPG. Plusieurs phénomènes de régulation peuvent expliquer cette désactivation rapide des MAP kinases ERK, parmi lesquels fait partie l'élimination de l'agoniste, c'est-à-dire l'élimination du LPA. Cette hypothèse est d'autant plus probable que le LPA a été montré comme ayant une demi-vie courte dans l'organisme (Tomsig, Snyder et al. 2009).

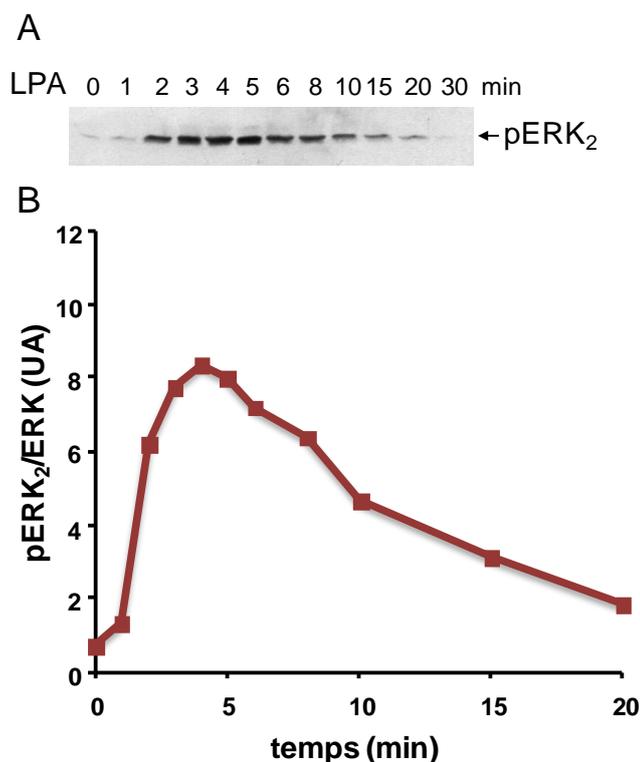


Figure 1. Cinétique d'activation des MAPK kinases ERK1/2 par le LPA. A) Des cellules ELT3 privées de sérum sont incubées en présence de 10 μ M de LPA pendant les temps indiqués. Après extraction, les protéines cellulaires sont analysées par western blot en utilisant un anticorps anti ERK1/2 actif (pERK2). B) Quantification des résultats présentés en A.

I_2 Le LPA est dégradé en présence de cellules ETL3 et de membranes de cellule ETL3

Pour déterminer si les cellules ETL3 étaient capables de dégrader le LPA nous les avons incubées en présence de 1-oléyl-LPA tritié (^3H -LPA) marqué au niveau des carbones 9 et 10 du groupement oléyl (Figure 2A). Après extraction des lipides totaux contenus dans le mélange réactionnel (milieu + cellules) et leur séparation par chromatographie sur couche mince de silice, on observe une diminution du pic correspondant au LPA situé à environ 3 cm de l'origine et l'apparition de plusieurs pics de radioactivité correspondant à des molécules migrant plus loin que le LPA (Figure 2B et C). La présence de ces différents pics indique que les cellules ETL3 sont capables de dégrader le LPA et/ou de l'utiliser pour synthétiser d'autres molécules.

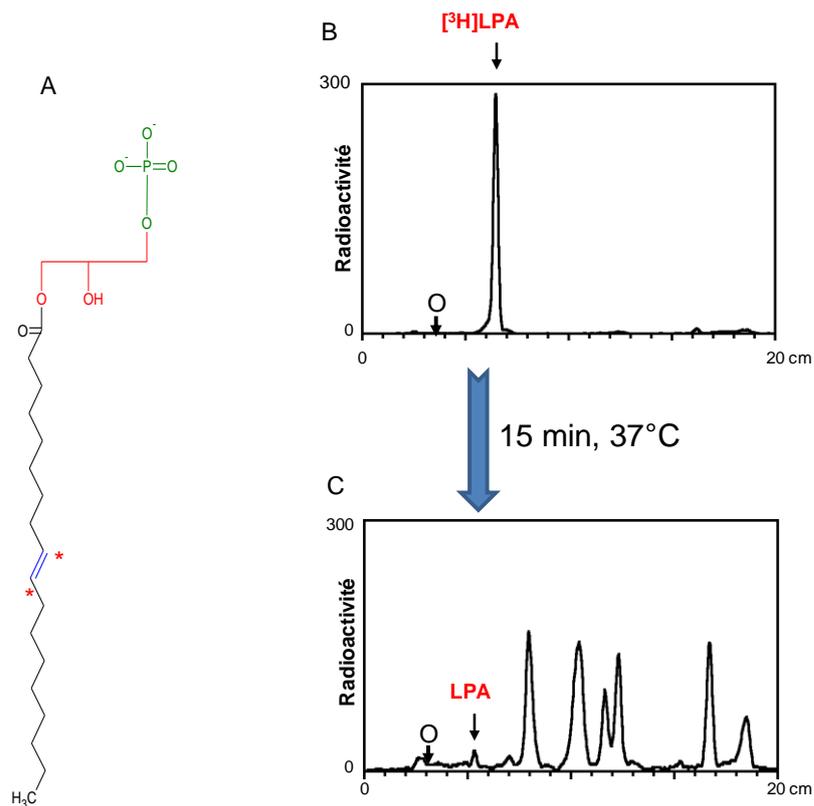


Figure 2. Le LPA est dégradé en présence des cellules ETL3. A) Représentation du 1-Oleoyl-[Oleoyl-9,10- ^3H]-sn-3-phosphate. B-C) Des cellules ETL3 sont incubées en présence de LPA[^3H] 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ pendant 0 (A) ou 15 min (B) à 37°C. Les lipides totaux sont ensuite extraits et analysés par chromatographie sur couche mince. Les chromatogrammes obtenus après comptage de la radioactivité représentent l'intensité de la radioactivité en fonction de la position sur la plaque de chromatographie. O = origine de migration.

Pour pouvoir identifier clairement les produits de dégradation du LPA, une expérience identique à la précédente a été réalisée en remplaçant les cellules par des extraits membranaires issus de cellules ELT3. Dans ces conditions, le recyclage des produits de dégradation ne peut avoir lieu car de nombreux cofacteurs et substrats nécessaires aux réactions de synthèse ne sont pas présents du fait de l'absence du compartiment cytosolique. Après incubation des membranes en présence du LPA tritié et extraction des lipides, l'analyse par chromatographie montre toujours une disparition du pic de LPA mais révèle cette fois l'apparition de seulement deux autres pics de radioactivité (Figure 3). Ces deux pics sont situés à 11 cm et 14 cm de l'origine. Sachant que le LPA tritié est radiomarké sur son groupement oléyl (Figure 2), les produits de dégradation les plus probables ne peuvent être que de l'acide oléique ou du monoacylglycerol (MAG). En comparant la position des pics de radioactivité à celle des standards commerciaux de MAG et d'oléate dans les mêmes conditions (résultat non montré), nous avons déterminé que le pic migrant à 11 cm correspond à de l'oléate, et que le pic situé à 14 cm correspond au MAG.

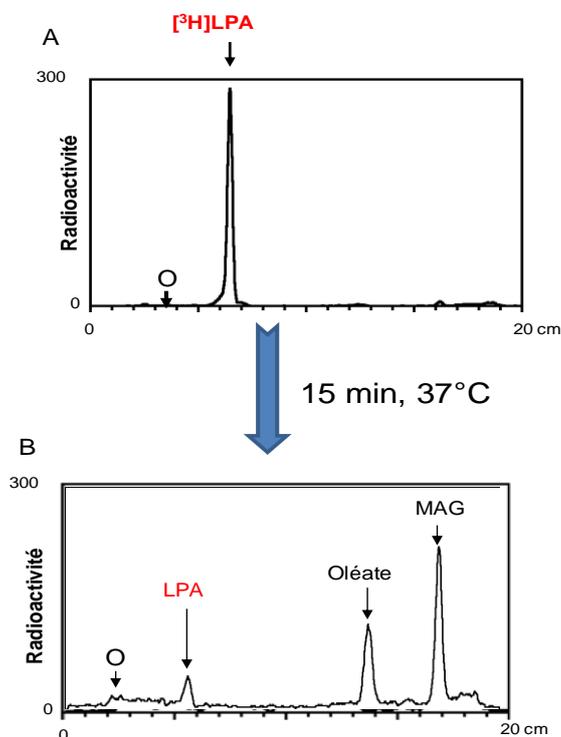


Figure 3. Des membranes de cellules ELT3 sont incubées en présence de LPA[³H] 2 μ Ci/ml pendant 0 (A) ou 15 min (B) à 37°C. Les lipides totaux sont ensuite extraits et analysés par chromatographie sur couche mince. Les chromatogrammes obtenus après comptage de la radioactivité représentent l'intensité de la radioactivité en fonction de la position sur la plaque de chromatographie. O = origine de migration.

Deux schémas réactionnels sont envisageables pour expliquer la présence de ces deux produits de dégradation de LPA. Dans un schéma séquentiel, le LPA serait tout d'abord déphosphorylé par une phosphatase pour former du MAG et du phosphate puis une lipase, hydrolyserait le MAG nouvellement formé en acide oléique et en glycérol (Figure 4A).

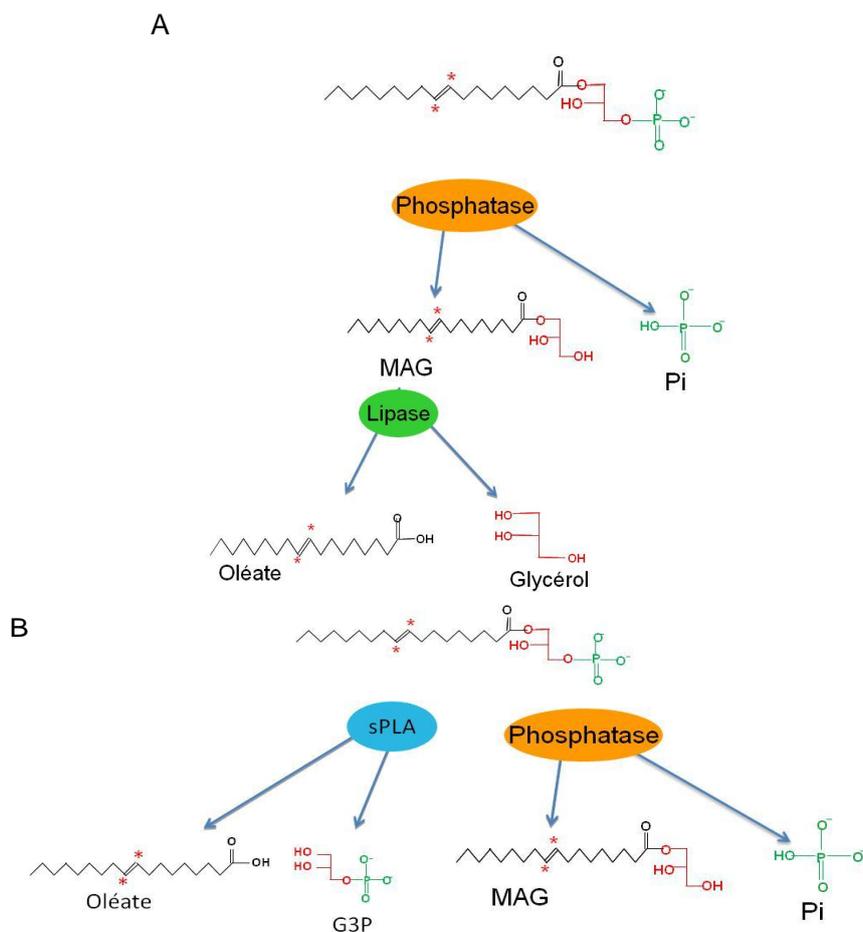


Figure 4A. Voies de dégradation du LPA. MAG, monoacylglycérol; G3P, glycérol 3-phosphate; Pi, phosphate inorganique; sPLA, phospholipase A sécrétée.

Dans un schéma de mécanismes parallèles, le LPA serait déphosphorylé comme décrit ci-dessus et en parallèle hydrolysé par une phospholipase A qui formerait de l'acide oléique et du glycérol-3-phosphate (Figure 5B). Afin de déterminer lequel de ces deux processus réactionnels était le plus probable, nous avons réalisé des cinétiques de dégradation du LPA. Pour cela, le LPA tritié a été

incubé en présence de membranes de cellules ELT3 pendant différents temps d'incubation à 37°C.

Les résultats, présentés en Figure 5A, montrent que très rapidement la quantité de LPA diminue (70-75% en 5 minutes) alors que parallèlement le MAG augmente rapidement (environ 70%). Pendant ce temps, la quantité d'acide oléique reste très faible (10% dans les 5 premières minutes). Après 10 minutes de réaction, la quasi-totalité du LPA (environ 90%) est dégradée et on observe que la quantité de MAG commence à diminuer, alors que la quantité d'acide oléique ne cesse d'augmenter. Ces premiers résultats suggèrent fortement que le LPA est tout d'abord déphosphorylé en MAG, et par la suite ce MAG est hydrolysé en oléate et glycérol. Pour confirmer cette hypothèse, la dégradation du LPA par les membranes de cellules ELT3 a été mesurée en présence d'ortho-vanadate de sodium, un inhibiteur non sélectif des phosphatases. Après 5 minutes de réaction à 37°C, la dégradation du LPA en présence de vanadate est nettement ralentie et n'atteint que 30% de dégradation contre 80 % en absence de vanadate (Figure 5B). De plus, on observe que les quantités de MAG et d'oléate sont plus faibles en présence de vanadate (Figure 5B). Le fait que la quantité d'oléate formé soit sensible au vanadate suggère fortement que la formation d'oléate dépend de la quantité de MAG formé. Ces résultats renforcent l'idée que le LPA serait dégradé selon un schéma réactionnel séquentiel faisant intervenir une phosphatase puis une lipase (Figure 5A).

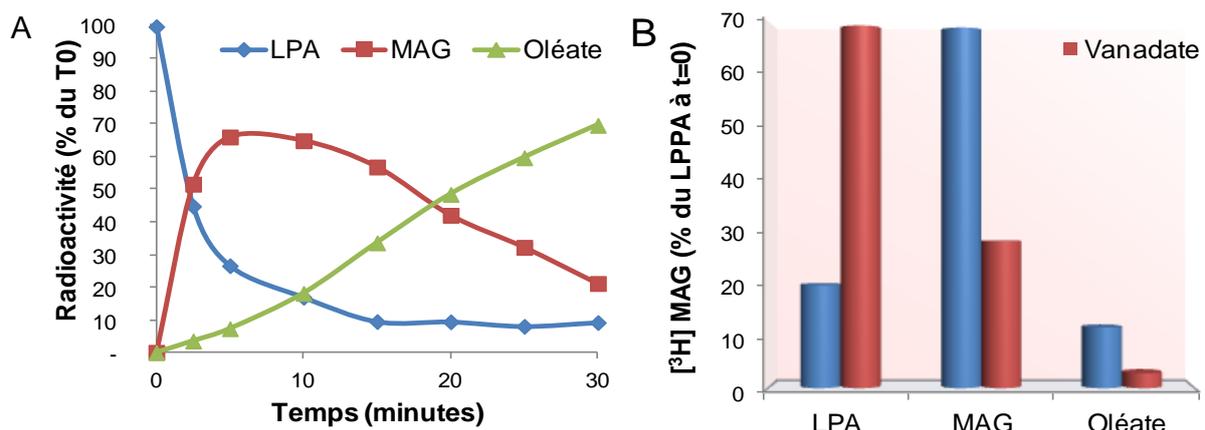


Figure 5. Cinétique de dégradation du LPA^[3H]. A) Des membranes de cellules ELT3 (2 µg/ml) sont incubées en présence de LPA^[3H] (2 µCi/ml) à 37°C pendant les temps indiqués. B) Des membranes de cellules ELT3 (2 µg/ml) sont incubées en présence de LPA^[3H] (2µCi/ml) à 37°C en présence ou en absence d'orthovanadate 1 mM. Après extraction des lipides et analyse par CCM, la radioactivité des pics de LPA, MAG et oléate est mesurée. La radioactivité de chaque pic est exprimée en % de la radioactivité du pic de LPA à To de la réaction

I 3 La déphosphorylation du LPA réduit son effet sur l'activation de ERK1/2

Les résultats précédents ont montré qu'en présence de membranes de cellules ELT3 ou de cellules ELT3 le LPA était dégradé en MAG. Nous avons donc recherché l'influence de cette dégradation sur les effets du LPA, en particulier sur l'activation des MAP kinases ERK. Le LPA étant déphosphorylé en MAG, nous avons testé l'effet de ce dernier sur l'activation de ERK1/2. Les résultats de la Figure 6A montrent que, contrairement au LPA, le MAG n'est pas capable d'induire une activation de ERK. Le MAG n'ayant pas d'effet, il serait logique que la dégradation du LPA entraîne une diminution de ses effets. Pour confirmer cela, du LPA a été pré-incubé en présence de membranes de cellules ELT3 avant son ajout sur des cellules dans le but de tester son pouvoir activateur des MAP kinases ERK. Dans une expérience contrôle, la pré-incubation du LPA avec les membranes a eu lieu à 0°C au lieu de 37 °C pour réduire les activités enzymatiques dont l'activité lipide-phosphatase. Comme attendu, on observe que le LPA pré-incubé avec des membranes à 37°C (conditions où le LPA est dégradé) a un effet diminué par rapport au LPA pré-incubé à froid (Figure 6B et C).

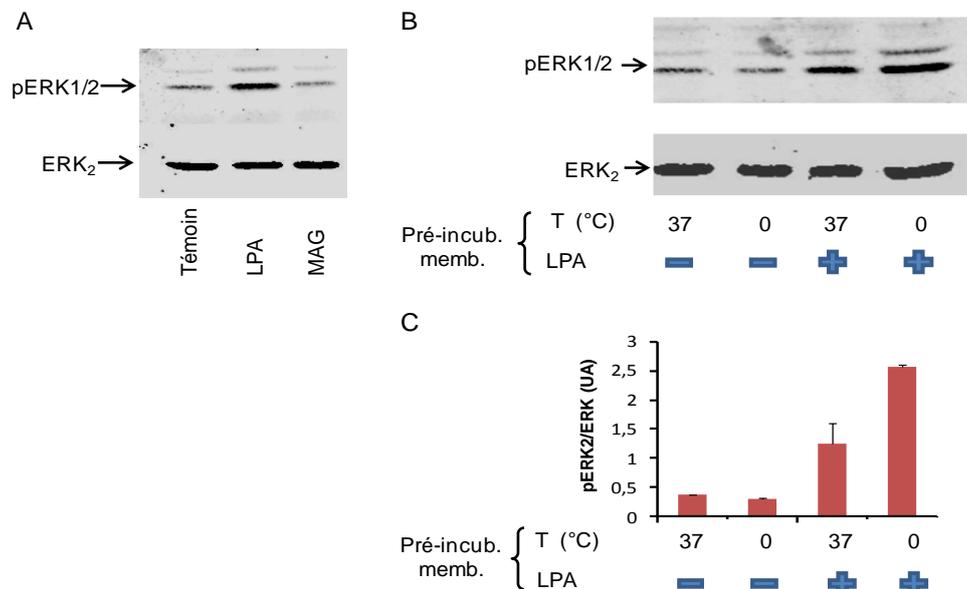
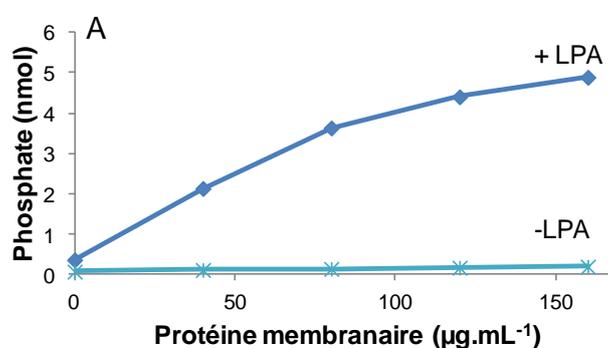


Figure 6. La dégradation du LPA réduit ses effets cellulaires. A) Des cellules ELT3 privées de SVF sont incubées en présence de 10 μ M de LPA ou de MAG pendant 3 min à 37°C. B) Des membranes de cellules ELT3 (200 μ g/ml de protéines) sont incubées en absence ou en présence de LPA 100 μ M pendant 1 h à 4°C ou 37°C. Après centrifugation à 15.000 x g les surnageants sont dilués 10 fois et ajoutés à des cellules ELT3 pendant 3 min à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines cellulaires sont analysées par western blot en utilisant un anticorps anti ERK1/2 actives (pERK1/2) et anti ERK totales. C) Quantification des résultats de (B).

I 4 Caractérisation biochimique des enzymes déphosphorylant le LPA

La modulation de l'effet LPA sur le module MAP Kinase ERK1/2 semble donc dépendre, en partie, de sa déphosphorylation. En effet, l'activité lipide phosphatase portée par les membranes de cellules ELT3 est capable de diminuer l'activation de ERK1/2 par le LPA. Nous avons alors étudié les caractéristiques de cette activité afin d'identifier les enzymes impliquées. Pour cela nous avons utilisé une méthode différente par rapport aux expériences précédentes. En effet, nous avons mesuré la quantité de phosphate inorganique produit à l'aide d'un dosage colorimétrique. Cette méthode a l'avantage d'être beaucoup plus simple à réaliser et de ne pas faire appel à l'utilisation de produits radioactifs.

Tout d'abord, nous avons mesuré l'effet de la variation de la quantité de protéines membranaires sur la libération du phosphate à partir du LPA (Figure 7A). Pour cela, le LPA a été incubé pendant 15 minutes, en présence de quantités variables de membranes de cellules ELT3. La réaction est arrêtée par l'ajout du réactif de dosage. On observe, tout d'abord, que les membranes seules ne produisent pas de phosphate. Par contre, en présence de LPA, on observe une production de phosphate qui est proportionnelle à la concentration de protéines membranaires jusqu'à la concentration de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de protéines (Figure 7A) ce qui correspond à $4 \mu\text{g}$ dans les conditions expérimentales utilisées. Tous les tests ultérieurs seront donc réalisés avec des concentrations protéiques inférieures. Cette expérience montre également que le phosphate dosé provient uniquement de l'hydrolyse du LPA et non pas d'autres constituants de la membrane.



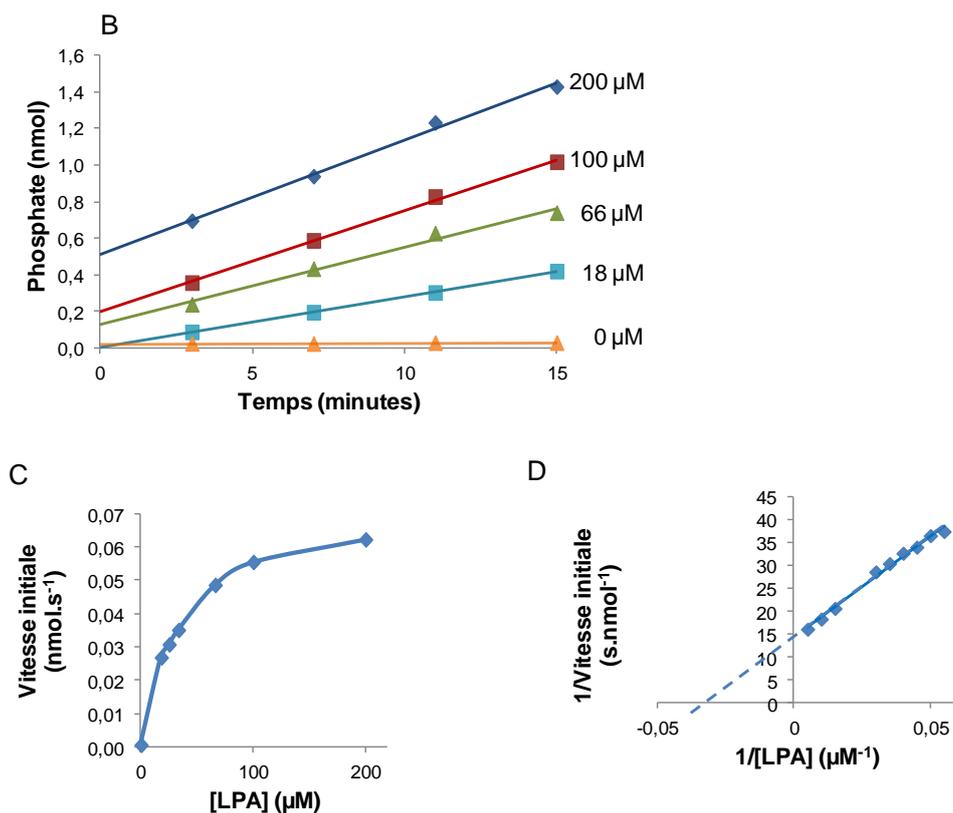
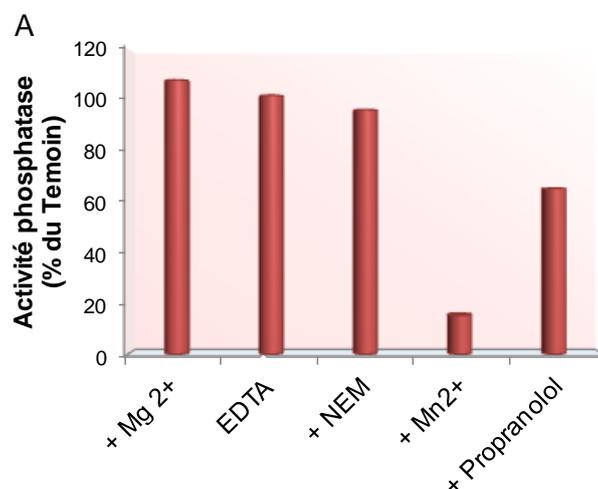


Figure 7. Etude biochimique de l'activité phosphatase dans les cellules ELT3. A. Des membranes de cellules ELT3 sont incubées aux concentrations indiquées en présence de 100 μM de LPA pendant 30 min à 37°C. La quantité de phosphate inorganique produite est mesurée par dosage colorimétrique. B) Des membranes de cellules ELT3 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéines) sont incubées en présence des concentrations indiquées de LPA. Aux temps indiqués, la quantité de phosphate produite est mesurée par dosage colorimétrique. C) Représentation des vitesses initiales de réaction déduites des cinétiques présentées en B, en fonction de la concentration initiale en LPA. D) Représentation de Lineweaver-Burk des données présentées en C.

Dans un second temps, nous avons effectué des études cinétiques de dégradation du LPA (Figure 7B). Ainsi, la dégradation du LPA a été mesurée au cours du temps avec différentes concentrations de phospholipides. Ces cinétiques permettent de déterminer la vitesse initiale de déphosphorylation et d'en déduire les paramètres cinétiques de la réaction. En traçant la représentation graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat (LPA) on obtient une courbe correspondant au modèle Michaelien (Figure 7C) et la représentation en double inverse de Lineweaver&Burk donne bien une droite (Figure 7D). La valeur du K_M déduite de ces courbes est d'environ $36 \pm 10 \mu\text{M}$.

I 5 L'activité phosphatase hydrolysant le LPA possède les caractéristiques des PAP2

L'hypothèse la plus probable qui rend compte de la déphosphorylation du LPA dans les membranes de cellules ELT3 est la présence au sein de ces membranes d'enzymes de la famille des lipide-phosphate-phosphatases (LPP), cependant on ne peut pas exclure l'intervention d'autres types d'enzymes. Les LPP sont des enzymes possédant une activité phosphatidate phosphohydrolase de type 2 (PAP2) insensible au NEM et indépendante des ions Mg^{2+} . Nous avons donc testé l'effet du NEM et d'un chélateur d'ion Mg^{2+} , l'EDTA, sur l'activité LPA-phosphatase contenue dans les membranes des cellules ELT3. Les résultats de la Figure 8A montrent que la production de phosphate à partir du LPA est totalement insensible au NEM et indépendante de la présence des ions Mg^{2+} . De plus, il a été montré que les ions Mn^{2+} et le propranolol inhibent l'activité des PAP2 (Fleming and Yeaman 1995). La Figure 8A montre que l'activité LPA phosphatase présente dans les membranes cellulaires est presque totalement inhibée par les ions Mn^{2+} et partiellement inhibée par le propranolol. Le Mn^{2+} a été montré par plusieurs équipes comme un inhibiteur des LPP (Furneisen and Carman 2000). Le propranolol, quant à lui, a été décrit comme un inhibiteur des PAP1, mais il est également capable d'inhiber partiellement les activités PAP2 (Kanoh, Imai et al. 1992; Roberts, Sciorra et al. 1998). Tous ces résultats sont en accord avec l'implication des LPP dans la réaction de déphosphorylation du LPA par les membranes de cellules ELT3.



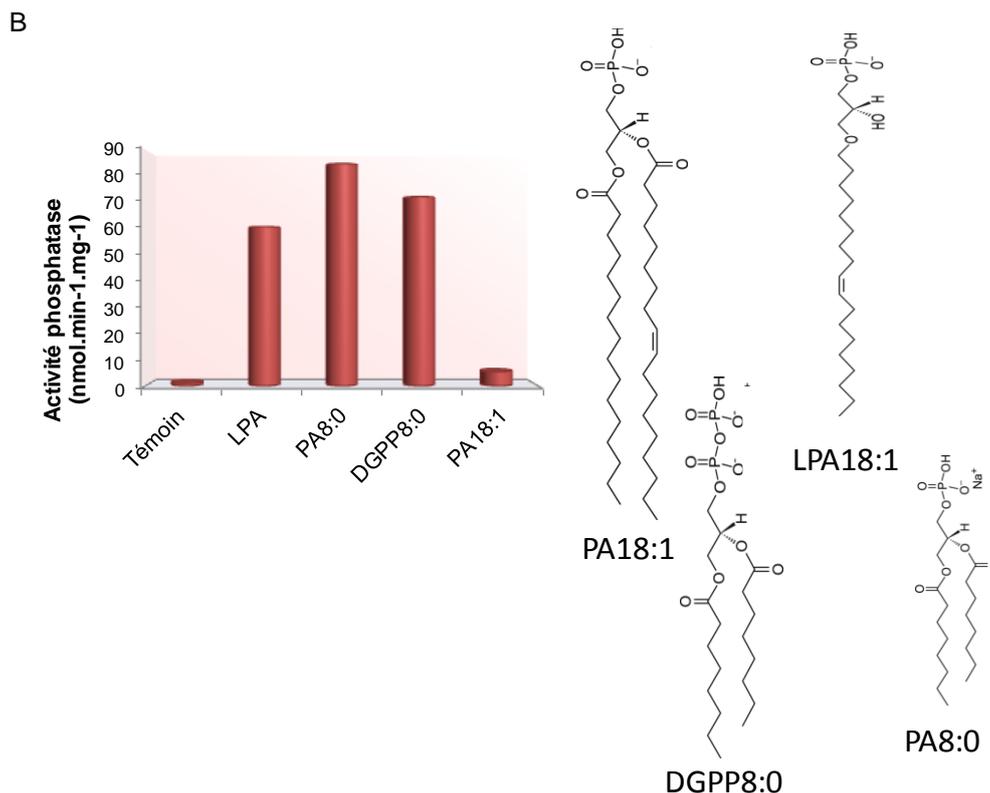


Figure 8. Caractérisation de l'activité LPA phosphatase. A) Des membranes de cellules ELT3 (40 µg/ml de protéines) sont incubées en présence de 100 µM de LPA et de 1 mM de MgCl₂, d'EDTA, de MnCl₂ ou de 0,5 mM de propranol pendant 30 min à 37°C. B) Des membranes de cellules ELT3 (40 µg/ml de protéines) sont incubées en présence de 100 µM de LPA, de PA8:0, de DGPP8:0 ou de PA18:1 pendant 30 min à 37°C. La quantité de phosphate produite est mesurée par dosage colorimétrique.

Les résultats précédents nous montrent que les cellules ELT3 possèdent une activité phosphatase qui métabolise le LPA. De plus cette activité LPA phosphatase semble posséder les principales caractéristiques des LPP (PAP2). Une autre caractéristique des PAP2 est leur capacité à déphosphoryler d'autres phospholipides. Nous avons donc voulu savoir si l'activité présente dans les membranes de cellules ELT3 pouvait dégrader d'autres phospholipides comme entre autres l'acide phosphatidique (PA), la sphingosine 1-phosphate (S1P) et le diacylglycerol pyrophosphate (DGPP). Ainsi, des membranes de cellules ELT3 ont été mises en présence de dioctanoylDGPP (DGPP8:0), d'acide phosphatidique dioctanoyl ou dioléyl (PA8:0 ou PA18:1) et en présence de S1P. Les résultats présentés dans la Figure 8 montrent clairement que les membranes de cellules ELT3 sont capables d'hydrolyser également le PA8:0 et le DGPP8:0. Par contre, de manière surprenante, nous n'avons pas observé de dégradation du PA18:1 et de la

S1P. Il est possible que cette absence d'effet soit due à une faible solubilité de ces substrats dans les conditions expérimentales utilisées. En effet, les substrats de nature lipidique sont souvent peu ou pas solubles en phase aqueuse et nécessitent d'être préparés en présence de détergents ou de serumalbumine. Or, le test d'activité que nous avons développé, basé sur le dosage colorimétrique du phosphate inorganique est très sensible aux agents extérieurs, ainsi le Triton X-100 ou la BSA, même à faible concentration perturbent le dosage, et nous ne pouvons donc pas les utiliser pour solubiliser ces lipides. Ces résultats tendent à confirmer l'implication d'une activité phosphatase de type PAP2 dans les cellules ELT3, même si l'absence d'activité sur la S1P et le PA18:1 semble s'opposer à cette hypothèse.

I_6 Dans les cellules ELT3, seule la LPP1 est exprimée

L'activité PAP2 est principalement portée par les enzymes appelées Lipide-phosphate phosphatases (LPP). Actuellement, trois isoformes de LPP ont été caractérisées LPP1, LPP2 et LPP3. Les études biochimiques précédentes suggèrent l'intervention d'un seul type d'enzyme dans la déphosphorylation du LPA. Nous avons voulu savoir quelles étaient les isoformes exprimées dans les cellules ELT3. En l'absence d'anticorps dirigés contre les isoformes des différentes LPP, nous avons déterminé l'expression via la technique de RT-PCR quantitative en temps réel. Cette technique permet de quantifier les ARNm correspondants à une protéine donnée par rapport à la quantité d'ARNm d'un standard interne, ici la glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). En utilisant des amorces spécifiques des trois isoformes des LPP (Tableau 2 Matériels et Méthodes) nous avons montré que les cellules ELT3 n'expriment de manière significative que la LPP1 (Figure 9). Il semblerait donc que la dégradation du LPA dans les cellules ELT3 soit uniquement due à l'activité LPP1.

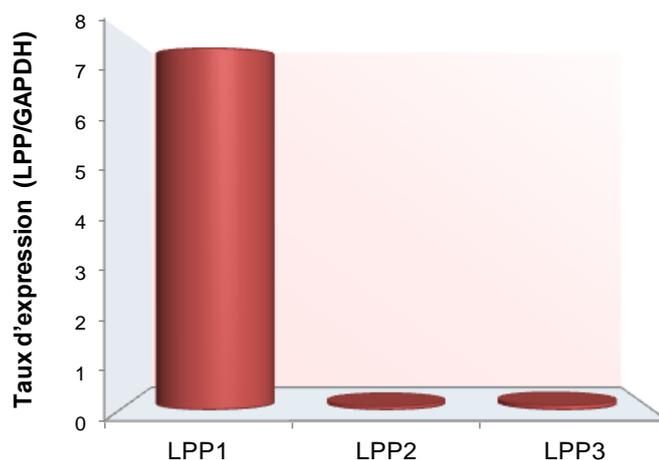


Figure 9. Quantification des transcrits LPP1, 2 et 3 dans les cellules ELT3. Les résultats sont rapportés à la quantité de transcrits GAPDH mesurée dans chaque préparation d'ADNc.

I 7 La LPP1 est responsable de l'activité ectophosphatase des cellules ELT3

Nous avons observé que les cellules ELT3 dégradent le LPA et n'expriment que la LPP1. Pour confirmer que la LPP1 est responsable de la déphosphorylation du LPA, nous avons étudié l'effet d'une down-régulation de la LPP1 sur la déphosphorylation du LPA. Pour cela nous avons utilisé la technique d'ARN interférence en utilisant des petits ARN interférants (siRNA) ciblant la LPP1. Dans un premier temps, l'effet des siRNA sur la quantité d'ARNm LPP1 a été déterminé par RT-PCR quantitative. La Figure 10A montre que la transfection des cellules ELT3 avec les siRNA LPP1 induit une diminution très importante (environ 90%) de la quantité d'ARNm LPP1. Cette baisse importante de l'expression de la LPP1 ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'expression des autres isoformes, l'activité LPP totale des cellules transfectées avec les siRNA LPP1 devrait donc être inférieure à celle des cellules traitées avec les siRNA contrôles. Nous avons alors mesuré l'impact des siRNA LPP1 sur l'activité lipide-phosphatase des cellules. Les LPP sont des enzymes transmembranaires caractérisées par une ecto-activité hydrolysant les substrats phospholipidiques extracellulaires. Ceci est particulièrement vrai pour la LPP1 qui a été montrée comme étant principalement localisée à la membrane plasmique (Jasinska, Zhang et al. 1999). Ainsi, pour étudier les effets des

siRNA LPP1 nous avons quantifié l'activité phosphatase sur cellules entières contrairement aux expériences précédentes où des membranes de cellules ELT3 avaient été utilisées. Les résultats présentés dans la Figure 10b montrent que les cellules transfectées avec les ARNi LPP1 ont une activité PA phosphatase réduite de moitié par rapport aux cellules transfectées avec des siRNA contrôles. Enfin, la Figure 10C montre que la diminution de la dégradation du LPA, dans les cellules ELT3 transfectées avec les ARNi LPP1, entraîne un effet du LPA plus soutenue dans le temps.

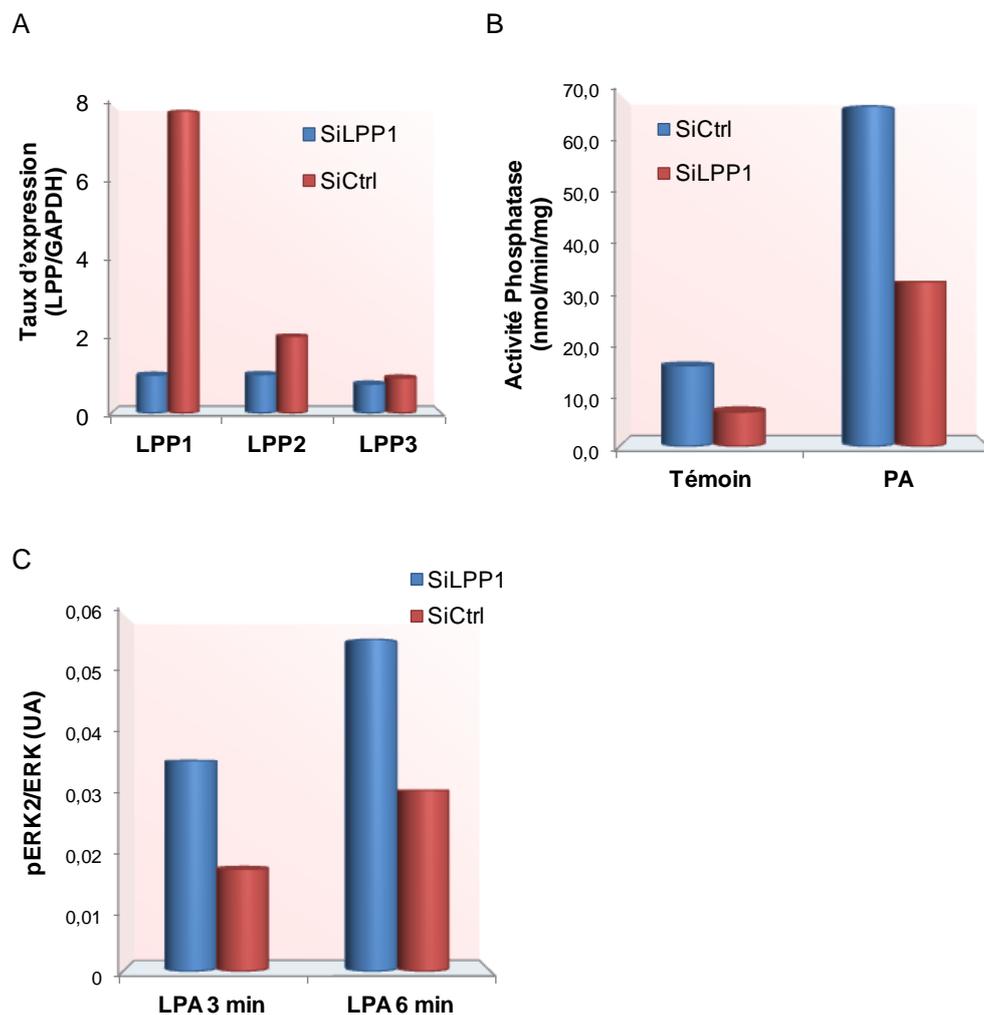


Figure 10. Effet des siRNA LPP1 sur l'activité phosphatase. Des cellules ELT3 ont été transfectées avec des siRNA dirigé contre la LPP1 (siLPP1) et des siRNA contrôles (Ctrl). A) 24h après la transfection, les transcrits LPP1, 2 et 3 sont quantifiés par RT-PCR quantitative. Les résultats sont rapportés à la quantité de transcrit GAPDH mesurée dans chaque préparation d'ADNc. B) 24h après la transfection, des membranes cellulaires (40 µg/ml de protéines) sont incubées en présence de PA pendant 15 min à 37°C. La quantité de phosphate produite est mesurée par dosage colorimétrique. C) 24h après la transfection les ELT3 sont privées de sérum et incubées en présence de 10µM LPA aux temps indiqués à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées et après extraction, les protéines cellulaires sont analysées par western blot en utilisant un anticorps anti -ERK1/2 actives (phosphERK1/2) et anti-ERK totales et l'intensité des bandes est quantifiée.

I 8 Conclusion

Nous avons vu, précédemment, que le LPA induisait une prolifération cellulaire des cellules ELT3 via l'interaction avec un récepteur LPA1 couplé à la protéine Gi. Ces effets cellulaires du LPA sont dépendants, entre autre, de sa concentration qui, elle-même, dépend de ses taux respectifs de synthèse et de dégradation. Dans cette première partie nous avons pu mettre en évidence que les cellules ELT3 étaient capables de dégrader le LPA et que cette dégradation diminuait ses effets sur le module MAP Kinase ERK.

Pour caractériser cette activité nous avons tout d'abord utilisé du LPA tritié qui, via des études cinétiques, nous a permis d'identifier que le MAG était le premier produit de dégradation du LPA. Ainsi, le LPA est tout d'abord déphosphorylé en MAG. Nous avons par la suite pu étudier la déphosphorylation du LPA en quantifiant la libération de phosphate via un dosage colorimétrique.

Cette dernière méthode à l'avantage de ne pas utiliser de produits radioactifs et d'être beaucoup plus simple à mettre en place. En effet, la lourdeur expérimentale associée à l'utilisation de substrats tritiés (extractions lipidiques, CCM) limite fortement le nombre d'échantillons analysables dans chaque expérience. Par ailleurs, comme nous avons pu le montrer, les substrats tritiés ne peuvent pas être utilisés pour déterminer les activités sur cellules vivantes. En effet, les cellules intègrent rapidement les produits de la réaction de déphosphorylation dans leur métabolisme, ce qui rend impossible la quantification précise du produit primaire de déphosphorylation. Le dosage de phosphate, quant à lui, à l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et de permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons simultanément. De plus, il permet de quantifier la production de phosphate à la fois à partir d'extraits membranaires mais aussi de cellules vivantes.

Grâce au développement de cette méthode nous avons pu montrer que, dans les cellules ELT3, le LPA était dégradé par des lipide-phosphate phosphatase. En effet, nous avons observé que l'activité LPA-phosphatase présente dans les membranes de cellules ELT3 était insensible au NEM et indépendante des ions

magnésium. De plus, nous avons observé que le LPA n'était pas le seul substrat puisqu'une incubation des membranes cellulaires en présence de PA8:0 ou de DGPP8:0 entraîne également une production de phosphates. Enfin, lorsqu'on incube des cellules ELT3 intactes en présence de LPA, on observe une production de phosphate inorganique dans le milieu d'incubation. Toutes ces propriétés sont caractéristiques des enzymes de la famille des lipides phosphate phosphatase (Brindley, DN et Sariahmetoglu, BBA, 2009 ; Pyne, S et al., Cell signal, 2009, 14-21 ; McDermott, MI et al., Methods, 2006, 169). Les études cinétiques nous ont permis de déterminer un $K_M = 36 \mu\text{M}$ et un $V_{\text{max}} = 130 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ qui sont du même ordre que les valeurs déjà publiées (Furneisen, J.M et Carman, GM, BBA, 2000, 71). Actuellement, trois isoformes de LPP ont été caractérisées, la LPP1, la LPP2 et la LPP3. Dans les cellules ELT3 nous avons pu observer que seule l'isoforme LPP1 était exprimée. En utilisant des ARN interférents dirigés contre la LPP1 nous avons confirmé que la LPP1 était responsable de la dégradation du LPA dans les cellules ELT3. L'ensemble de ces résultats indique que très certainement, la LPP1 est l'enzyme qui est très majoritairement impliquée dans la déphosphorylation du LPA dans les cellules ELT3.



Inhibition of lipid phosphate phosphatase activity by VPC32183 suppresses the ability of diacylglycerol pyrophosphate to activate ERK_{1/2} MAP kinases

Pierre-Christian Violet, Emmanuelle Billon-Denis, Philippe Robin*

Université Paris-Sud 11, Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619, 91405 Orsay CEDEX France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2012
Received in revised form 26 June 2012
Accepted 11 July 2012
Available online 20 July 2012

Keywords:

Diacylglycerol pyrophosphate
lipid phosphate phosphatase
ERK
Phosphatidic acid
lysophosphatidic acid
ELT3 cell

ABSTRACT

The lipidic metabolite, diacylglycerol pyrophosphate (DGPP), in its dioctanoyl form (DGPP 8:0), has been described as an antagonist for mammalian lysophosphatidic acid (LPA) receptors LPA1 and LPA3. In this study we show that DGPP 8:0 does not antagonize LPA dependent activation of ERK_{1/2} MAP kinases but strongly stimulated them in various mammalian cell lines. LPA and DGPP 8:0 stimulation of ERK_{1/2} occurred through different pathways. The DGPP 8:0 effect appeared to be dependent on PKC, Raf and MEK but was insensitive to pertussis toxin and did not involve G protein activation. Finally we showed that DGPP 8:0 effect on ERK_{1/2} was dependent on its dephosphorylation by a phosphatase activity sharing lipid phosphate phosphatase properties. The inhibition of this phosphatase activity by VPC32183, a previously characterized LPA receptor antagonist, blocked the DGPP 8:0 effect on ERK_{1/2} activation. Moreover, down-regulation of lipid phosphate phosphatase 1 (LPP1) expression by RNA interference technique also reduced DGPP 8:0-induced ERK_{1/2} activation. Consistently, over expression of LPP1 in HEK293 cells increases DGPP 8:0 hydrolysis and this increased activity was inhibited by VPC32183. In conclusion, DGPP 8:0 does not exert its effect by acting on a G protein coupled receptor, but through its dephosphorylation by LPP1, generating dioctanoyl phosphatidic acid which in turn activates PKC. These results suggest that LPP1 could have a positive regulatory function on cellular signaling processes such as ERK_{1/2} activation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diacylglycerol pyrophosphate (DGPP) is a lipidic metabolite belonging to the family of pyrophosphorylated lipids as farnesyl pyrophosphate (FPP) or geranylgeranyl pyrophosphate. DGPP synthesis is catalyzed by phosphatidate kinase which phosphorylates phosphatidic acid (PA) [1]. Although it has been partially purified and characterized by biochemical approaches, the gene encoding PA kinase has not been cloned yet. Short-chain dioctanoylglycerol pyrophosphate (DGPP 8:0) has been shown to have several effects on mammalian cells. It was first reported that DGPP 8:0 was able to activate murine macrophages [2]. This activation was accompanied by protein kinase C translocation, ERK_{1/2} mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphorylation and prostaglandin production. It was suggested that these effects were dependent on the interaction of DGPP with membrane receptors. More recently DGPP 8:0 has been shown to be an antagonist of the lysophosphatidic acid (LPA) receptors [3]. LPA is a bioactive lysophospholipid, present in diverse biological fluids in mammals and possesses a strong mitogenic potency. LPA is known to act through its binding to G protein-coupled receptors (GPCR). To

date, nine LPA receptors have been cloned and characterized. These receptors belong to two distinct gene families: the Endothelial Differentiation Gene (EDG) family and the purinergic P2Y family. LPA1-3 receptors belong, as sphingosine-1-phosphate receptors, to the EDG family and are the best characterized LPA receptors. The second group is composed of P2Y9/GPR23/LPA4, GPR92/LPA5, GPR87/LPA6, P2y5/LPA7, P2Y10/LPA8 and GPR35/LPA9 [4]. Apart from LPA4, the other receptors have not been extensively characterized yet. It has been demonstrated that DGPP 8:0 is an antagonist for LPA1 and LPA3, but not for LPA2 receptor [3] nor for GPR92/LPA5 receptor [5]. More recently, DGPP 8:0 has been shown to also antagonize LPA effects at the GPR87 and P2Y10 receptors [6,7]. Nothing is known about a possible effect of this lipid on the more recently identified LPA receptors GPR35 and P2Y5. In addition to its effects on GPCRs, LPA is able to activate the nuclear receptor PPAR γ [8]. Interestingly, FPP, pyrophosphate lipid as DGPP, was reported to activate PPAR γ and GPR92/LPA5, suggesting that LPA and pyrophosphate lipids may share common targets [9,10].

In yeast and plants, DGPP can be converted to PA through its dephosphorylation by the lipid phosphate phosphatases (LPP) [11]. LPP are enzymes with a phosphatidate phosphohydrolase activity, characterized by a N-ethylmaleimide insensitivity and a Mg²⁺ independence. In mammalian cells, three LPP isoforms have been described (LPP1, LPP2 and LPP3) which hydrolyze many lipid phosphates such as PA, LPA, sphingosine-1-phosphate (S1P), ceramide-1-phosphate but

* Corresponding author at: Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619, Bâtiment 430, Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France. Tel: +33 1 69 15 80 32; fax: +33 1 69 85 37 15.
E-mail address: pilippe.robin@u-psud.fr (P. Robin).

Inhibition of lipid phosphate phosphatase activity by VPC32183 suppresses the ability of diacylglycerol pyrophosphate to activate ERK_{1/2} MAP kinases

Pierre-Christian VIOLET, Emmanuelle BILLON-DENIS and Philippe ROBIN

From Université Paris-Sud 11, Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619, 91405 Orsay CEDEX, France

To whom correspondence should be addressed : Philippe ROBIN, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619, Bâtiment 430, Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France, Tel : +33 1 69 15 80 32, Fax : +33 1 69 85 37 15, E-mail : philippe.robin@u-psud.fr

ABSTRACT

The lipidic metabolite, diacylglycerol pyrophosphate (DGPP), in its dioctanoyl form (DGPP 8:0), has been described as an antagonist for mammalian lysophosphatidic acid (LPA) receptors LPA1 and LPA3. In this study we show that DGPP 8:0 does not antagonize LPA dependent activation of ERK_{1/2} MAP kinases but strongly stimulated them in various mammalian cell lines. LPA and DGPP 8:0 stimulation of ERK_{1/2} occurred through different pathways. The DGPP 8:0 effect appeared to be dependent on PKC, Raf and MEK but was insensitive to pertussis toxin and did not involve G protein activation. Finally we showed that DGPP 8:0 effect on ERK_{1/2} was dependent on its dephosphorylation by a phosphatase activity sharing lipid phosphate phosphatase properties. The inhibition of this phosphatase activity by VPC32183, a previously characterized LPA receptor antagonist, blocked the DGPP 8:0 effect on ERK_{1/2} activation. Moreover, down-regulation of lipid phosphate phosphatase 1 (LPP1) expression by RNA interference technique also reduced DGPP 8:0-induced ERK_{1/2} activation. Consistently, over expression of LPP1 in HEK293 cells increases DGPP 8:0 hydrolysis and this increased activity was inhibited by VPC32183. In conclusion, DGPP 8:0 does not exert its effect by acting on a G protein coupled receptor, but through its dephosphorylation by LPP1, generating dioctanoyl phosphatidic acid which in turn activates PKC. These results suggest that LPP1 could have a positive regulatory function on cellular signaling processes such as ERK_{1/2} activation.

Keywords: diacylglycerol pyrophosphate, lipid phosphate phosphatase, ERK, phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, ELT3 cells

1. Introduction

Diacylglycerol pyrophosphate (DGPP) is a lipidic metabolite belonging to the family of pyrophosphorylated lipids as farnesyl pyrophosphate (FPP) or geranylgeranyl pyrophosphate. DGPP synthesis is catalyzed by phosphatidate kinase which phosphorylates phosphatidic acid (PA) [1]. Although it has been partially purified and characterized by biochemical approaches, the gene encoding PA kinase has not been cloned yet. Short-chain dioctanoylglycerol pyrophosphate (DGPP 8:0) has been shown to have several effects on mammalian cells. It was first reported that DGPP 8:0 was able to activate murine macrophages [2]. This activation was accompanied by protein kinase C translocation, ERK_{1/2} mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphorylation and prostaglandin production. It was suggested that these effects were dependent on the interaction of DGPP with membrane receptors. More recently DGPP 8:0 has been shown to be an antagonist of the lysophosphatidic acid (LPA) receptors [3]. LPA is a bioactive lysophospholipid, present in diverse biological fluids in mammals and possesses a strong mitogenic potency. LPA is known to act through its binding to G protein-coupled receptors (GPCR). To date, nine LPA receptors have been cloned and characterized. These receptors belong to two distinct gene families: the Endothelial Differentiation Gene (EDG) family and the purinergic P2Y family. LPA1-3 receptors belong, as sphingosine-1-phosphate receptors, to the EDG family and are the best characterized LPA receptors. The second group is composed of P2Y9/GPR23/LPA4, GPR92/LPA5, GPR87/LPA6, P2Y5/LPA7, P2Y10/LPA8 and GPR35/LPA9 [4]. Apart from LPA4, the other receptors have not been extensively characterized yet. It has been demonstrated that DGPP 8:0 is an antagonist for LPA1 and LPA3, but not for LPA2 receptor [3] nor for GPR92/LPA5 receptor [5]. More recently, DGPP 8:0 has been shown to also antagonize LPA effects at the GPR87 and P2Y10 receptors [6, 7]. Nothing is known about a possible effect of this lipid on the more recently identified LPA receptors GPR35 and P2Y5. In addition to its effects on GPCRs, LPA is able to activate the nuclear receptor PPAR γ [8]. Interestingly, FPP, pyrophosphate lipid as DGPP, was reported to activate PPAR γ and GPR92/LPA5, suggesting that LPA and pyrophosphate lipids may share common targets [9, 10].

In yeast and plants, DGPP can be converted to PA through its dephosphorylation by the lipid phosphate phosphatases (LPP) [11]. LPP are enzymes with a phosphatidate phosphohydrolase activity, characterized by a N-ethylmaleimide insensitivity and a Mg²⁺ independence. In mammalian cells, three LPP isoforms have been described (LPP1, LPP2 and LPP3) which hydrolyze many lipid phosphates such as PA, LPA, sphingosine-1-phosphate (S1P), ceramide-1-phosphate but also DGPP [12, 13]. LPP are integral membrane proteins composed of six transmembrane domains with the

active site exposed on the extracellular side of plasma membrane or on the luminal side of endomembranes. Despite, the presence of DGPP has not been observed in animals, recently, novel lipid phosphatases, DPPL1 and DPPL2, presenting high sequence homology with yeast DPP1 phosphatase, were identified in the mammals [14]. These phosphatases are able to catalyze the dephosphorylation of LPA and PA but prefer DGPP and their activity is Mg^{2+} -independent and NEM-sensitive. Also related to the lipid phosphatase family are the S1P phosphatases SPP1 and SPP2 [15, 16]. As LPP activity, SPP activity is independent from Mg^{2+} ions but partially sensitive to NEM [17] and appears to be specific for sphingolipid substrates [15-17].

Recently we investigated the effect of LPA on $ERK_{1/2}$ activation in ELT3 rat smooth muscle cells and showed the involvement of the LPA1 receptor in the LPA effects [18]. When the antagonistic effect of DGPP8:0 was tested in this process, no inhibitory effect was detected, but surprisingly a stimulatory effect was observed. In the present study we showed that DGPP8:0 activate $ERK_{1/2}$ MAP kinases in several cell lines, including ELT3 cells, and investigated the mechanisms involved, in comparison with the LPA activated signaling pathways.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All the media and reagents for the cell culture, Lipofectamine RNAiMax, AlexaFluor680-conjugated anti-mouse IgG, anti-PKC α and anti-PKC ϵ antibody were from Life technologies. 4 β -phorbol 12,13 dibutyrate (PDBu), Ro31-8220, Pertussis Toxin (PTX), Ki16425, Raf inhibitor GW5074 and Farnesyl pyrophosphate were obtained from Sigma Chemicals. 1-oleoyl-2-*sn*-lysophosphatidic acid (LPA), 1,2-dioctanoylglycerol pyrophosphate (DGPP 8:0), 1,2-dioctanoyl phosphatidic acid (PA 8:0), 1,2-dioctanoyl glycerol (DG 8:0) and (S)-phosphoric acid mono-{2-octadec-9-enoylamino-3-[4-(pyridin-2-ylmethoxy)-phenyl]-propyl} ester (VPC32183) were from Avanti Polar Lipids. ON-TARGETplus SMARTpool rat PPAP2A (LPP1) siRNA (#L-095781-01) was from Dharmacon, DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR kit was from Thermo Scientific. Control siRNA was from Eurofins MWG Operon and the sequence was previously published [19]. U0126 was from Promega corporation. Anti-rabbit IgG HRP conjugated and anti-active ERK_{1/2} monoclonal antibody was from Cell Signaling Technology. Anti-ERK₂ and anti-PDGF β receptor antibody were from Santa Cruz. Anti-ERK_{1/2} was from Zymed Life Technologies. IRDye800-conjugated anti rabbit IgG was from Li-Cor Biosciences. Bioluminescence assay kit was from Biomol. Guanosine 5'-(gamma-thio)triphosphate, [³⁵S] 46.2 TBq/mmol was from Perkin Elmer. BCA protein assay was from Thermo Scientific. GF-C filters were from Millipore.

2.2. Cloning of LPP1 from ELT3 cells

Total RNA was prepared using NucleoSpin[®] RNAII (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. The reverse transcription reaction was performed with 5 μ g of total RNA using 200 units of Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)-reverse transcriptase, 200 μ M deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), and 10 μ M random hexamer primers. PCR primers for amplification of LPP1 were based on the GenBank sequence (NM_022538). The primers for LPP1 span the start codon and a modified codon (underlined) in place of the stop codon and contain HindIII and BamHI sites (italics) : 5'-GCAAGCTTATGTTTCGACAAGACGCGGCTGC-3' (Forward primer) and 5'-GCTGGATCCCGGGGCTCATGATTCCTTGCG-3' (Reverse primer).

The PCR reaction was performed, in a thermal cycler (icycler; Bio-Rad) with 3 μ L of the RT reaction using the Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase according to the manufacturer's protocol. The amplified condition were 98°C for 30 seconds followed by 30 cycles of 98°C for 10 seconds, 70°C for

30 seconds, 72°C for 45 seconds, and a final extension at 72°C for 10 minutes. The LPP1 PCR product was digested by BamHI and HindIII restriction and ligated into pEGFP-N1 (Clontech), using T4 DNA ligase according to the manufacturer's indication. The LPP1 sequence was verified by sequencing.

2.3. Cell culture and transfection

ELT-3 cells were maintained in DF8 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS). NIH-3T3 and HeLa cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. CHO, HEK293 and Cos7 cells were cultured in DMEM/HamF12 supplemented with 10% FCS. Cells were placed in serum-free medium overnight before experiments.

For RNA interference experiments, cells were transfected with Lipofectamine RNAiMax according to the manufacturer's instruction in the presence of 100 nM of LPP1 directed siRNA or control siRNA. For transient expression of LPP1, cells were transfected with pEGFP-LPP1 or pEGFP-N1 using Lipofectamine LTX according to the manufacturer's instructions.

2.4. Western blot analysis of phosphorylated ERK_{1/2}

Serum-starved confluent cells seeded in 12 well plates were exposed to the agents tested. Reactions were stopped by aspiration of the incubation medium followed by the addition of 100 µl of cold solubilisation buffer [50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10% (v/v) glycerol, 10 mM Na₄P₂O₇, 200 µM Na₃VO₄, 10 mM EDTA, 1% (v/v) Triton-X100, 10 µg/ml aprotinin and leupeptin and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. Cells were detached by scraping on ice and centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4°C. Detergent-extracted proteins were analyzed by 10% (w/v) SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose sheets and probed with polyclonal anti-active ERK_{1/2} antibodies (1:5,000 v/v) and HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody. Blots were revealed by ECL technique and exposed on X-ray films. The blots were then stripped and re-probed with an anti-ERK_{1/2} antibody and HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody. For quantification, western blots were incubated simultaneously with mouse monoclonal anti active ERK_{1/2} and rabbit polyclonal anti ERK₂. After washing, blots were incubated with a mix of fluorescent secondary antibodies, IRDye800-conjugated anti rabbit IgG and AlexaFluor680-conjugated anti mouse IgG. Blots were then scanned with a Li-Cor Odyssey infrared imaging system and quantification was performed with the Li-Cor Odyssey software.

2.5. Preparation of cell membrane fractions

Cells cultured in 100 mm Petri dishes were washed with 10 ml cold TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) and then scrapped in 5 ml cold TBS. Cells were then recovered by centrifugation at 300 x g for 10 min at 4°C. Cells were washed again by resuspending the pellet in 10 ml cold TBS and cells were recovered by centrifugation at 300 x g. The resulting cell pellet was resuspended in 1 ml containing 10 µg/ml aprotinin and leupeptin and 0.5 mM PMSF. After lysis by sonication with a Vibra-Cell 72412 Fischer Bioblock Scientific (20 s pulse 4s on, and 4s off at 28% of max power) the homogenate was centrifuged at 100.000 x g for 20 min at 4°C and the resulting membrane pellet was resuspended in 500 µl TBS. After protein concentration determination with BCA protein assay, the membrane suspension was diluted to 1 mg/mL and stored at -20°C.

2.6. GTPγ[³⁵S] Binding assay

Cell membranes (30 µg of proteins) were incubated in 1.0 ml of GTP-binding buffer (HEPES 50 nM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.5) containing 25 µg/ml saponin, 10 µM GDP, 0.1 nM GTPγ[³⁵S] (1200 Ci/mmol), and indicated lipid for 30 min at 30°C. Membrane-bound radioactivity was recovered by filtration on GF-C filters. The radioactivity retained on filters was quantified by liquid scintillation counting.

2.7. Phosphatase activity on cell membranes

Cell membranes (1 µg membrane proteins) were incubated at 37°C in TBS in a 96 well plates in the presence of lipid substrates in a final volume of 50 µl. The reaction was stopped by addition of 200 µL Biomol Green reagent and the plate was incubated for 1 h at room temperature. Absorbance at 590 nm was measured and the amount of phosphate was deduced from a standard curve run in parallel.

2.8. Phosphatase activity on intact cells

Serum-starved confluent cells were seeded in 96 well plates. The day of the experiment, cells were gently washed 3 times with 250 µL of TBS containing 0.1 mM Ca²⁺ and reincubated in 50 µL of

the same buffer containing the lipid substrates. The reaction was stopped by addition of 200 μ L Biomol Green reagent directly into the wells and the plate was incubated for 1 h at room temperature. Absorbance at 590 nm was measured and the amount of phosphate was deduced from a standard curve run in parallel. For standardization, 4 wells, seeded in the same conditions, were used for protein-quantification with BCA assay kit.

2.9. Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed on an Applied Biosystems StepOnesPlus. PCR was carried out using the DyNAmo colorFlash SYBR Green kit according to the manufacturer's instructions under the following conditions: 95°C (30 s), 60°C (30 s), and 72°C (30 s) for 40 cycles. Melting curve analyses were performed at the end of the amplification reactions. Primer sequences (Table 1) were designed with the PCR Primers Design Software on Life Technologies Invitrogen web site. The relative amounts of LPP1, 2 and 3 mRNA in each sample were determined using a standardization curve performed in the same PCR run. The standardization curves were obtained by amplification of successive dilutions of plasmids containing the cDNA of the three LPP isoforms. Amplification efficacy deduced from standardization curves were over 90%. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript was used as an internal standard.

2.10 PKC translocation

Serum-starved confluent cells seeded in 6 well plates were exposed to the agents tested for the time indicated. Reactions were stopped by aspiration of the incubation medium followed by the addition of 1 ml of cold buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, 10 μ g/ml aprotinin and leupeptin and 0.5 mM PMSF), then the plates were immediately frozen in liquid nitrogen. After three freeze/thaw cycles, broken cells were scrapped on ice and centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were then centrifuged at 100.000 x g for 20 min at 4°C. The resulting membrane pellets were dissolved in Laemmli sample buffer and analyzed by western blot on 7.5% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose sheets and probed with polyclonal anti-PKC α or anti-PKC ϵ or anti-PDGF β receptor.

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one- or two-way ANOVAs followed by *post hoc* comparisons with the Fisher's least significant difference test. Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. DGPP 8:0 stimulates ERK_{1/2} activation.

In a previous study we demonstrated that LPA stimulated ERK_{1/2} phosphorylation in ELT3 cells through the activation of the LPA1 receptor [18]. The activation of ERK_{1/2} was prevented by Ki16425, an antagonist of LPA1/3 receptors [20]. DGPP 8:0 has also been described as a LPA1/3 receptor antagonist [3, 21] and therefore should have the same inhibitory effect as Ki16425 on ERK_{1/2} activation by LPA. Surprisingly, we found that, in contrast to Ki16425, DGPP 8:0 had no inhibitory effect on LPA stimulation in ELT3 cells but rather increased LPA response (Fig. 1A and B). Moreover, when used alone, DGPP 8:0 strongly stimulated ERK_{1/2} phosphorylation (Fig. 1A and B). This stimulatory effect of DGPP 8:0 was not restricted to ELT3 cells since it was observed in various cell lines such as Cos-7, HeLa and NIH-3T3 cells (Fig. 1C). The intensity of DGPP 8:0 effect in these cell lines seems to be unrelated to that triggered by LPA. The phorbol ester PDBu was considered to give the maximal ERK_{1/2} activation.

3.2. DGPP 8:0 and LPA stimulate ERK_{1/2} activation by different mechanisms.

The mechanisms leading to ERK_{1/2} activation in response to LPA and DGPP 8:0 were compared and the effect of FPP, another pyrophosphate lipid, described as a GPR92/LPA5 agonist, was tested [10]. Kinetic study shows that, in ELT3 cells, LPA as well as DGPP 8:0 activated ERK_{1/2} in a transient manner, while FPP had no effect (Fig. 2A). The maximal stimulation did not occur at the same time point for DGPP 8:0 and LPA. Indeed, for LPA, the maximal stimulation was observed at 3-5 min whereas for DGPP 8:0 the maximal response occurred at 6-8 min (Fig. 2A). This may indicate that DGPP 8:0 and LPA act through different mechanisms. However, DGPP 8:0 activated ERK_{1/2} through the classical pathway involving the protein kinases Raf and MEK since its effect was prevented by Raf and MEK (U0126) inhibitors (Fig. 2B). Furthermore, the DGPP 8:0 effect was inhibited by the PKC inhibitor Ro31-8220 but was resistant to Pertussis toxin (PTX) treatment (Fig. 2 C and D). At the opposite LPA response was resistant to Ro31-8220 treatment but fully inhibited by PTX (Fig. 2C and D). These results clearly show that DGPP 8:0 stimulates ERK_{1/2} through a mechanism different from that triggered by LPA. This mechanism is independent from PTX sensitive G proteins but involved PKC.

DGPP 8:0 has been described as a LPA1/3 receptor antagonist and thus it is a ligand for these LPA receptors. Possibly DGPP 8:0 could bind to other LPA receptors or even other GPCR on which it could behave as an agonist. To test this hypothesis, the effect of two other LPA receptor antagonists, Ki16425 and VPC32183 [22], on the stimulatory effect of DGPP 8:0 was determined. The results presented in figure 2E show that the activation of ERK_{1/2} by DGPP 8:0 was not affected by Ki16425 which fully inhibited LPA response. Conversely, DGPP 8:0 effect was inhibited by VPC32183 which, at the dose used, had no effect on the LPA response. This result may suggest that DGPP 8:0 is able to activate a receptor that is sensitive to VPC32183 but insensitive to Ki16425. To test whether DGPP 8:0 is able to activate a receptor of the GPCR family, its effect on G protein activation was tested. This was achieved by measuring the binding of radiolabeled GTPγS on cell membranes. The results in figure 3A show that LPA increased GTPγ[³⁵S] binding on ELT3 cell membranes in a dose dependent manner. In contrast, DGPP 8:0 had no detectable effect on GTPγ[³⁵S] binding, strongly suggesting that DGPP 8:0 is not able to activate a receptor of the GPCR family. However, even if DGPP failed to inhibit LPA-induced ERK_{1/2} activation, it was able to reduce the LPA effect on GTPγ[³⁵S] binding (Fig. 3B) confirming that DGPP 8:0 acts as an LPA antagonist on the LPA1 receptor.

3.3. ELT3 cells dephosphorylate DGPP 8:0 through LPP activity.

DGPP 8:0 has pyrophosphate group on 3' position of glycerol, and can be dephosphorylated to form sequentially PA 8:0 and DAG 8:0 by lipid phosphatase activities. The effect of PA 8:0 and DAG 8:0 on ERK_{1/2} activation was thus tested. As shown in figure 4A, PA 8:0 was able to stimulate ERK_{1/2} with almost similar intensity than DGPP 8:0 and at comparable doses. In contrast, DAG 8:0 was less efficient than DGPP 8:0 at identical concentrations. These results suggest that DGPP 8:0 could act via the generation of PA 8:0. The possibility that DGPP 8:0 can be dephosphorylated by ELT3 cells or by ELT3 cells membrane was thus tested. As shown in figure 4B, incubation of DGPP 8:0 in the presence of ELT3 cells led to the production of inorganic phosphate (Pi). In the conditions used the reaction was linear along the 15 min of the experiment. The amount of Pi produced in these conditions correspond to less than 15 % of the maximal amount of Pi that can be produced from initial amount of DGPP introduced in the assay. In the absence of DGPP 8:0, cells did not produce Pi. It was also verified that DGPP 8:0 alone did not spontaneously hydrolyze to form Pi over the 15 min reaction (data not shown). These results indicate that DGPP 8:0 is hydrolyzed by cells to form Pi. Comparable results were obtained when the experiment was performed on cell membranes instead of intact cells (Fig. 4C). However the activity measured in cell membranes was about tenfold higher than in intact cells (0.148 ± 0.033 vs 0.015 ± 0.004 nmol/min/μg) possibly indicating that only a small proportion of

the DGPP 8:0 phosphatase activity is present at the cell surface. As shown in figure 4D, this phosphatase activity is not inhibited by N-ethylmaleimide (NEM) and is not dependent on Mg^{2+} ions since the experiment was performed in the absence of Mg^{2+} . Moreover, EDTA did not alter the DGPP 8:0 phosphatase activity. These results indicate that DGPP 8:0 is dephosphorylated by enzymes belonging to the PAP2/LPP family located in cell membranes.

3.4. VPC32183 inhibits DGPP 8:0 dephosphorylation and ERK_{1/2} activation in a competitive manner.

As previously observed in this study the effect of DGPP 8:0 on ERK_{1/2} activation was inhibited by VPC32183. This molecule being a phosphorylated lipid derivative, we postulated that it could interfere with LPP-catalyzed reaction and inhibit DGPP 8:0 dephosphorylation. Since LPP can hydrolyze several phosphorylated lipids, the effect of VPC32183 was tested on the dephosphorylation reaction using DGPP 8:0, PA 8:0 and LPA as substrates. The results in figure 5A, show that VPC dose-dependently inhibited the hydrolysis of DGPP 8:0 and PA 8:0 but had only a weak effect on LPA dephosphorylation. Furthermore, DGPP 8:0 hydrolysis was more sensitive to VPC32183 inhibition. Moreover, when VPC32183 alone was incubated in the presence of membrane, no significant phosphate production was observed ($4 \pm 2 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ for VPC32183 vs. $75 \pm 7 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ for DGPP 8:0) indicating that VPC32183 is not a substrate for LPP activity and can reasonably be considered as an inhibitor. Lineweaver and Burk plot (Figure 5B) clearly show that VPC32183 behaves as a competitive inhibitor towards DGPP 8:0 hydrolysis. Consistent with the competitive inhibition of DGPP dephosphorylation, the results of the figure 6 show that VPC32183 inhibition of DGPP-induced ERK_{1/2} activation can be overcome by increasing DGPP concentration. Indeed, the addition of VPC32183 shifted the DGPP 8:0 dose-response curve towards high concentrations but the maximal effect remained unchanged (Fig. 6B).

3.5. DGPP 8:0 needs to be dephosphorylated into PA 8:0 to stimulate ERK_{1/2} activation.

Taking into account that VPC32183 inhibited DGPP 8:0 induced ERK_{1/2} activation and DGPP 8:0 dephosphorylation, it could be postulated that PA 8:0, the dephosphorylation product of DGPP 8:0 was responsible for the activation of ERK_{1/2}. If so, PA 8:0 effect on ERK_{1/2} activation should be resistant to VPC32183 treatment. The results presented in figure 7 show that while VPC32183 almost fully blocked DGPP 8:0 stimulation of ERK_{1/2}, it had no effect on PA 8:0 response. These results indicate that PA 8:0 is responsible for the effect of DGPP 8:0 on ERK_{1/2} activation.

3.6. DGPP 8:0 and PA 8:0 activation of ERK_{1/2} involve PKC.

PA has been reported to interact with many signaling proteins [23], some of which are involved in ERK_{1/2} activation pathways [24]. Among these proteins, PKC family members are good candidate because it was observed that DGPP response was sensitive to the PKC inhibitor Ro31-8220 (Fig. 2C). The results presented in figure 8A, show that PA 8:0-induced ERK_{1/2} activation is also inhibited by Ro31-8220. One main feature of conventional and novel PKC is to translocate to the membranes when there are activated. Thus, the ability of PA and DGPP to induce the translocation of PKC has been tested. As shown in figure 8B, DGPP 8:0 and PA 8:0 were able to promote PKC α and PKC ϵ translocation to cell membranes. PKC translocation induced by PA appears to be more rapid than the translocation induced by DGPP. This delay observed with DGPP is consistent with the hypothesis that DGPP acts through PA, its dephosphorylation product.

3.7. LPP1 dephosphorylate DGPP 8:0 and is inhibited by VPC32183.

As observed above, the phosphatase activity that dephosphorylates DGPP 8:0 was not sensitive to NEM and independent of Mg²⁺ ions, two typical properties of LPP enzymes. Quantitative analysis of LPP isoform expression was performed by real-time RT-PCR. The results presented in figure 9A show that in ELT3 cells the LPP1 isoform is the most predominantly expressed. LPP2 and LPP3 are almost undetectable in these cells. To confirm the involvement of LPP1 in DGPP dephosphorylation, LPP1 was cloned from ELT3 cells and expressed in HEK293 cells. As observed in figure 9B, LPP1-transfected cells exhibit a higher DGPP 8:0 phosphatase activity demonstrating that LPP1 is able to dephosphorylate DGPP 8:0. Moreover, this increased activity is fully abolished by VPC32183 indicating that LPP1 is a target of VPC32183 inhibitory action. These results show that in ELT3 cells, DGPP is dephosphorylated by LPP1 in a VPC32183-sensitive manner. They also strongly suggest that LPP1 is the LPP isoform involved in DGPP 8:0 effects in ELT3 cells.

3.8. DGPP 8:0-dependent ERK_{1/2} activation involves LPP1.

To confirm the involvement of LPP1 in DGPP-induced ERK_{1/2} activation RNA interference experiments targeting LPP1 were conducted. The results presented in figure 10A show that transfection of ELT3 cells with LPP1-directed siRNA strongly reduced the amount of LPP1 transcripts. This was accompanied by a reduction of the phosphatase activity towards DGPP 8:0 but also towards

PA 8:0 (Fig. 10B) measured in intact cells. This confirmed the involvement of LPP1 in DGPP 8:0 dephosphorylation at the cell surface. The effect of LPP1 down-regulation by siRNA was then tested on the DGPP 8:0-dependent activation of ERK_{1/2}. The results (fig 10C and D) clearly show that transfection of ELT3 cells with LPP1-directed siRNA resulted in a reduction of the DGPP 8:0 effect on ERK_{1/2}, thus confirming that DGPP 8:0 has to be dephosphorylated to induce ERK_{1/2} activation. Consistently with the hypothesis that PA 8:0 is responsible for the DGPP 8:0 effect, PA 8:0 response was not affected by LPP1-directed siRNA treatment. PDBu response, which is not supposed to involve LPP1 activity, was, as expected, not altered by LPP1-directed siRNA. Altogether, these results demonstrate that LPP1 is able to dephosphorylate DGPP 8:0 into PA 8:0, which in turn induces the activation of ERK_{1/2}.

4. Discussion

Since DGPP 8:0 has been described as an antagonist for LPA receptors it has been successfully used in several cell models to inhibit LPA effects. In ELT3 cells where the LPA effects are exclusively mediated by the LPA1 receptor [18], DGPP 8:0 failed to antagonize the stimulatory effects of LPA on ERK_{1/2} activation but also on DNA synthesis (data not shown). However, several studies indicate that DGPP 8:0 is able to inhibit LPA1 receptor mediated effects such as proliferation of NIH-3T3 fibroblasts [3], migration of synoviocytes [25], transcellular resistance changes in endothelial cells [26] or survival of chronic myeloid leukemia lymphocytes [27]. Although DGPP did not affect ERK_{1/2} activation by LPA in ELT3 cells, it was able to inhibit the activation of G proteins by LPA in ELT3 membranes. Therefore, the antagonistic effect of DGPP on LPA1 receptor is hidden by its ability to stimulate ERK_{1/2} independently of LPA receptor. It has been demonstrated that PAP2 enzymes, now called LPP, can dephosphorylate DGPP into PA and PA into DAG [13]. Moreover, two recently described lipid phosphatases, DPPL1 and DPPL2, have been shown to dephosphorylate DGPP [14]. Finally, DGPP 8:0, as virtually all phospholipids, could be hydrolyzed by phospholipase A1 or A2. In the present study we show that DGPP 8:0 is dephosphorylated by membrane associated phosphatases presenting the characteristics of PAP2 enzymes, insensitivity to NEM and independence from Mg²⁺ ions. These features, exclude a possible involvement of DPPL family enzymes which are NEM sensitive enzymes, in the dephosphorylation of DGPP 8:0 in ELT3 cells. The finding that DGPP 8:0 is rapidly degraded by LPP raised the question about the persistence of its antagonistic effect. However, PA and DG, the dephosphorylation products of DGPP have been shown to also antagonize LPA-induced calcium mobilization on LPA1 expressing cells [3]. Consistent results

were also obtained on LPA-induced G proteins activation in ELT3 cell membranes (see supplementary data fig. S1).

In the present study we observed that DGPP 8:0 had no antagonistic effect towards the stimulation of ERK_{1/2} MAP kinases stimulated by LPA but surprisingly DGPP 8:0 was found to stimulate these MAP kinases. This observation was already reported by Balboa et al [2] who described a DGPP 8:0-induced ERK_{1/2} activation in a mouse macrophage cell line. Here, we observed a similar effect in ELT3 cells and in various cell lines such as Hela, NIH-3T3 and Cos7 cell lines. This is why we investigated the mechanism by which DGPP could activate ERK_{1/2}. Since DGPP was described as a LPA receptor ligand, and that FPP, another pyrophosphorylated lipid, was also described as a LPA receptor agonist, we postulated that DGPP might have an agonistic effect on a LPA receptor. But, as described in this study, DGPP effect, contrary to LPA effect, was insensitive to Ki16425 and PTX treatment and it did not increase the binding of GTPγS to cell membranes. These results, confirmed that DGPP is not able to activate ERK_{1/2} by a LPA receptor. Balboa et al [2] had shown that the DGPP activating effect was sensitive to suramin, a polyamine supposed to block receptor-ligand interactions. We also observed, in ELT3 cells, an inhibition by the suramin of ERK_{1/2} activation by DGPP 8:0 (data not shown). However, this effect seemed to be nonspecific since the activation of ERK_{1/2} by phorbol esters, which is fully independent from GPCR activation, was also inhibited by suramin (data not shown). In conclusion, it seems unlikely that DGPP act like a GPCR agonist.

In this study, we showed that DGPP can be dephosphorylated by a NEM insensitive and a Mg²⁺ independent phosphatase activity which is typical of PAP2 enzymes. Other phosphatases, DPPL1 and DPPL2, which transcripts can be detected by RT-PCR in ELT3 cells (data not shown), have been described as DGPP specific phosphatases. We eliminated their involvement as their activity is sensitive to NEM [14]. Finally we identified the PAP2 enzyme dephosphorylating DGPP 8:0 as LPP1. Indeed LPP1 was found to be the main isoform expressed in ELT3 cells as demonstrated by quantitative PCR experiments. Moreover, heterologous expression of LPP1 cloned from ELT3 cells increased DGPP hydrolysis in HEK293 cells. Finally, inhibition of LPP1 synthesis by specific siRNA treatment led to a 50% inhibition of DGPP 8:0 phosphatase activity and a reduction of DGPP 8:0-induced ERK_{1/2} activation. By contrast treatment with LPP1 directed siRNA did not modified PA 8:0-induced ERK_{1/2} activation. These results strongly suggested that DGPP 8:0 needed to be dephosphorylated by LPP1 to exert its stimulatory effect on ERK_{1/2} and that PA 8:0 was responsible for the effect of DGPP 8:0. It was also found that DGPP 8:0 stimulate ERK_{1/2} phosphorylation in various cell lines which possibly express other LPP isoforms thus raising the question of the selectivity of each isoform towards DGPP. However, all the cell lines tested in the present study were found to express LPP1 (see supplemental data fig. S2). If LPP1 is co-expressed with another isoform in one

given cell line, the impact of the second isoform on DGPP dephosphorylation cannot be determined due to the presence of LPP1.

PA has been shown to be able to activate ERK_{1/2} pathway by several converging ways [28]. In this context, we already showed that phospholipase D, which produces intracellular PA, was involved in the activation of ERK_{1/2} in ELT3 cells [29]. PA can induce ERK_{1/2} activation by interacting directly with the Serine-threonine kinase Raf 1 [30, 31]. Otherwise, it has been reported that PA is able to recruit the guanine nucleotide exchange factors SOS (by its PH-domain) to the membrane and activate Ras, the main activator of ERK_{1/2} module [32]. Recently, PA was also shown to interact with the scaffolding protein KSR which interacts with the members of the ERK_{1/2} modules [33]. Finally, PA has been demonstrated to interact and activate PKC α , ϵ , and ζ [34]. PKC is a well established signaling intermediate involved in the activation of ERK_{1/2} module by GPCR that acts by phosphorylating Raf, MEK or RKIP [24]. The results of the present study are compatible with such a PA effect since it was found that DGPP 8:0 effect was inhibited by PKC, Raf and MEK inhibitors. PA as DGPP were also found to induce the translocation of PKC α and ϵ isoforms confirming the involvement of PKC in PA and DGPP responses. These data are also consistent with those obtained by Balboa et al [2] who observed a translocation of PKC α , ϵ and δ isoforms at the cell membranes in response to DGPP 8:0 treatment in macrophages. The results presented here also show that PA 8:0, as DGPP 8:0, can be dephosphorylated by LPP1 in ELT3 cells. PA dephosphorylation leads to the generation of DAG, which is the physiological activator for conventional and novel PKC isoforms which are, as stated above, able to activate ERK_{1/2} cascade [24]. The stimulation of ERK_{1/2} by the phorbol ester PDBu in ELT3 cells confirmed that DAG-sensitive PKC can activate ERK_{1/2} module, however, as LPP1 down-regulation did not affect PA-induced activation of ERK_{1/2}, it can be concluded that PA 8:0 hydrolysis into DAG 8:0 did not significantly participate to this process. The mechanism by which exogenous PA 8:0 may enter into the cells or reach the inner leaflet of the plasma membrane remains unclear and has not been elucidated yet. However, exogenous PA has been reported to activate intracellular enzymes and to induce the translocation of various proteins to the plasma membrane. Indeed, it has been shown that the kinase mTOR interacted with PA 8:0 but not with DG 8:0 in vitro and activated its kinase activity in HEK293 cells [35-37]. More recently, Xu et al. [36] showed that non-hydrolysable phosphonate analogues of PA were also able to induce the translocation of mTOR to the plasma membrane. Another example of PA direct effect on intracellular signaling protein was provided by Zhao et al. [32] who reported that PA interacted with the PH-domain of SOS in vitro and induced its translocation to the plasma membrane of HEK293 cells. This

was shown to occur through the interaction of two basic residues of PH-domain and the negative charges of PA. This interaction was specific for PA as other acidic phospholipids were not able to bind this domain excluding the possibility that DG, which is an uncharged molecule, interacted with this site [32]. Altogether, these data indicate that exogenously added PA 8:0 can exert cellular effects by directly interacting with intracellular target proteins without being converted to DG.

In this study we identified VPC32183, first described as an LPA1 and LPA3 receptor antagonist [22], as an inhibitor of the DGPP 8:0 dephosphorylation reaction. Previously, the PA analogue compound, XY-14, was described to be a competitive inhibitor of LPP1 [38], however, when tested in ELT3 cells or membranes it failed to inhibit DGPP 8:0 dephosphorylation (data not shown). By contrast, we were able to show that VPC32183 behaved as a competitive inhibitor of the DGPP 8:0 dephosphorylation reaction. Despite VPC32183 is a hydrophobic molecule possessing a virtually hydrolysable phosphate headgroup [22], we did not observe Pi formation when it was incubated in the presence of cells or cell membranes. This indicated that VPC32183 really acted as a competitive inhibitor and not as a competitive substrate. By the mean of RNA interference experiments we showed that dephosphorylation of DGPP 8:0 is mainly catalyzed by LPP1 in ELT3 cells and this strongly suggested that VPC32183 is an inhibitor for LPP1. This inhibitory effect of VPC32183 on LPP1 was finally demonstrated as it was able to inhibit DGPP dephosphorylation by HEK293 cells expressing LPP1. The potential inhibitory effect of VPC32183 on the other LPP isoforms remains to be established.

In conclusion, in different cell types, DGPP 8:0 acted as stimulator of ERK_{1/2} pathway rather than as a LPA receptor antagonist. This stimulatory effect is dependent on the ability of each given cell type to hydrolyze DGPP 8:0 into PA 8:0. In ELT3 cells, DGPP is hydrolyzed by LPP1 which is generally considered as a negative regulator of phospholipid mediator-dependent pathways and cellular responses. Indeed, overexpression of LPP1 in fibroblasts led to a reduction of LPA or PDGF induced ERK_{1/2} activation and cell migration [39, 40]. LPP1 overexpression in HEK293 cells also reduced the mitogenic potency of LPA [41]. Furthermore, LPP1 has been shown to negatively regulate preadipocyte differentiation by decreasing extracellular concentration of LPA [42]. The negative regulation of LPA signaling by LPP1 appears to be not simply due to the ectoactivity of the enzyme which hydrolyzes extracellular LPA, but also due to intracellular modulation of intracellular phospholipid levels [39-41]. In the present study we demonstrated that LPP1 may also be considered as a positive regulator of signaling processes, in particular of the ERK_{1/2} pathways.

Finally, VPC32183 behaves as a LPP1 inhibitor and its potential inhibitory effect on the other LPP isoforms and other lipid phosphatases remains to be established. VPC32183 may serve as a basis for the development of new, more efficient and isoform-selective LPP inhibitors.

5. References

- [1] T. Munnik, T. de Vrije, R.F. Irvine, A. Musgrave, Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants, *J Biol Chem*, 271 (1996) 15708-15715.
- [2] M.A. Balboa, J. Balsinde, D.A. Dillon, G.M. Carman, E.A. Dennis, Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate, *J Biol Chem*, 274 (1999) 522-526.
- [3] D.J. Fischer, N. Nusser, T. Virag, K. Yokoyama, D. Wang, D.L. Baker, D. Bautista, A.L. Parrill, G. Tigyi, Short-chain phosphatidates are subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors, *Mol Pharmacol*, 60 (2001) 776-784.
- [4] G. Tigyi, Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets, *Br J Pharmacol*, 161 (2010) 241-270.
- [5] K. Kotarsky, A. Boketoft, J. Bristulf, N.E. Nilsson, A. Norberg, S. Hansson, C. Owman, R. Sillard, L.M. Leeb-Lundberg, B. Olde, Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes, *J Pharmacol Exp Ther*, 318 (2006) 619-628.
- [6] M. Murakami, A. Shiraishi, K. Tabata, N. Fujita, Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 371 (2008) 707-712.
- [7] K. Tabata, K. Baba, A. Shiraishi, M. Ito, N. Fujita, The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 363 (2007) 861-866.
- [8] T.M. McIntyre, A.V. Pontsler, A.R. Silva, A. St Hilaire, Y. Xu, J.C. Hinshaw, G.A. Zimmerman, K. Hama, J. Aoki, H. Arai, G.D. Prestwich, Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 131-136.
- [9] T. Goto, H. Nagai, K. Egawa, Y.I. Kim, S. Kato, A. Taimatsu, T. Sakamoto, S. Ebisu, T. Hohsaka, H. Miyagawa, S. Murakami, N. Takahashi, T. Kawada, Farnesyl pyrophosphate regulates adipocyte functions as an endogenous PPARgamma agonist, *Biochem J*, 438 (2011) 111-119.
- [10] D.Y. Oh, J.M. Yoon, M.J. Moon, J.I. Hwang, H. Choe, J.Y. Lee, J.I. Kim, S. Kim, H. Rhim, D.K. O'Dell, J.M. Walker, H.S. Na, M.G. Lee, H.B. Kwon, K. Kim, J.Y. Seong, Identification of farnesyl pyrophosphate and N-arachidonylglycine as endogenous ligands for GPR92, *J Biol Chem*, 283 (2008) 21054-21064.
- [11] B. van Schooten, C. Testerink, T. Munnik, Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite, *Biochim Biophys Acta*, 1761 (2006) 151-159.
- [12] D.N. Brindley, D.W. Waggoner, Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases, *J Biol Chem*, 273 (1998) 24281-24284.

- [13] D.A. Dillon, X. Chen, G.M. Zeimet, W.I. Wu, D.W. Waggoner, J. Dewald, D.N. Brindley, G.M. Carman, Mammalian Mg²⁺-independent phosphatidate phosphatase (PAP2) displays diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity, *J Biol Chem*, 272 (1997) 10361-10366.
- [14] M. Takeuchi, M. Harigai, S. Momohara, E. Ball, J. Abe, K. Furuichi, N. Kamatani, Cloning and characterization of DPPL1 and DPPL2, representatives of a novel type of mammalian phosphatidate phosphatase, *Gene*, 399 (2007) 174-180.
- [15] C. Ogawa, A. Kihara, M. Gokoh, Y. Igarashi, Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2, *J Biol Chem*, 278 (2003) 1268-1272.
- [16] S.M. Mandala, R. Thornton, I. Galve-Roperh, S. Poulton, C. Peterson, A. Olivera, J. Bergstrom, M.B. Kurtz, S. Spiegel, Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 7859-7864.
- [17] H. Le Stunff, C. Peterson, R. Thornton, S. Milstien, S.M. Mandala, S. Spiegel, Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, *J Biol Chem*, 277 (2002) 8920-8927.
- [18] E. Billon-Denis, Z. Tanfin, P. Robin, Role of lysophosphatidic acid in the regulation of uterine leiomyoma cell proliferation by phospholipase D and autotaxin, *J Lipid Res*, 49 (2008) 295-307.
- [19] M.N. Raymond, C. Bole-Feysot, Y. Banno, Z. Tanfin, P. Robin, Endothelin-1 inhibits apoptosis through a sphingosine kinase 1-dependent mechanism in uterine leiomyoma ELT3 cells, *Endocrinology*, 147 (2006) 5873-5882.
- [20] H. Ohta, K. Sato, N. Murata, A. Damirin, E. Malchinkhuu, J. Kon, T. Kimura, M. Tobo, Y. Yamazaki, T. Watanabe, M. Yagi, M. Sato, R. Suzuki, H. Murooka, T. Sakai, T. Nishitoba, D.S. Im, H. Nochi, K. Tamoto, H. Tomura, F. Okajima, Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors, *Mol Pharmacol*, 64 (2003) 994-1005.
- [21] V.M. Sardar, D.L. Bautista, D.J. Fischer, K. Yokoyama, N. Nusser, T. Virag, D.A. Wang, D.L. Baker, G. Tigy, A.L. Parrill, Molecular basis for lysophosphatidic acid receptor antagonist selectivity, *Biochim Biophys Acta*, 1582 (2002) 309-317.
- [22] B.H. Heasley, R. Jarosz, K.R. Lynch, T.L. Macdonald, Initial structure-activity relationships of lysophosphatidic acid receptor antagonists: discovery of a high-affinity LPA1/LPA3 receptor antagonist, *Bioorg Med Chem Lett*, 14 (2004) 2735-2740.
- [23] C.L. Stace, N.T. Ktistakis, Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1761 (2006) 913-926.
- [24] E. Rozengurt, Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors, *J Cell Physiol*, 213 (2007) 589-602.
- [25] C. Zhao, M.J. Fernandes, G.D. Prestwich, M. Turgeon, J. Di Battista, T. Clair, P.E. Poubelle, S.G. Bourgoin, Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis?, *Mol Pharmacol*, 73 (2008) 587-600.

- [26] F. Yin, M.A. Watsky, LPA and S1P increase corneal epithelial and endothelial cell transcellular resistance, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (2005) 1927-1933.
- [27] X. Hu, N. Haney, D. Kropp, A.F. Kabore, J.B. Johnston, S.B. Gibson, Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB, *J Biol Chem*, 280 (2005) 9498-9508.
- [28] B.T. Andresen, M.A. Rizzo, K. Shome, G. Romero, The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade, *FEBS Lett*, 531 (2002) 65-68.
- [29] P. Robin, S. Chouayekh, C. Bole-Feysot, D. Leiber, Z. Tanfin, Contribution of phospholipase D in endothelin-1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and proliferation in rat uterine leiomyoma cells, *Biol Reprod*, 72 (2005) 69-77.
- [30] S. Ghosh, J.C. Strum, V.A. Sciorra, L. Daniel, R.M. Bell, Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells, *J Biol Chem*, 271 (1996) 8472-8480.
- [31] M.A. Rizzo, K. Shome, C. Vasudevan, D.B. Stolz, T.C. Sung, M.A. Frohman, S.C. Watkins, G. Romero, Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway, *J Biol Chem*, 274 (1999) 1131-1139.
- [32] C. Zhao, G. Du, K. Skowronek, M.A. Frohman, D. Bar-Sagi, Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos, *Nat Cell Biol*, 9 (2007) 706-712.
- [33] C.A. Kraft, J.L. Garrido, E. Fluharty, L. Leiva-Vega, G. Romero, Role of phosphatidic acid in the coupling of the ERK cascade, *J Biol Chem*, 283 (2008) 36636-36645.
- [34] C. Limatola, D. Schaap, W.H. Moolenaar, W.J. van Blitterswijk, Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids, *Biochem J*, 304 (Pt 3) (1994) 1001-1008.
- [35] Y. Fang, M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan, J. Chen, Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling, *Science*, 294 (2001) 1942-1945.
- [36] Y. Xu, Y. Fang, J. Chen, G.D. Prestwich, Activation of mTOR signaling by novel fluoromethylene phosphonate analogues of phosphatidic acid, *Bioorg Med Chem Lett*, 14 (2004) 1461-1464.
- [37] M.S. Yoon, Y. Sun, E. Arauz, Y. Jiang, J. Chen, Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect, *J Biol Chem*, 286 (2011) 29568-29574.
- [38] S.S. Smyth, V.A. Sciorra, Y.J. Sigal, Z. Pamuklar, Z. Wang, Y. Xu, G.D. Prestwich, A.J. Morris, Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity, *J Biol Chem*, 278 (2003) 43214-43223.

- [39] J.S. Long, K. Yokoyama, G. Tigyi, N.J. Pyne, S. Pyne, Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidic acid- and platelet-derived-growth-factor-induced cell migration, *Biochem J*, 394 (2006) 495-500.
- [40] C. Pilquil, J. Dewald, A. Cherney, I. Gorshkova, G. Tigyi, D. English, V. Natarajan, D.N. Brindley, Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidate-induced fibroblast migration by controlling phospholipase D2-dependent phosphatidate generation, *J Biol Chem*, 281 (2006) 38418-38429.
- [41] S.B. Hooks, W.L. Santos, D.S. Im, C.E. Heise, T.L. Macdonald, K.R. Lynch, Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent, *J Biol Chem*, 276 (2001) 4611-4621.
- [42] M.F. Simon, A. Rey, I. Castan-Laurel, S. Gres, D. Sibrac, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production, *J Biol Chem*, 277 (2002) 23131-23136.

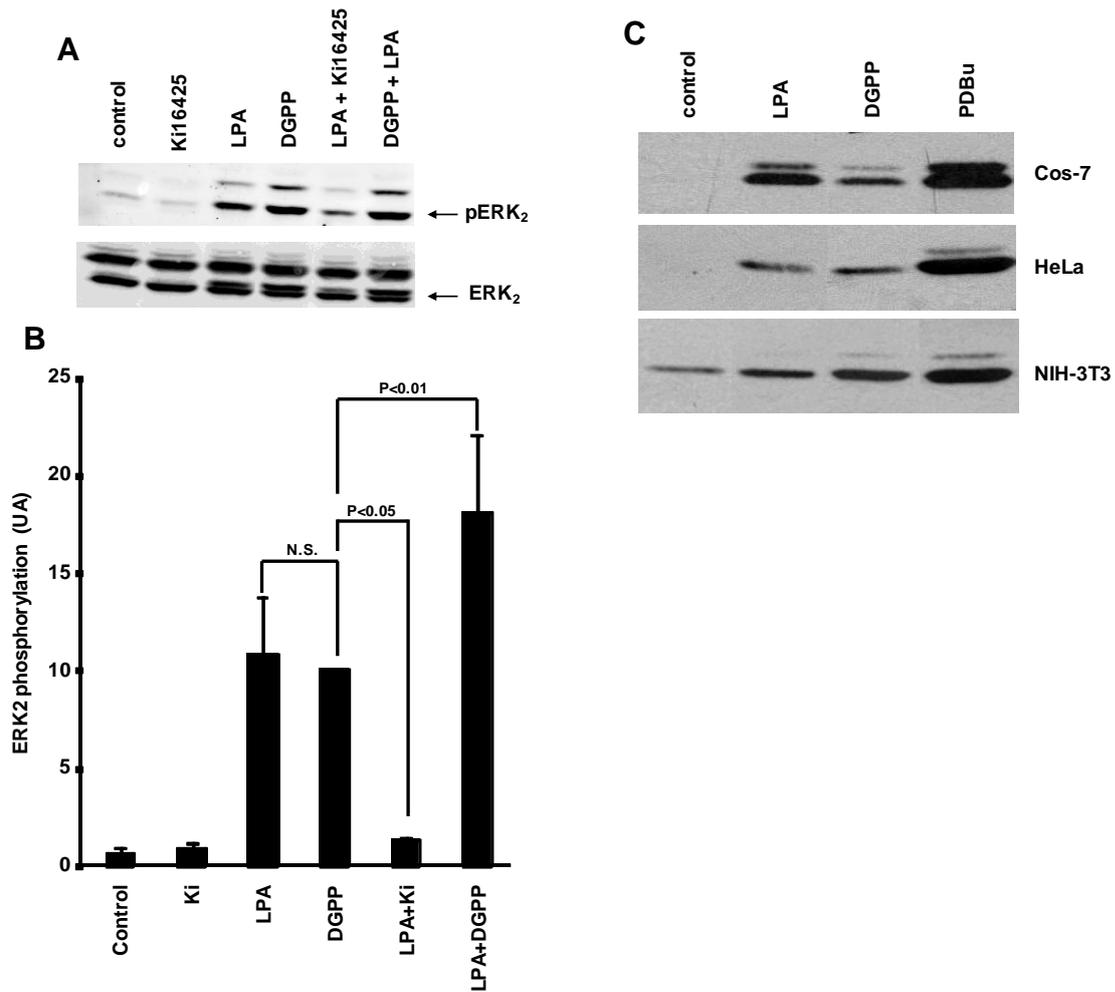


Fig. 1. Effect of LPA and DGPP on ERK1/2 MAP Kinase activation. (A) Serum-starved ELT3 cells were incubated at 37°C for 3 min with 10 μ M LPA or for 5 min with 10 μ M DGPP. When DGPP and LPA were used together, DGPP was added 5 min before LPA. When used, Ki16425 (10 μ M) was added 20 min before LPA. The blot shows a typical result among three. (B) Quantification of ERK2 phosphorylation with the Li-Cor Odyssey software of experiments performed as in (A). Values were normalized to the amount of total ERK in each lane. Results are means \pm SEM of three independent experiments. (C) Cos-7, HeLa and NIH-3T3 cells were incubated at 37°C for 3 min with 10 μ M LPA or for 5 min with 10 μ M DGPP or 1 μ M PDBu. (A and B) Cells were lysed and detergent-extracted proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody. Results are representative of three independent experiments. N.S., $P > 0.05$.

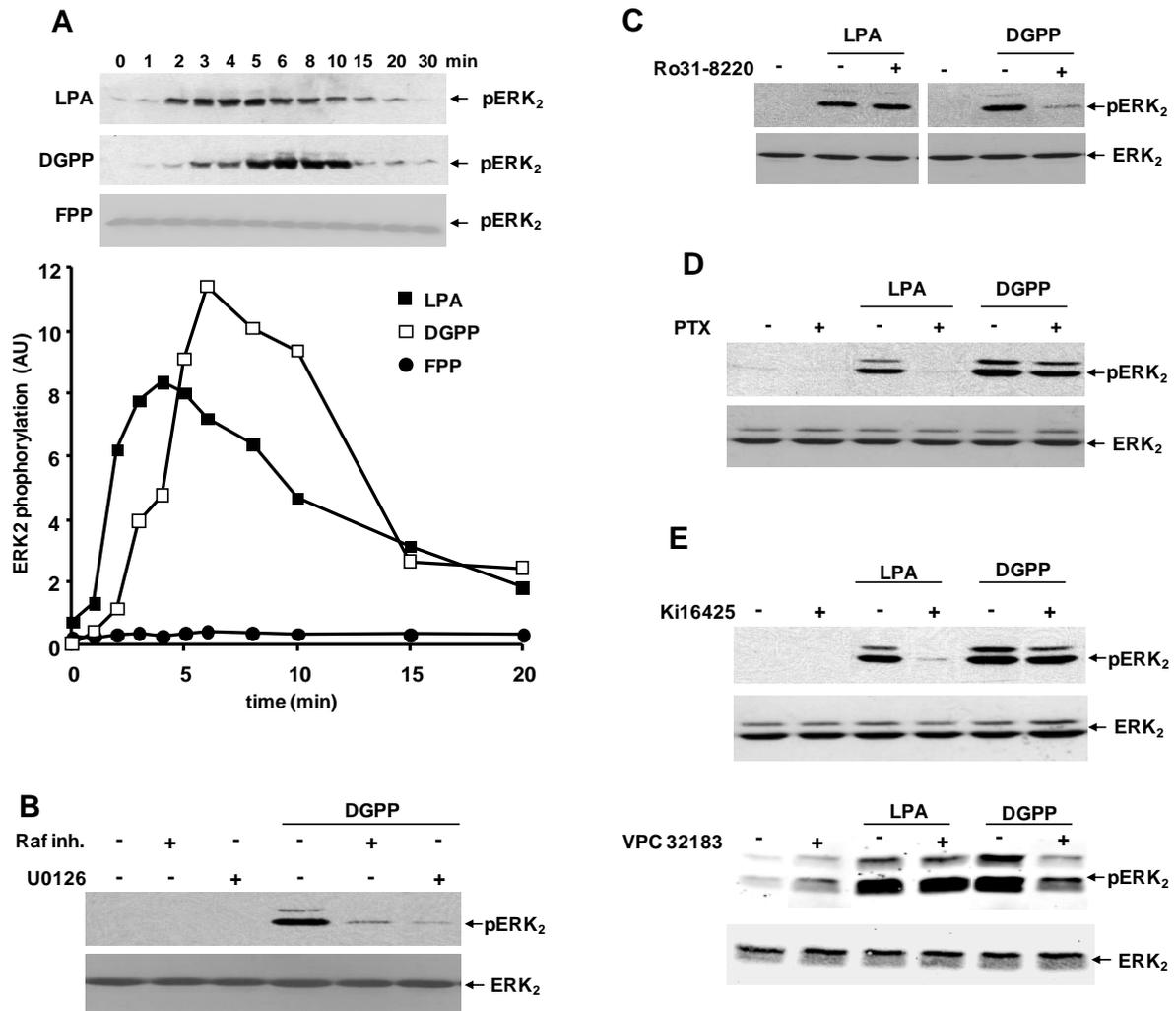


Fig. 2. ERK1/2-activation by LPA and DGPP occurred by different pathway. (A) Serum-starved ELT3 cells were incubated at 37°C for the indicated times with 10 μ M LPA, 10 μ M DGPP or 10 μ M FPP. The graph represents the quantification of the western blots shown. (B) Serum-starved ELT3 cells were incubated at 37°C for 5 min with or without 10 μ M DGPP in the presence or absence of 10 μ M U0126 or 10 μ M Raf inhibitor. (C) Serum-starved ELT3 cells were incubated at 37°C for 3 min with LPA or for 5 min with DGPP in the presence or absence of 5 μ M Ro31-8220. (D) ELT3 cells were pretreated for 14 h in the presence or absence of 100 ng/ml PTX before stimulation for 3 min with 10 μ M LPA or for 5 min with 10 μ M DGPP. (E) Serum-starved ELT3 cells were incubated at 37°C for 3 min with 10 μ M LPA or for 5 min with 10 μ M DGPP in the presence or absence of 10 μ M Ki16425 or 10 μ M VPC 32183. (B, C and E) All inhibitors and antagonists were preincubated for 20 min before stimulation. (A-E) Cells were lysed and detergent-extracted proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody and with anti-total ERK1/2 antibody. Results are representative of three independent experiments.

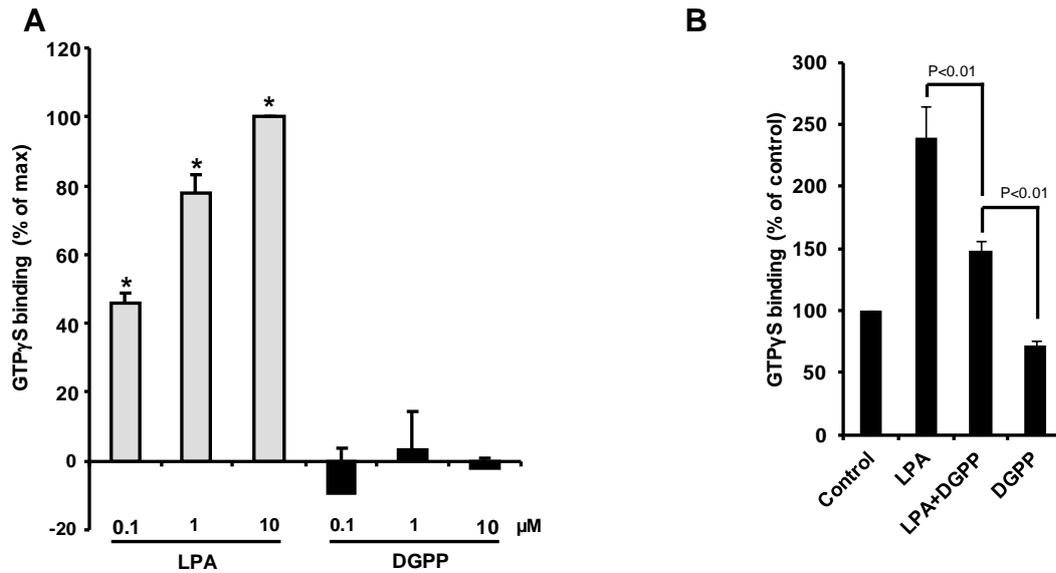


Fig. 3. DGPP effect on GTP γ S binding to ELT3 cell membranes. (A) Cell membranes (25 μ g proteins) were incubated at 30°C for 30 min with GTP γ [35S] in presence of indicated concentrations of LPA or DGPP. GTP γ [35S] binding was measured as described in Materials and Methods section. The values are expressed as percent of the maximal binding measured in the presence of 10 μ M of LPA. Values are means \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$ vs. basal value (basal value = 3600 ± 840 cpm and maximal value = 12100 ± 700 cpm). (B) GTP γ [35S] binding was measured as in (A) in the presence of 0.5 μ M LPA and 20 μ M DGPP. The values are expressed as percent of the basal value (basal value = 3712 ± 912 cpm and maximal value = 8270 ± 1600 cpm). Values are means \pm SEM of four experiments.

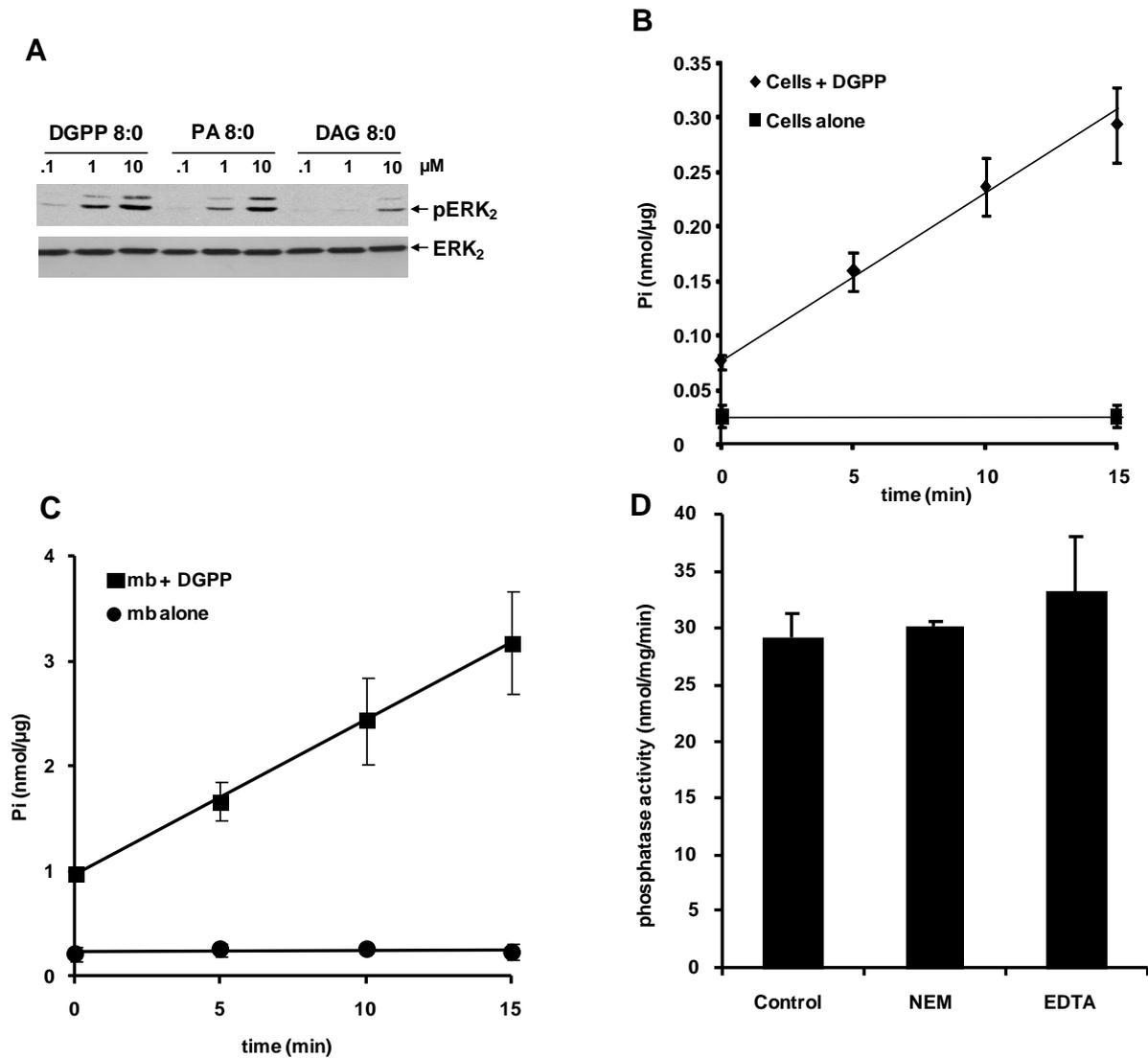


Fig. 4. DGPP dephosphorylation by ELT3 cells. (A) Serum-starved ELT3 cells were treated for 5 min with DGPP 8:0, PA 8:0 and DAG 8:0 at the indicated concentrations. Cells were lysed and detergent-extracted protein were analyzed by 10% SDS-PAGE following by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody and with anti ERK2. Results are representative of three independent experiments. (B) Serum-starved ELT3 cells were treated or not with 100 μM DGPP for the indicated times. The amount of inorganic phosphate (Pi) in each well was quantified as described in Materials and Methods section. The results are expressed as nmol of Pi per μg of total cellular proteins. Values are means ± SEM of six independent experiments. (C) ELT3 cell membranes (1 μg) were incubated at 37°C for the indicated times with or without 100 μM DGPP. The amount of inorganic phosphate (Pi) in each well was quantified as described in Experimental section. The results are expressed as nmol of Pi per μg of total cellular proteins. Values are means ± SEM of three independent experiments. (D) ELT3 cells membrane (1 μg) was incubated at 37°C for 15 min with 100 μM DGPP in the presence or absence of 10 mM NEM or 1 mM EDTA. For NEM treatment, membranes were pretreated for 20 min at 37°C before addition of DGPP. Phosphatase activity was measured as described in Experimental section. The values are expressed as nmol Pi formed per minutes per mg of proteins. Values are means ± SEM of three independent experiments.

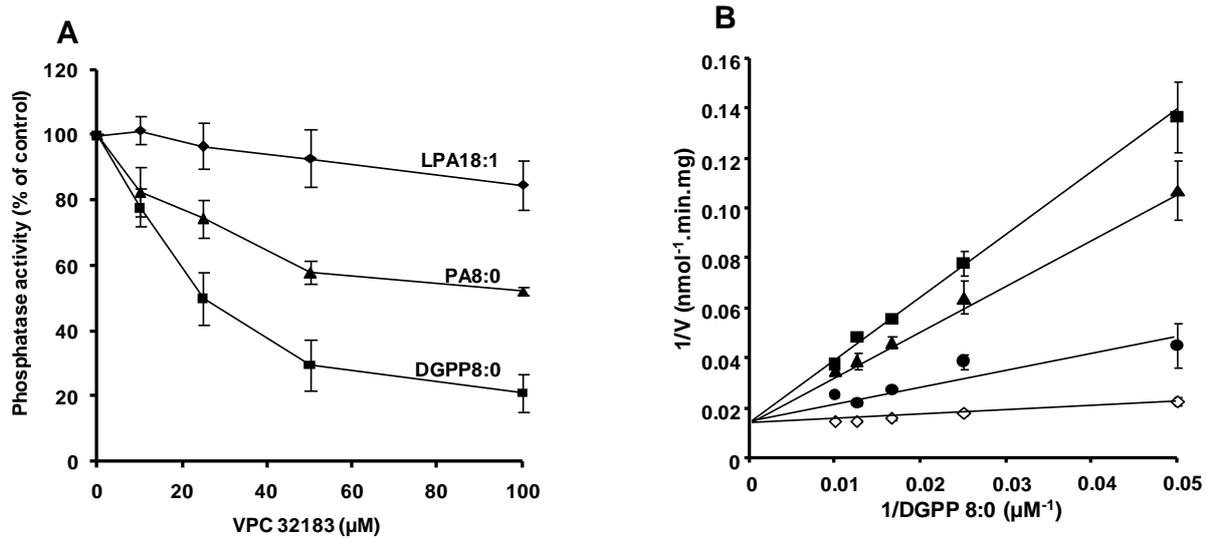


Fig. 5. VPC32183 inhibits DGPP dephosphorylation. (A) ELT3 cell membranes (1 μg) were incubated at 37 °C for 15 min with 100 μM LPA, 100 μM PA or 100 μM DGPP in presence or absence of VPC 32183 at the indicated concentrations. Phosphatase activity was measured as described in Materials and Methods section. Values are expressed as percent of respective controls performed without VPC 32183. Values are means ± SEM of three independent experiments. (B) Lineweaver and Burk plot of ELT3 cell membrane (1 μg) phosphatase activity measured in the presence of indicated DGPP concentrations in the absence (■), or in the presence of 25 μM (▲), 50 μM (●), or 100 μM (◇) VPC 32183. Values are means ± SEM of three independent experiments.

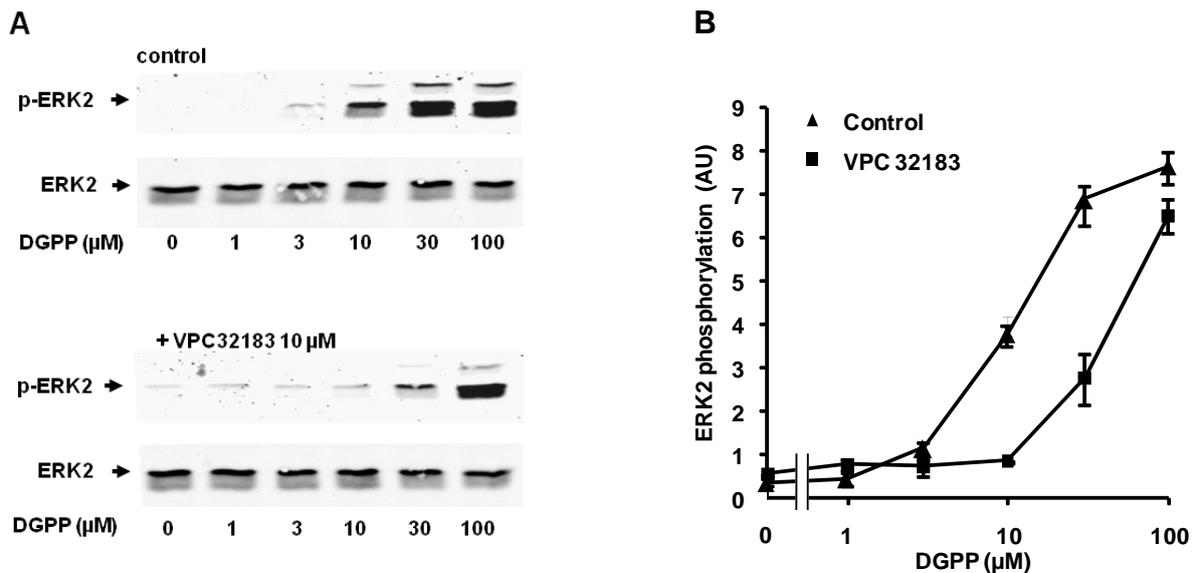


Fig. 6. VPC 32183 inhibits DGPP-mediated ERK1/2 activation. (A) Serum-starved ELT3 cells were preincubated or not (control) in the presence of 10 μ M VPC 32183 for 20 min before addition of indicated concentrations of DGPP for 5 min at 37°C. Cells were lysed and detergent-extract proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody and with anti-total ERK2 antibody. Results are representative of three independent experiments. (B) Quantification of ERK2 phosphorylation with the Li-Cor Odyssey software. Values were normalized to the amount of total ERK in each lane. Results are means \pm SEM of three independent experiments.

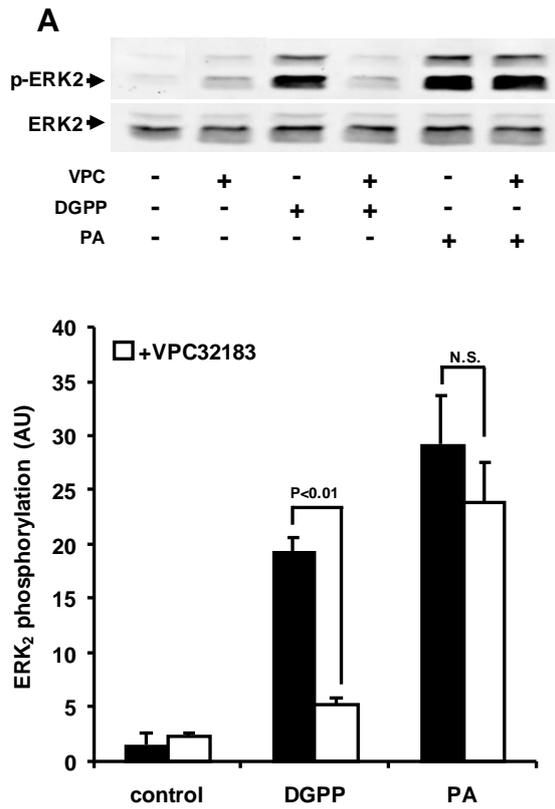


Fig. 7. PA-mediated ERK1/2 activation is resistant to VPC 32183 inhibition. (A) Serum-starved ELT3 cells were incubated at 37°C for 5 min with or without 10 μ M PA or 10 μ M DGPP in the presence or absence of 10 μ M VPC 32183. Cells were lysed and detergent-extracted proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody and with anti-total ERK2 antibody. (B) Quantification of ERK2 phosphorylation with the Li-Cor Odyssey software. Values were normalized to the amount of total ERK in each lane. Results are means \pm SEM of three independent experiments. N.S., $P > 0.05$.

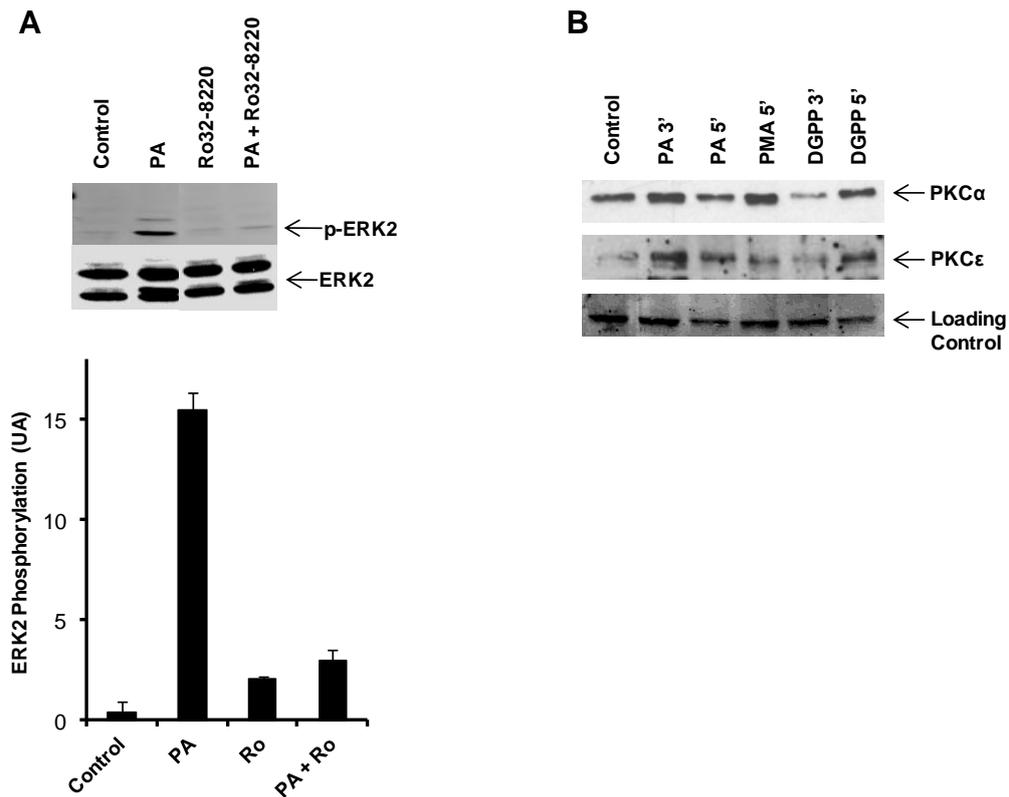


Fig. 8. (A) PA-induced ERK1/2 activation involves PKC. ELT3 cells were incubated with 10 μ M PA in the presence or absence of 5 μ M Ro31-8220. Cells were lysed and detergent-extracted proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody and with anti-total ERK2 antibody. (B) Effect of DGPP 8:0 and PA 8:0 on PKC translocation to membranes. ELT3 cells were incubated for 3 or 5 min in the presence of 10 μ M DGPP or PA, or 5 min in the presence of 1 μ M PMA. The particulate fractions were recovered by ultracentrifugation and pellets were analyzed by western blot with anti-PKC α and anti-PKC ϵ antibodies. Loading control corresponds to the main membrane protein revealed by amido-black staining of the blot.

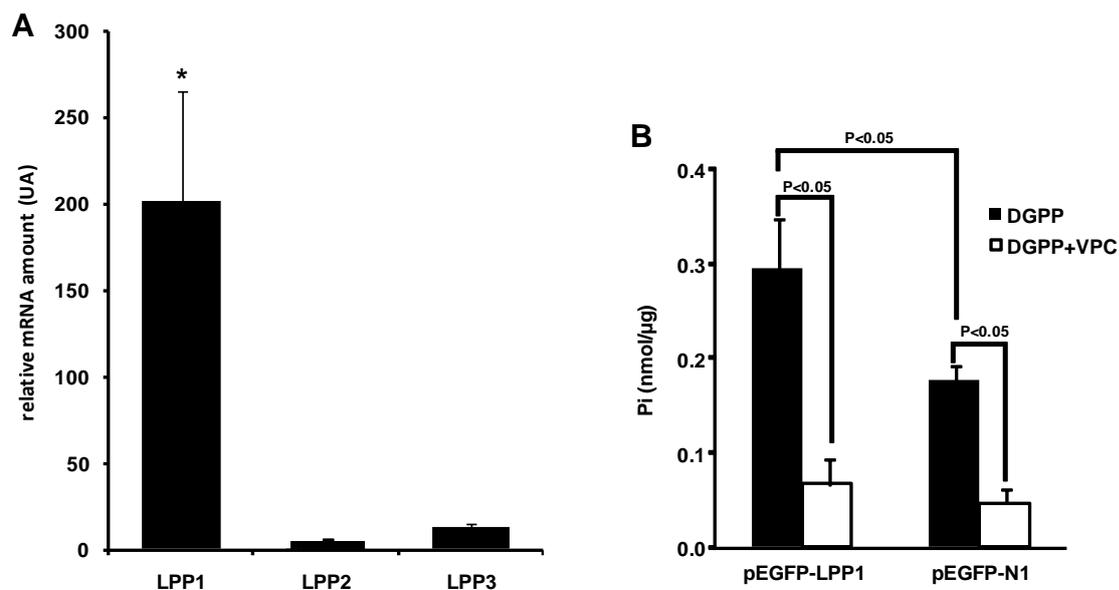


Fig. 9. (A) LPP1 is the predominant LPP isoform expressed in ELT3 cells. The expression of LPP subtypes in ELT3 cells was examined by quantitative RT-PCR as described in Experimental section. Values, expressed as relative mRNA amounts, are the mean \pm SEM of three separate experiments performed in duplicate. GAPDH transcript was used as a standard. *, $P < 0.01$ vs LPP2 and LPP3. (B) LPP1 hydrolyses DGPP and is inhibited by VPC32183. Cell membranes were prepared from HEK293 cells transfected with LPP1 expression vector (pEGFP-LPP1) or empty vector (pEGFP-N1). Membranes (1 μ g) were incubated with 100 μ M DGPP in the presence or absence of 100 μ M VPC32183 for 15 min at 37°C. Pi amounts were quantified as described above. Results are means \pm SEM of four independent experiments.

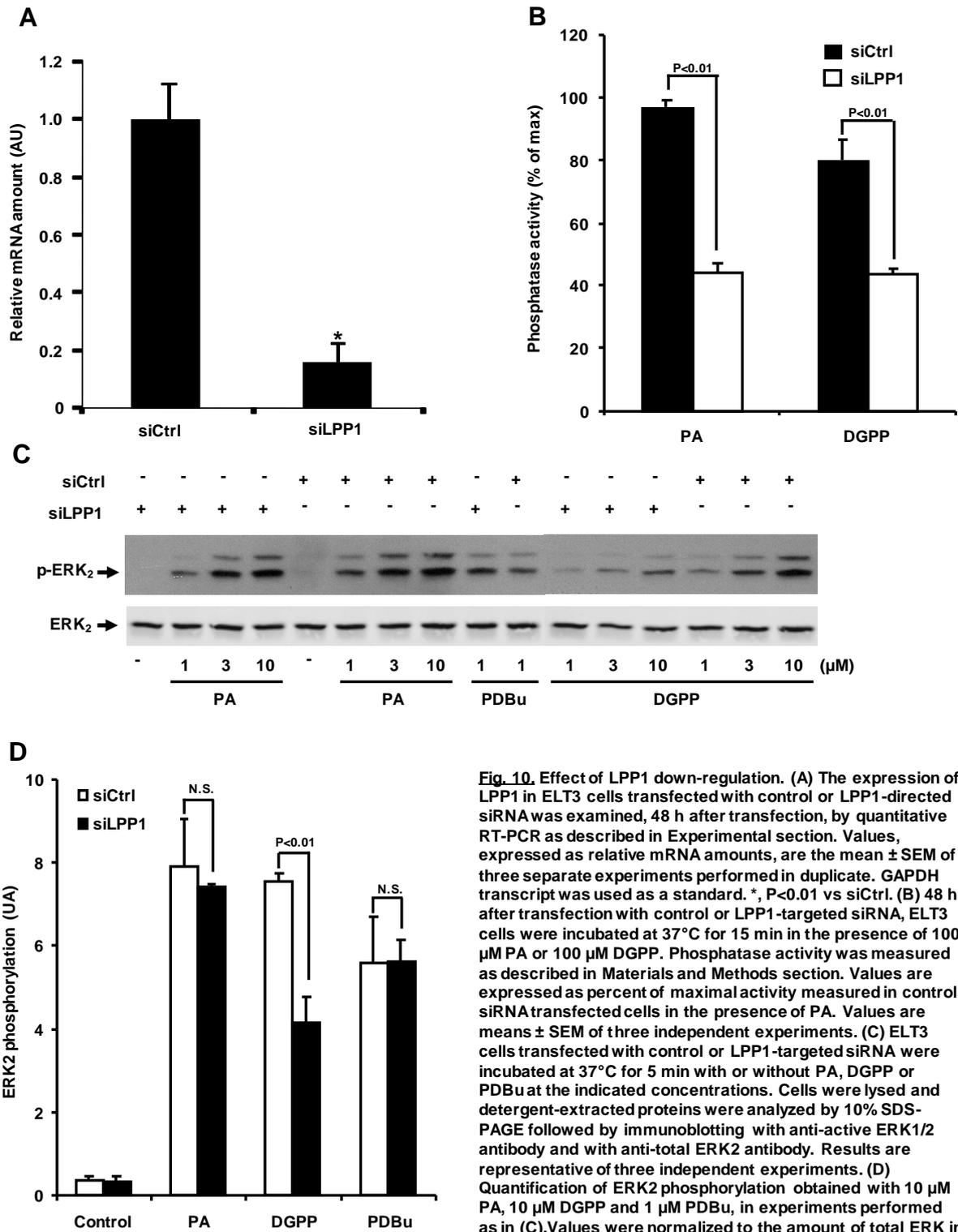


Fig. 10. Effect of LPP1 down-regulation. (A) The expression of LPP1 in ELT3 cells transfected with control or LPP1-directed siRNA was examined, 48 h after transfection, by quantitative RT-PCR as described in Experimental section. Values, expressed as relative mRNA amounts, are the mean \pm SEM of three separate experiments performed in duplicate. GAPDH transcript was used as a standard. *, $P < 0.01$ vs siCtrl. (B) 48 h after transfection with control or LPP1-targeted siRNA, ELT3 cells were incubated at 37°C for 15 min in the presence of 100 μ M PA or 100 μ M DGPP. Phosphatase activity was measured as described in Materials and Methods section. Values are expressed as percent of maximal activity measured in control siRNA transfected cells in the presence of PA. Values are means \pm SEM of three independent experiments. (C) ELT3 cells transfected with control or LPP1-targeted siRNA were incubated at 37°C for 5 min with or without PA, DGPP or PDBu at the indicated concentrations. Cells were lysed and detergent-extracted proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active ERK1/2 antibody and with anti-total ERK2 antibody. Results are representative of three independent experiments. (D) Quantification of ERK2 phosphorylation obtained with 10 μ M PA, 10 μ M DGPP and 1 μ M PDBu, in experiments performed as in (C). Values were normalized to the amount of total ERK in each lane. Results are means \pm SEM of three independent experiments. N.S., $P > 0.05$.

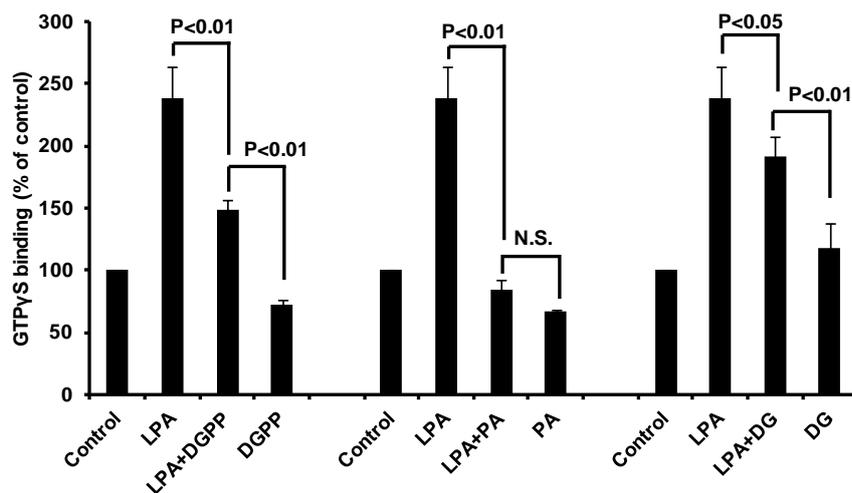


Fig. S1. Comparison of DGPP, PA and DG antagonistic effect on LPA-induced GTP γ [³⁵S] binding. Membranes were incubated with 0.5 μ M LPA in the presence of either 20 μ M DGPP 8:0, 20 μ M PA 8:0 or 20 μ M DG 8:0 for 30 min at 30°C. GTP γ [³⁵S] binding was measured as described in Experimental section. The values are expressed as percent of the control value (basal value = 3712 \pm 912 cpm and maximal value = 8270 \pm 1600 cpm), and are means \pm SEM of three independent experiments. N.S., P>0.05.

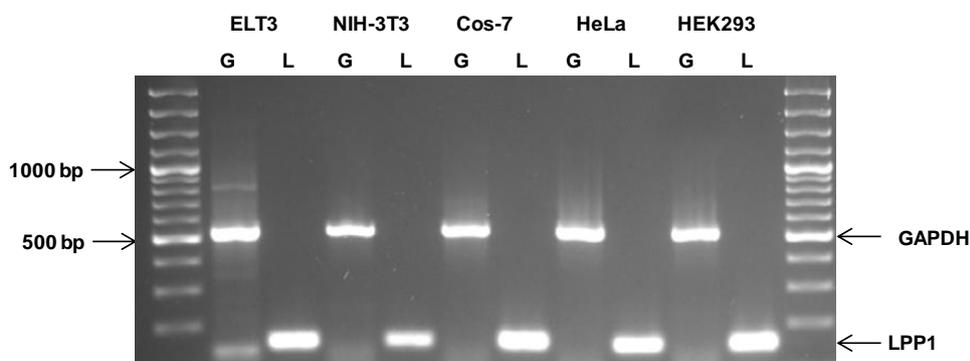


Fig. S2. Expression of LPP1 in various cell lines. The expression of LPP1 was determined by RT-PCR from total RNA of ELT3, NIH-3T3, Cos-7, HeLa and HEK293 cells. PCR reactions were performed with LPP1 primer set (L) or GAPDH primer set (G), as for real-time quantitative PCR but stopped after 35 cycles. GAPDH transcript was used as a standard. Typical result from the three experiments performed.

6. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr H. Le Stunff and Dr G. Charpigny for helpful discussion.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université Paris Sud-11. P-C.V. and E.B-D. were the recipients of a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

The abbreviations used are: LPA, Lysophosphatidic Acid; PA, Phosphatidic Acid; DGPP, Diacylglycerol Pyrophosphate; LPP, Lipid phosphate phosphatase; PAP, phosphatidate phosphohydrolase; DG, Diacylglycerol; NEM, N-ethylmaleimide; FPP, Farnesyl Pyrophosphate.

Table 1. Sequence of primer sets used for quantitative RT-PCR experiments

Target	Forward	Reverse
LPP1 (NM_022538.2)	AGCCAGGATGAAGGGAGATT	TGCGTAGCTCTGTCTGTTGG
LPP2 (NM_138905.2)	GGGTCAACTGCTCTGGCTAC	CGCTCCGACTCTTCATTCTC
LPP3 (NM_139252.1)	CCTCTTCTGCCTCTTCATGG	TCAGGGGGTACTTGATGCTC
GAPDH (NG_028301.1)	ATGACTCTACCCACGGCAAG	TACTCAGCACCAGCATCACC

RESULTATS PARTIE III

III Etude comparée de l'activité lipide-phosphate phosphatase dans les cellules musculaires lisses utérines normales et pathologiques (léiomyomes)

III 1 Activité et expression des LPP dans les cellules de myomètre sain

Il existe de nombreux exemples dans la littérature où dans des cellules cancéreuses l'expression des LPP sont modifiées. C'est le cas notamment dans les cancers ovariens où la LPP1 est sous exprimée (Tanyi, Hasegawa et al. 2003). Ainsi, nous avons recherché si l'expression des LPP et leurs activités phosphatases étaient différemment régulées dans les cellules de léiomyomes par rapport aux cellules saines de myomètre. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité lipide-phosphatase présente dans les membranes des cellules de myomètre en comparaison avec des membranes de cellules ELT3. Les résultats montrent que les membranes de cellules de myomètre ont une activité lipide phosphatase qui dégrade le PA et le LPA et que cette activité est plus importante que celle mesurée dans les membranes de cellules ELT3 (Figure 11).

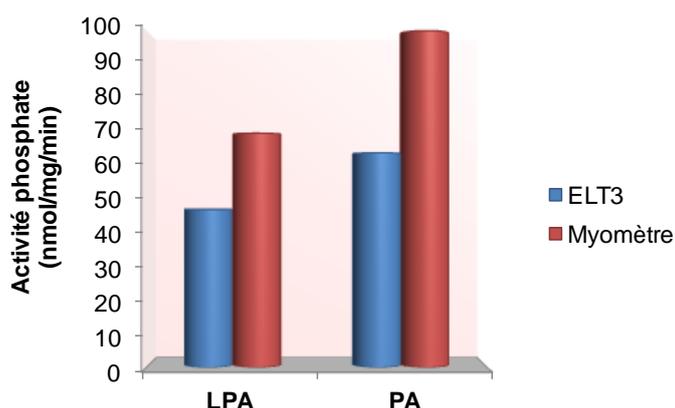


Figure 11. Activité phosphatase dans les cellules de myomètre comparée à celles des cellules ELT3. Des membranes de cellules de myomètre ou des membranes de cellules ELT3 sont incubées en présence de LPA ou de PA8:0 pendant 30 minutes à 37°C. La quantité de phosphate produit est mesurée par dosage colorimétrique.

Dans un second temps, nous avons comparé l'expression des différentes isoformes de LPP dans les deux modèles cellulaires en utilisant la technique de RT-PCR quantitative en temps réel. Les résultats montrent clairement que les cellules de myomètre expriment la LPP1 à un niveau supérieur à celui mesuré pour les cellules ELT3 (Figure 12). De plus, contrairement aux cellules ELT3, les cellules de myomètre expriment fortement la LPP3. Ainsi, l'expression plus importante de LPP1 associée à l'expression de la LPP3 est en bonne corrélation avec la présence d'une forte activité lipide-phosphatase dans les cellules de myomètre. Ces résultats sont

cohérents avec les travaux montrant que les cellules tumorales ont une activité LPP inférieure aux non transformées (Tanyi, Hasegawa et al. 2003; Samadi, Bekele et al. 2011). A partir des différences observées entre nos 2 modèles cellulaires, nous pouvons formuler l'hypothèse que l'absence de LPP3 dans les cellules ELT3 pourrait participer au caractère tumoral de ces cellules de léiomyomes.

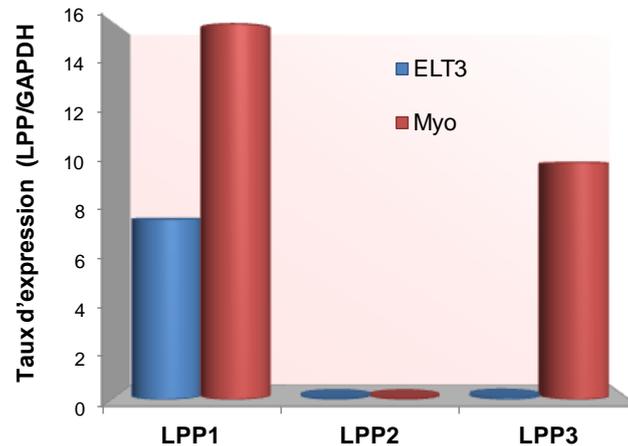


Figure 12. Analyse de l'expression des LPP par RT-PCR quantitative en temps réel. Quantification des transcrits LPP1, 2 et 3 dans les cellules ELT3 et les cellules de myomètre. Les résultats sont rapportés à la quantité de transcrit GAPDH mesurée dans chaque préparation d'ADNc.

III 2 La surexpression de la LPP3 dans les cellules ELT3

Comme nous venons de le voir, les cellules ELT3 expriment seulement la LPP1 alors que les cellules saines de myomètre expriment la LPP1 et la LPP3. Nous nous sommes donc interrogés quant au rôle de l'absence de la LPP3 dans le caractère tumoral des cellules ELT3. Nous avons formulé l'hypothèse que la LPP3 en conférant une activité lipide-phosphatase plus importante aux cellules saines participerait à leur état de cellules normales. Des résultats précédents au laboratoire ont montré que dans les cellules ELT3, le LPA avait un effet prolifératif plus important que dans les cellules de moymètre. Nous avons alors recherché les effets d'une surexpression de la LPP3 dans les cellules ELT3. Pour cela, nous avons amplifié par RT-PCR l'ADNc de la LPP3 à partir de foie de rat, et l'avons inséré dans le plasmide pCDNA3.1. De plus, la séquence correspondant à l'étiquette (Tag) HA a été insérée en position C-terminale lors de la PCR. L'insertion de ce tag permettra la détection immunologique de l'enzyme exprimée. Par la suite des cellules ELT3 ont été

transfectées avec ce vecteur codant pour la LPP3-HA. Le vecteur pEGFP-N1 codant pour la GFP a été utilisé comme contrôle. Les cellules ELT3 sont des cellules délicates lorsqu'il s'agit de transfection de gros fragments d'ADN comme les plasmides et nous n'avons pas réussi à mettre en place des lignées de cellules capables d'exprimer de façon stable la LPP3. Nous avons donc principalement travaillé sur des cellules exprimant la LPP3 de façon transitoire.

Par la technique de RT-PCR quantitative, nous avons confirmé la présence du messager de la LPP3 dans les cellules ELT3 transfectées (Tableau 1 Matériels et Méthodes, Figure 13A) alors qu'il est quasiment indétectable dans les cellules contrôles transfectées avec un plasmide d'expression de la GFP. L'activité lipide-phosphatase des cellules exprimant la LPP3 a alors été déterminée en utilisant comme substrat le PA. Les résultats sont présentés dans la Figure 13B. Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, l'expression de la LPP3 dans les cellules ELT3 n'entraîne pas d'augmentation de l'activité ecto-phosphatase mais au contraire, curieusement, on observe une diminution de cette activité. Cette expérience étant réalisée sur des cellules entières, c'est l'ecto-activité des LPP qui a été mesurée. Il est possible que, lorsque les cellules ELT3 expriment la LPP3, celle-ci reste dans des compartiments intracellulaires. En effet, il a été montré que la LPP3 pouvait être localisée dans des structures internes des cellules (Sciorra and Morris 1999), Pour vérifier cette hypothèse, les cellules transfectées exprimant la LPP3 ont été marquées par immunofluorescence afin de localiser la LPP3. Les résultats présentés dans la Figure 13D confirment que la majorité de la LPP3 exprimée est présente dans les structures intracellulaires. Pour confirmer ce résultat, nous avons dosé l'activité phosphatase en utilisant, à la place des cellules entières, des membranes cellulaires traitées au Triton X-100 afin de rendre le substrat accessible à l'ensemble des LPP. Cependant, l'emploi de ce détergent étant incompatible avec le dosage colorimétrique du phosphate, nous avons mesuré l'activité phosphatase en utilisant du PA radiomarqué ($[^{14}\text{C}]\text{PA}$) comme substrat. Dans ce cas, c'est le DAG produit qui est mesuré après séparation des lipides par chromatographie sur couche mince de silice. Dans ces conditions, contrairement à ce que l'on observait sur des cellules entières, l'activité PA-phosphatase est bien augmentée dans les cellules exprimant la LPP3 (Figure 13C). Par ailleurs, ces résultats suggèrent que la

surexpression de la LPP3 dans les cellules ELT3 réduirait l'activité LPP ectocellulaire globale des cellules au profit de l'activité intracellulaire.

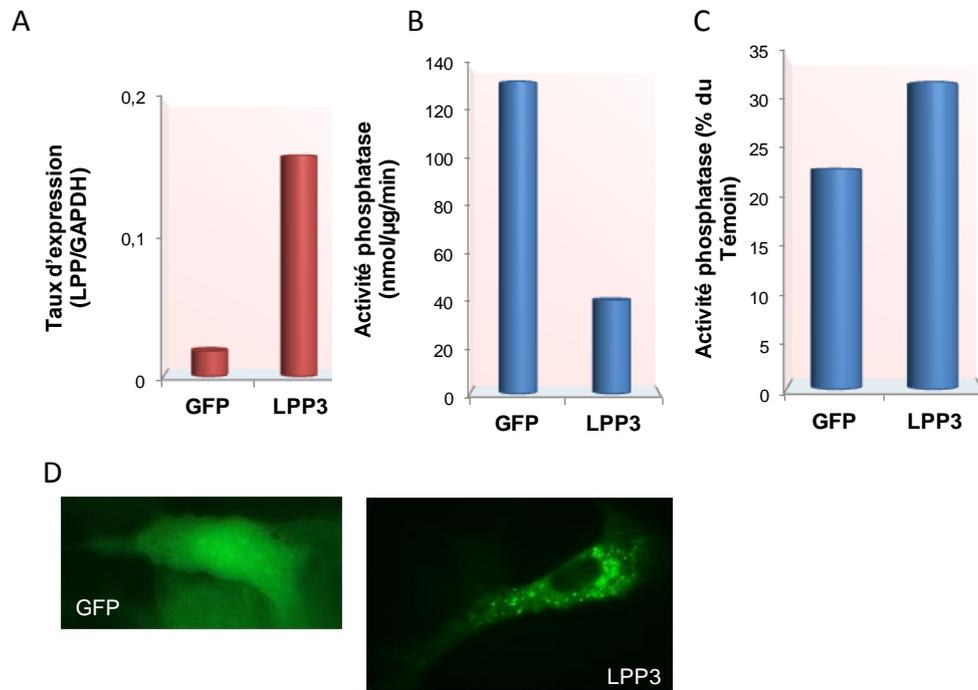


Figure 13. Effet d'une surexpression de la LPP3 dans les cellules ELT3. Des cellules ELT3 ont été transféctées avec le plasmide pCDNA3.1-LPP3 ou avec le plasmide pEGFPN1. A) 24h après transfection, la quantité de transcrit LPP3 a été déterminée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont rapportés à la quantité de transcrit GAPDH mesurée dans chaque préparation d'ADNc. B) 24h après transfection, des cellules ELT3 sont incubées en présence de 100 μ M de PA à 37°C pendant 15 minutes. La quantité de phosphate produite est mesurée par dosage colorimétrique. C) 24h après transfection, des membranes de cellules ELT3 (2 μ g/ml) sont incubées en présence de PA[14C] (0.01 μ Ci/ml) à 37°C pendant 15 minutes. Après extraction des lipides et analyse par CCM, la radioactivité associée au PA et au DAG est mesurée. La radioactivité de chaque lipide est exprimée en % de la radioactivité du pic de PA à To de la réaction. D) 24 h après transfection les cellules HEK 293 sont fixées et la LPP3-HA marquée par immunofluorescence. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence (\times 400).

Les cellules ELT3 étant difficiles à transfecter nous avons utilisé la lignée de cellule HEK 293, lignée qui supporte mieux les transfections. Tout d'abord, nous nous sommes assuré que l'expression des LPP dans les cellules HEK 293 était similaire à celle observée dans les cellules ELT3. Pour cela, après vérification que les amorces utilisées pour les cellules ELT3 fonctionnent dans les cellules HEK 293, nous avons quantifié par RT-PCR quantitative en temps réel les ARNm des trois LPP dans les cellules HEK 293. Les résultats de la Figure 14 montrent que, comme les cellules ELT3, les cellules HEK 293 n'expriment que l'isoforme LPP1. Ainsi, les

cellules HEK 293 présentent le même profil d'expression des LPP que les cellules ELT3.

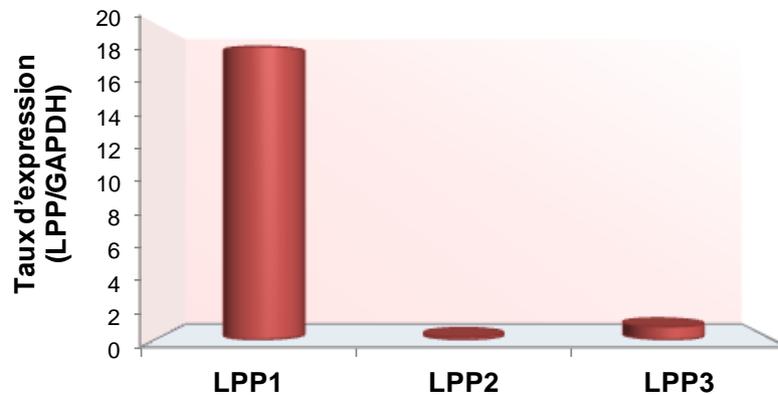


Figure 14. Analyse de l'expression des LPP par RT-PCR quantitative en temps réel dans les cellules HEK 293. Quantification des transcrits LPP1, 2 et 3 dans les cellules HEK 293. Les résultats sont rapportés à la quantité de transcrit GAPDH mesurée dans chaque préparation d'ADNc.

Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec le plasmide contenant la LPP3-HA ou avec le plasmide vide contenant seulement la GFP. Nous avons tout d'abord analysé l'expression de la LPP3 dans les cellules HEK 293 par immunofluorescence. Cette technique présente l'avantage de permettre à la fois de contrôler l'expression de la protéine transfectée ainsi que de déterminer sa localisation subcellulaire. Pour cela, les cellules HEK 293 transfectées avec les plasmides pCDNA-LPP3-HA ou pEGFP-N1, utilisé comme contrôle, puis analysées par immunofluorescence. Les résultats présentés dans la Figure 15A, confirment que les cellules HEK 293 expriment bien la LPP3. De plus, on observe que la fluorescence est concentrée dans des structures internes qui ne sont pas visibles dans les cellules transfectées avec la GFP seule.

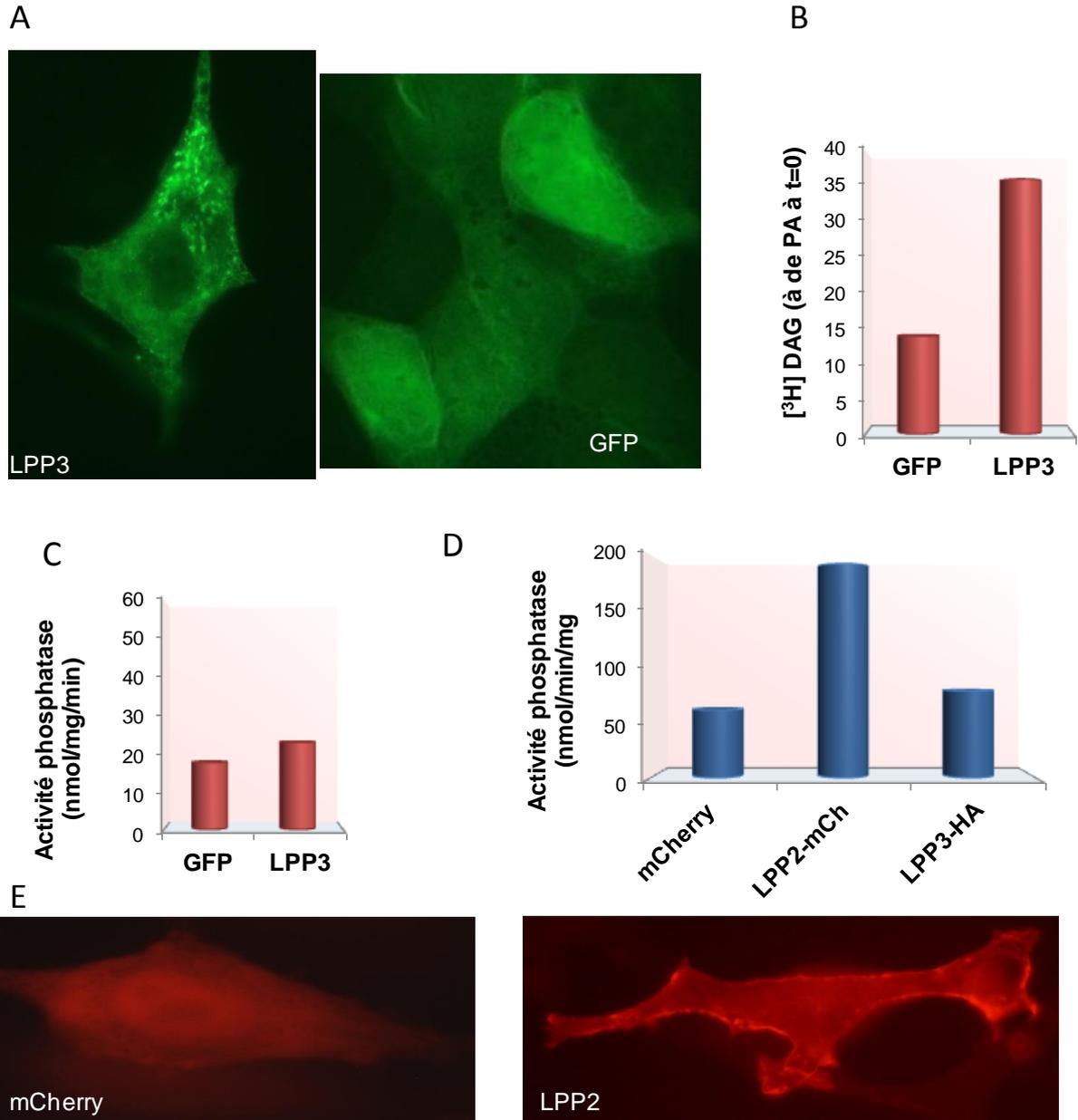


Figure 15. Expression de la LPP3-HA dans les cellules HEK 293. Des cellules HEK 293 sont transfectées avec les vecteurs codant la GFP ou la LPP3-HA (A,B, C) A) 24 h après transfection les cellules HEK 293 sont fixées et la LPP3-HA marquée par immunofluorescence. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence (x400). B) 24h après transfection des membranes de cellules HEK 293 (5 µg/ml) sont incubées en présence de PA [¹⁴C] (0.01 µCi/ml) à 37°C pendant 15 minutes. Après extraction des lipides et analyse par CCM, la radioactivité des pics de PA et DAG est mesurée. La radioactivité de chaque pic est exprimée en % de la radioactivité du pic de PA à To de la réaction. C) 24h après transfection les cellules HEK 293 sont incubées en présence de 100 µM de PA à 37°C pendant 15 minutes. La quantité de phosphate produite est mesurée par dosage colorimétrique. D) Des cellules HEK 293 sont transfectées avec les vecteurs codant les protéines mCherry, LPP2-mCherry et LPP3-HA. 24h après transfection l'activité phosphatase des cellules a été mesurée en présence de PA8:0 100 µM. E) Des cellules HEK 293 sont transfectées avec le vecteurs codant la protéines LPP2-mCherry ou mCherry. 24 h après transfection les cellules HEK 293 sont fixées et la LPP2-mCherry ou la mCherry est observée sous un microscope à fluorescence (x400).

Nous avons par la suite quantifié l'activité phosphatase sur membranes de cellules et sur cellules entières. Pour cela, des membranes de cellules HEK 293 transfectées soit avec la LPP3 soit avec la GFP ont été mises en présence de [¹⁴C]PA, et le [¹⁴C]DAG produit a été mesuré après séparation des lipides par chromatographie sur couche mince. Dans les membranes de cellules transfectées avec la LPP3 on observe une forte production de DAG par rapport aux cellules contrôles transfectées avec la GFP seule, ce qui traduit une augmentation de l'activité phosphatase des cellules transfectées LPP3 (Figure 15B). Nous avons ensuite mesuré l'activité phosphatase sur cellules entières transfectées avec la LPP3 ou avec la GFP. Pour cela, les cellules ont été incubées avec du PA et la quantité de phosphate libéré a été mesurée par dosage colorimétrique. On observe (Figure 15C) que dans les cellules transfectées avec la LPP3 il n'y a pas d'augmentation de l'activité phosphatase. Ainsi il semblerait que, comme dans les cellules ELT3, la LPP3 soit principalement intracellulaire et ne serait pas adressée à la membrane plasmique. Pour vérifier que ce phénomène est bien spécifique de la LPP3 et pas un simple artéfact dû à la surexpression de l'enzyme, nous avons construit un plasmide permettant l'expression de la LPP2 fusionnée avec la protéine fluorescente mCherry. Après transfection des cellules HEK 293 avec ce vecteur nous avons observé que la LPP2 était principalement exprimée à la membrane plasmique corrélée avec une augmentation de l'activité phosphatase sur cellules entières par rapport aux cellules contrôles transfectées avec un vecteur contenant la protéine mCherry (Figure 15D et E). Ce résultat indique que l'absence de l'expression de la LPP3 au niveau de la membrane plasmique n'est pas un artéfact.

III 4 La LPP1 interagit avec la LPP3

Les résultats précédents obtenus dans les cellules ELT3 et dans les cellules HEK 293 montrent que l'expression de la LPP3 entraîne une augmentation de l'activité lipide-phosphatase totale des cellules mais pas de l'activité ecto-cellulaire. Cette activité ecto-cellulaire est même réduite par l'expression de la LPP3 dans les cellules ELT3. Des études récentes ont montré que les LPP interagissent entre elles

pour former des oligomères (Long, JS et al., BJ, 2008, 371). Nous avons alors postulé que lors de la transfection de la LPP3, celle-ci s'associe avec les LPP endogènes, dans nos modèles, la LPP1 pour former des hétéro-oligomères LPP1-LPP3. Nous avons alors recherché les éventuelles interactions entre la LPP1 et la LPP3 par un test de co-immunoprécipitation. En absence d'anticorps spécifiques des LPP, nous avons exprimé des LPP étiquetées. Pour cela, les cellules HEK 293 ont été co-transfectées avec la LPP3 disposant d'un tag HA (LPP3-HA) et avec la LPP1 fusionnée avec la protéine GFP (LPP1-GFP). Trois conditions de transfection contrôle ont été réalisées en parallèle. Il s'agit des combinaisons suivantes : GFP + mCherry, LPP1-GFP + mCherry et LPP3-HA + GFP. Après la lyse des cellules, les lysats sont mélangés avec des billes couplées à des anticorps dirigés contre la GFP (Kit GFP Trap, Chromotek) afin d'immunoprécipiter la LPP1-GFP ainsi que les protéines associées. Les culots d'immunoprécipitation sont ensuite analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la GFP ou le tag HA.

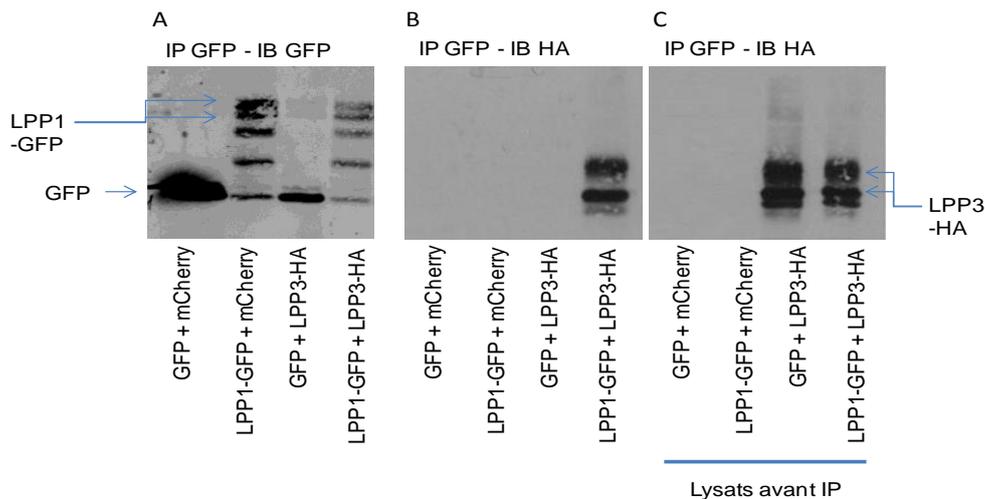


Figure 16. Co-immunoprécipitation de la LPP3 et de la LPP1. Des cellules HEK 293 sont co-transfectées avec les vecteurs codant la GFP, la mCherry, la LPP1-GFP ou la LPP3-HA comme décrit dans la figure. 24h après transfection, les cellules sont lysées et la GFP est immunoprécipitée grâce au kit GFP-Trap comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». (A et B) Les protéines précipitées sont ensuite analysées par western blot en utilisant un anticorps anti GFP (A) et anti-HA (B). C) Une fraction aliquoté des lysats cellulaires, prélevée avant immunoprécipitation, est analysées par western blot en utilisant un anticorps anti-HA (Lysats avant IP).

La Figure 16A montre les résultats de western blot obtenus avec l'anticorps dirigés contre la GFP. Dans les puits correspondant aux cellules transfectées avec la GFP on observe la présence d'une bande correspondant à la protéine GFP seule (masse apparente d'environ 30 kDa). Dans les puits 2 et 4, puits où les cellules ont

été transfectées avec la LPP1-GFP, on observe la présence de cinq bandes. Les trois bandes de masses moléculaires les plus élevées pourraient représenter différentes formes de la LPP1-GFP. En effet, il a été décrit que les LPP pouvaient être glycosylées ce qui modifie leur masse apparente. Les deux autres bandes, de masse inférieure à la masse prédite de la LPP1-GFP, correspondent certainement à des produits de dégradation. La membrane a ensuite été déshybridée et incubée en présence d'anticorps dirigés contre le tag HA (Figure 16 B). On observe alors la présence de bandes uniquement dans le puits correspondant aux cellules co-exprimant LPP1-GFP et LPP3-HA. Les deux bandes visibles ont des masses qui correspondent aux différentes formes décrites de LPP3 (forme glycosylées ou non). Bien qu'on ne détecte la LPP3 que dans le culot de précipitation des cellules exprimant LPP1-GFP et LPP3-HA, l'analyse des lysats cellulaires avant précipitation montre que la LPP3-HA était également bien exprimée dans les cellules transfectées GFP + LPP3-HA (Figure 16 C). Ces résultats montrent que la LPP3-HA et la LPP1-GFP interagissent spécifiquement puisque la précipitation de la GFP seule n'entraîne pas la précipitation de la LPP3-HA.

III 5 Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons montré que les cellules de myomètre sain expriment à la fois la LPP1 et la LPP3 alors que les cellules ELT3 n'expriment que la LPP1. De plus, l'activité LPP est plus importante dans les cellules de myomètre en comparaison des cellules ELT3.

Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences de l'absence de LPP3 dans les léiomyomes utérins. Pour cela, nous avons surexprimé la LPP3 dans les cellules ELT3 et nous avons observé que l'activité LPP ecto-cellulaire diminuait alors que l'activité LPP totale, au contraire augmentait. Des études montrent que la LPP3 peut être localisée dans des compartiments intracellulaires. De plus, la LPP1 et la LPP3 peuvent interagir et former des hétéro-oligomères (Long, Pyne et al. 2008). A partir de ces données bibliographiques et de nos résultats précédents nous avons formulé l'hypothèse que la LPP3 pourrait retenir la LPP1 dans des structures cellulaires internes. Les cellules ELT3 sont des cellules difficiles à transfecter. En

effet, quel que soit le moyen de transfection utilisé, le pourcentage de transfection reste faible et une mortalité cellulaire importante est observée. Ainsi, pour plus de facilité nous nous sommes tournés vers la lignée de cellules HEK 293 qui supporte bien la transfection, après nous être assuré que le profil d'expression des LPP était équivalent à celle des cellules ELT3. Cependant, la surexpression de la LPP3 dans ces cellules HEK 293 n'engendre pas de changement de l'activité ecto-LPP alors que l'activité totale est fortement augmentée. L'observation par immunofluorescence de la localisation montre que la LPP3 est principalement présente dans des structures internes dans les cellules HEK 293. Cependant, on observe également un léger marquage membranaire. Ainsi il semblerait que la LPP3 soit majoritairement intracellulaire mais qu'une petite proportion atteigne la membrane. Le fait que l'activité ecto-phosphatase n'augmente pas alors que la LPP3 se retrouve en partie à la membrane, montre que de la LPP1 endogène a certainement été piégée dans la cellule comme cela a été observé dans les cellules ELT3. En précipitant la LPP1 nous avons observé la présence de la LPP3 traduisant une interaction de ces deux protéines.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la LPP3 joue un rôle prépondérant dans la physiologie de la cellule de myomètre probablement en restreignant les effets prolifératifs et anti-apoptotiques des médiateurs lipidiques et que son absence pourrait conduire au développement d'un caractère tumorale de la cellule.

DISCUSSION GENERALE

L'acide lysophosphatidique (LPA) est le plus simple des glycérophospholipides, en effet il est composé d'un squelette glycérol phosphorylé en position 3 et acylé en position 1 ou 2, l'autre groupement alcool restant libre. Le LPA a tout d'abord été décrit comme intermédiaire de synthèse des triglycérides et des phospholipides, mais un regain d'intérêt pour cette molécule est venu lorsque son rôle dans la signalisation cellulaire a été découvert. En effet, le LPA est capable d'induire un grand nombre de processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, la migration et au travers de ses effets il a été impliqué dans la progression de nombreux cancers (Blaho and Hla 2011). Le LPA peut provenir de plusieurs voies de biosynthèse, la voie majoritaire faisant intervenir l'autotaxine (ATX) (Saulnier-Blache 2004). L'ATX est une enzyme circulante possédant une activité LysoPLD hydrolysant la lysophosphatidylcholine en LPA. Une fois formé par l'ATX, le LPA est capable d'activer les voies de signalisation via son interaction avec différents récepteurs. De nombreux récepteurs au LPA ont été caractérisés depuis les années 2001. Ce sont tous des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Actuellement 9 récepteurs couplés aux protéines G ont été décrits comme récepteurs au LPA.

Un des thèmes de recherche développés au laboratoire concerne l'étude des mécanismes de signalisation cellulaire impliqués dans le développement des leiomyomes utérins. En utilisant un modèle cellulaire de léiomyome de rate (cellule ELT3) conservant *in vitro* leur phénotype caractéristique (Walker 2002), nous avons mis en évidence que le LPA était capable d'induire une prolifération de ces cellules via l'activation du module MAP Kinase ERK1/2. Dans les cellules ELT3, le LPA active ERK via l'activation du récepteur LPA1 qui est couplé à la protéine Gi pour activer Ras et la voie des MAP kinases ERK1/2 (Billon-Denis 2008). Par ailleurs, bien que les cellules ELT3 n'expriment pas l'ATX, elles produisent et libèrent de la LPC. Ceci suggère que, *in vivo*, la LPC produite par les cellules de léiomyome pourrait être utilisée localement par l'ATX circulante pour générer du LPA qui agirait *in situ* et stimulerait la croissance de la tumeur (Billon-Denis, Tanfin et al. 2008).

Dans cette étude, nous avons montré que les cellules ELT3 sont capables de dégrader le LPA et que la première étape de la dégradation du LPA consiste en une déphosphorylation. Dans les cellules ELT3, la dégradation du LPA en MAG est exclusivement catalysée par les lipides-phosphate phosphatases (LPP) possédant les caractéristiques des enzymes de type PAP2 décrites par Brindley et Waggoner (1998). Les LPP sont des protéines transmembranaires catalysant la déphosphorylation du LPA mais aussi d'autres phospholipides comme le PA ou le DGPP. Les LPP possèdent 6 domaines transmembranaires et leur site catalytique se situe à l'extérieur de la cellule ou dans le lumen pour les LPP présentes dans les structures membranaires internes. Par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel nous avons montré que les cellules ELT3 expriment uniquement l'isoforme 1 des LPP. Nous avons par la suite confirmé, en utilisant des siRNA dirigés contre la LPP1, que la déphosphorylation du LPA était bien catalysée par la LPP1.

Le LPA est un agent mitogène important au sein d'un organisme et est capable d'induire un grand nombre d'effets cellulaires. L'étude des voies de signalisation induites par le LPA a mené au développement d'antagonistes et d'inhibiteurs qui sont pour certains testés dans des modèles *in vivo*. Parmi ces antagonistes nous avons utilisé, au laboratoire le DioctanoylGlycérol Pyrophosphate (DGPP8:0) pour étudier les effets induits par le LPA. En effet, ce glycérophospholipide a été décrit comme un antagoniste des récepteurs LPA1 et LPA3 (Fischer, Nusser et al. 2001). Cependant, contrairement à ce qu'il a été décrit, nous n'avons pas observé, dans les cellules ELT3, d'effet antagoniste du DGPP sur la réponse au LPA, mais nous avons observé que le DGPP était capable d'activer le module MAP kinase ERK1/2. Nous avons montré dans cette étude que le DGPP est déphosphorylé en PA et que cette réaction est inhibée par le VPC32183. Le PA ainsi formé va ensuite activer le module MAP kinase ERK. Pour le moment, ni le DGPP ni la PA-Kinase n'ont été détectés dans les cellules de mammifères. Cependant, des effets du DGPP ont déjà été décrits dans des cellules de mammifères. En particulier, il a été observé dans les macrophages murins que le DGPP active la phospholipase A2 et induit une production de prostaglandines E2 (Balboa, Balsinde et al. 1999; Balsinde, Balboa et al. 2000). De plus, récemment deux enzymes ayant de fortes homologies avec les dioleil pyrophosphate phosphatases (DPP) de levure ont été

caractérisées chez les mammifères. Ces enzymes appelées DPPL1 et DPPL2 pour DPP like 1 et 2 sont capables de dégrader différents glycérolipides mais possèdent une meilleure affinité pour le DGPP (Takeuchi, Harigai et al. 2007). Si la présence de DGPP n'a pas été mise en évidence chez les mammifères, d'autres lipides possédant un groupement pyrophosphate existent et ont un rôle potentiel dans la signalisation cellulaire. En particulier, le farnésyl pyrophosphate (FPP) principalement connu pour son rôle comme précurseur dans la synthèse du cholestérol, a été montré récemment comme pouvant interagir avec des récepteurs de la famille des RCPG. En effet, le FPP est capable d'activer le récepteur LPA5/P2Y5 (Lee, Choi et al. 2009) et le récepteur purinergique P2Y12 (Hogberg, Gidlof et al. 2012). Le FPP est également capable d'inhiber les récepteurs au LPA de la famille EDG, principalement le récepteur LPA3 (Liliom, Tsukahara et al. 2006). Ces résultats suggèrent que le FPP pourrait être un modulateur endogène des effets du LPA et éventuellement d'autres phospholipides, dont l'action pourrait, elle-même, être modulée par les LPP. Toutefois, il semble qu'aucune donnée ne soit publiée quant à l'activité potentielle des LPP vis-à-vis du FPP.

Plusieurs études décrivent une modification de l'expression et/ou de l'activité des LPP dans les cellules cancéreuses. En effet, dans les fibroblastes transformés on observe une activité LPP plus faible que dans des fibroblastes non transformés. Le même phénomène est observé dans les cancers ovariens où, de nouveau, l'activité LPP est plus faible par rapport aux cellules normales (Martin, Gomez-Munoz et al. 1993; Imai, Furui et al. 2000; Tanyi, Hasegawa et al. 2003; Tanyi, Morris et al. 2003). En comparant les activités phosphatases dans les cellules de léiomyomes et les cellules saines, nous nous sommes aperçus que, comme dans les cancers, les cellules de léiomyomes ont une activité LPP plus faible que les cellules de myomètre sain. Cette diminution d'activité est corrélée avec une expression plus faible des LPP. En effet, nous avons montré par RT-PCR quantitative en temps réel que les cellules de myomètre expriment à la fois la LPP1 et la LPP3. Cette différence d'expression et d'activité pourrait être liée au développement tumoral des cellules ELT3. Bien que leur activité soit similaire, la LPP1 et la LPP3 n'ont pas de fonction redondante. En effet, la LPP3 intervient dans des phénomènes précoces du développement embryonnaire. Elle est détectée au stade E7.5 chez la souris et les

embryons KO pour la LPP3 meurent à ce stade du développement à cause de défauts majeurs de la vascularisation . De plus, outre son activité phosphatase, la LPP3 comporte un domaine RGD d'interaction aux intégrines, et est capable d'interagir avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$, et de participer à l'agrégation des cellules endothéliales (Humtsoe, Feng et al. 2003). De plus, il a été montré par des études *in vivo* et *in vitro* que dans des cancers ovariens l'expression de la LPP3 induit la mort cellulaire ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale (Tanyi, Morris et al. 2003). Ainsi, on peut supposer que l'absence de LPP3 dans les cellules ELT3 soit en partie responsable de leur développement tumoral en induisant une prolifération exagérée et une survie cellulaire accrue.

Ainsi les cellules ELT3 possèdent une activité LPP de base plus faible que les cellules de myomètre sain. Ces résultats sont en accord avec le caractère pathologique des cellules ELT3, qui montrent une plus grande capacité à proliférer en présence de LPA. En effet, une plus faible activité LPP engendre une augmentation de la concentration de LPA. Cette augmentation de concentration n'est pas due à une augmentation de l'ATX mais bien à une diminution de l'expression des LPP entraînant une diminution de la dégradation du LPA (Tanyi, Hasegawa et al. 2003). En effet il a été montré dans des souris KO inductibles pour le gène LPP1 un turnover beaucoup plus faible pour le LPA que pour les souris sauvages. (20 à 5 minutes respectivement) (Tomsig, Snyder et al. 2009). De plus, nous avons montré qu'une down-régulation de l'activité LPP dans les cellules ELT3 via un traitement avec des ARN interférence, engendre un effet plus fort et plus long du LPA sur l'activation ERK1/2.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de la LPP3 dans la transformation myomètre-léiomyome. Pour cela, nous avons cloné la LPP3 de rat et l'avons fusionnée à un tag HA. Après transfection des cellules ELT3 et vérification de l'expression par RT-PCR en temps réel, nous avons mesuré l'activité ecto-phosphatase des cellules. De façon surprenante, bien que la quantité d'ARN messenger de la LPP3 soit élevée dans les cellules ELT3 transfectées, nous n'avons pas observé d'augmentation d'activité, mais plutôt une diminution de l'activité ecto-cellulaire. La LPP3 a déjà été décrite comme ayant une localisation dans des

compartiments cellulaires différents des autres LPP. En effet, dans des cellules polarisées MDCK, la LPP3 a été observée du côté baso-latéral de la cellule, alors que la LPP1 est localisée du côté apical (Jia, Kai et al. 2003). De plus, il a été montré que la LPP3 pouvait aussi être localisée dans des structures membranaires internes (Sciorra and Morris 1999). Nous avons donc par la suite quantifié l'activité phosphatase sur les membranes de cellules ELT3 transfectées avec la LPP3 en présence de Triton X-100 afin de solubiliser les structures internes et ainsi quantifier l'activité des LPP qui pourraient se retrouver dans ces vésicules et ainsi quantifier l'activité totale des cellules. Les LPP étant des ecto-phosphatases, lorsqu'elles sont localisées dans des organelles intracellulaires, le site catalytique se situe dans le lumen de ces organelles. Pour cette étude, nous avons utilisé du [¹⁴C]PA car le dosage de phosphate colorimétrique est incompatible avec le Triton X-100. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que dans les cellules ELT3 exprimant la LPP3, l'activité LPP totale était fortement augmentée. Ces résultats montrent qu'une surexpression de la LPP3 entraîne une diminution de l'activité ecto-phosphatase et donc certainement une diminution de la LPP1 à la membrane.

Les LPP sont des protéines qui peuvent interagir entre elles. En effet, les LPP peuvent former des hétéro-oligomères comprenant jusqu'à 6 monomères dans un seul complexe (Long, Pyne et al. 2008). Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse que la LPP3, en formant des hétéro-oligomères avec la LPP1, était capable de séquestrer la LPP1 dans des compartiments intracellulaires. Une surexpression de la LPP3 entraînerait alors la formation d'hétéro-oligomères avec une proportion plus importante de LPP3 que de LPP1.

Dans les cellules de myomètre nous avons observé une activité ecto-phosphatase plus grande que dans les cellules ELT3. Nous avons également montré que, non seulement la LPP3 était exprimée dans les cellules de myomètre contrairement aux cellules ELT3, mais que la quantité d'ARN messager de la LPP1 était plus importante dans le modèle sain. Ainsi, même si une certaine proportion de LPP1 est séquestrée à l'intérieur de la cellule via l'interaction avec la LPP3, proportionnellement, il y aura plus de LPP1 à la membrane en comparaison avec les cellules ELT3 transfectées LPP3 et donc une activité ecto-phosphatase plus importante.

L'analyse de la séquence de la LPP3 montre la présence de deux motifs de rétention dans le réticulum endoplasmique. En effet, dans la première boucle intraluminaire (entre les acides aminés 62 et 64) et dans la queue carboxy-terminale (entre les acides aminés 292-294) on observe la présence d'un motif de rétention endoplasmique « XRR » (connu également sous le nom RXR). Ce motif participe à la localisation des protéines membranaires dans le réticulum endoplasmique. Cette rétention fait intervenir les protéines du complexe COPI. Le complexe COPI est responsable du transport rétrograde entre le réticulum et le golgi. Ainsi, en interagissant avec le motif RXR, COPI bloque la protéine en transit au niveau du réticulum (Cunningham, McIntosh et al. 2012). Ainsi, ce motif régule la localisation de protéines membranaires entre le réticulum et la membrane plasmique comme c'est le cas pour les récepteurs GABA (Margeta-Mitrovic, Jan et al. 2000; Xia, Hornby et al. 2001). Ce motif permet également d'empêcher des protéines anormalement formées de sortir du réticulum. Ainsi, le canal potassique ATP-dépendant, protéine transmembranaire composée de 8 sous unités, reste dans le réticulum tant que l'assemblage de la protéine n'est pas total. En effet, chaque sous unité possède un motif « RXR » sur sa partie carboxy-terminale, qui est masqué lors de l'assemblage des sous unités (Zerangue, Schwappach et al. 1999). Ainsi, la présence de ce motif RXR dans la LPP3 pourrait expliquer la localisation de celle-ci préférentiellement à l'intérieur de la cellule. Les GPCR PAR4 possèdent également un domaine RXR qui interagit avec COPI et bloque PAR4 dans le réticulum. La liaison de PAR2 avec PAR4 permet la liaison du domaine RXR de PAR4 avec la protéine 14-3-3 ζ ce qui entraîne la migration du complexe à la membrane (Cunningham, McIntosh et al. 2012).

Même si dans les cellules de myomètre nous n'avons pour le moment pas confirmé la présence intracellulaire de la LPP3, ces résultats semblent être corrélés avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire. En effet, dans les cellules ELT3, l'endothéline-1 (ET-1) induit une prolifération cellulaire via l'activation des MAP kinases ERK. Parallèlement, l'ET-1 active la PLD qui, en formant de l'acide phosphatidique, contribue à l'activation du module MAP kinase ERK ce qui augmente l'effet prolifératif de l'ET-1 dans ces cellules. Dans les cellules de myomètre sain, par contre l'effet prolifératif de l'ET-1 est plus faible. En plus, bien que la PLD soit activée par l'ET-1, elle ne contribue pas à l'activation du module

MAP kinase ERK (Robin, Chouayekh et al. 2005). Une explication possible pour cette différence entre les deux modèles pourrait être une différence d'expression des LPP. En effet, la LPP3 localisée dans le compartiment intracellulaire des cellules de myomètre sain pourrait dégrader le PA formé par la PLD en réponse à l'ET-1, l'empêchant ainsi de « suractiver » le module MAP kinase ERK. Il a été montré que la LPP3 était colocalisée avec la PLD2 dans les cellules HEK 293 exprimant ces deux enzymes. De ce fait, le PA nouvellement formé par la PLD2 est rapidement dégradé par LPP3 (Sciorra and Morris 1999).

D'autres résultats obtenus au laboratoire montrent également un rôle de l'axe S1P/SphK1 dans la survie des cellules ELT3. En effet, dans les cellules ELT3, ET-1 exerce un effet anti-apoptotique via l'activation de la sphingosine kinase 1 (SphK1) et la synthèse de la S1P, effet que l'on n'observe pas dans les cellules de myomètre sain (Raymond, Bole-Feysot et al. 2006). Récemment, l'équipe de N. Pyne a montré que la LPP3 co-localise avec la SphK1 dans des cellules HEK 293 transfectées favorisant ainsi la dégradation de la S1P nouvellement formée par la LPP3 (Long, Darroch et al. 2005). Dans les cellules de myomètre qui expriment naturellement la LPP3, on peut supposer que la LPP3 pourrait réduire le taux de la S1P formée en réponse à l'ET-1. De plus, il a été montré que la SphK1 possède un domaine d'interaction avec le PA, ainsi la stimulation de la PLD1 qui augmente la quantité de PA peut induire la translocation de la SphK1 à la membrane (Long, Darroch et al. 2005). Par conséquent, dans les cellules de myomètre, la LPP3 pourrait avoir un double effet conduisant à une atténuation du pouvoir prolifératif de l'ET-1 et à la suppression de son effet anti-apoptotique, comme illustré dans le schéma 27 ci-dessous.

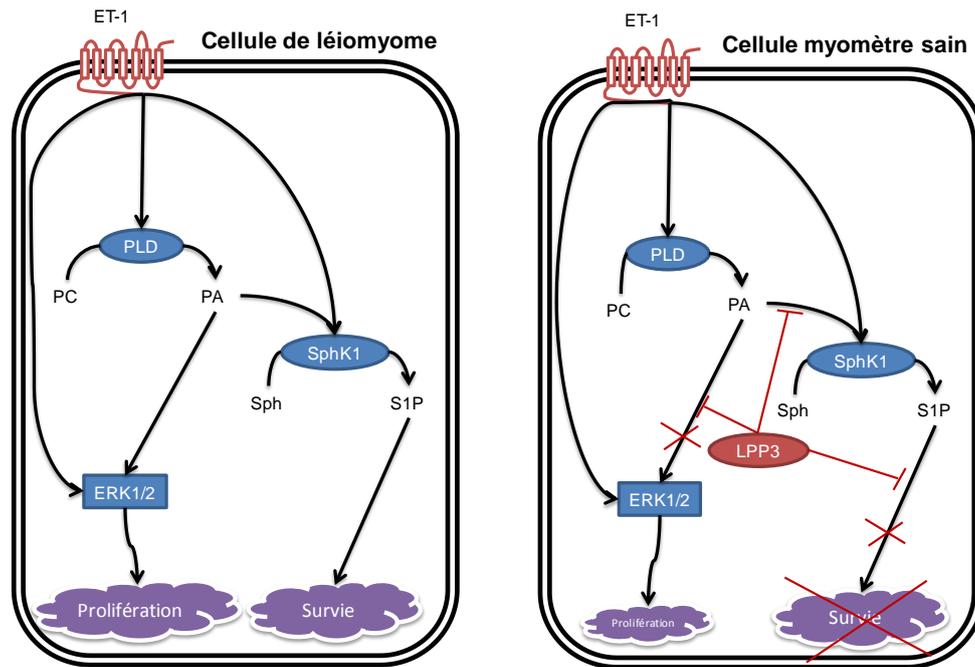


Schéma 27. Impact de la down-régulation de LPP3 sur la prolifération et la survie des cellules de léiomyomes en réponse à l'ET-1 : rôle du PA et de la S1P

En effet, le premier effet serait de dégrader le PA formé par la PLD1 activée par l'ET-1. La concentration du PA serait alors trop faible pour participer à l'activation des MAP kinases ERK. Ceci réduirait également l'activation de la SphK1 et donc la formation de la S1P (facteur de survie dans les cellules ELT3). Le second effet de la LPP3 serait de dégrader la S1P formée par la SphK1. Ce deuxième effet amplifierait l'action du premier sur l'axe SphK1/S1P et supprimerait ainsi l'effet anti-apoptotique de l'ET-1. L'absence de ces deux effets de la LPP3 dans les cellules ELT3 conduirait à l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la survie, phénomènes participant activement au développement de la tumeur.

Précédemment, il a été mis en évidence que le LPA pouvait induire l'activation d'un récepteur nucléaire le peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ). PPAR γ est une protéine qui lorsqu'elle est activée induit, via l'interaction avec le Rétinoïde X Récepteur, la transcription de certains gènes impliqués dans différents effets cellulaires comme la différenciation cellulaire (Mueller, Sarraf et al. 1998), l'apoptose (Elstner, Muller et al. 1998) et l'inflammation (Ricote and Glass 2007). L'effet du LPA sur un récepteur nucléaire est toutefois controversé, notamment parce qu'il est admis que le LPA intracellulaire intervient uniquement dans la synthèse de

novo des glycérolipides, et de ce fait il est incapable de participer à la signalisation cellulaire (Aoki 2004). Cependant, quelques études montrent malgré tout que le LPA semble être capable de se fixer sur le PPAR γ . L'équipe de Prestwich fut la première à montrer que le PPAR γ pouvait être un récepteur nucléaire du LPA (McIntyre, Pontsler et al. 2003). Une autre étude confirmant ces données a été effectuée dans un modèle *in vitro*, et elle a montré que le LPA était capable de déplacer la liaison d'un agoniste spécifique du PPAR γ . En effet le rosiglitazone, un agoniste très spécifique du PPAR γ , voit sa liaison diminuer de plus de 50% en présence d'un analogue du LPA (Tsukahara, Tsukahara et al. 2006). De manière intéressante, une étude publiée récemment suggère que le PA intracellulaire aurait un effet inhibiteur sur le PPAR γ . En effet, la surexpression d'une LPAAT, une enzyme qui transforme le LPA en PA, entraîne une forte diminution de l'activation du PPAR γ en réponse à la troglitazone, un activateur spécifique de PPAR γ (Stapleton, Mashek et al. 2011). Par ailleurs, il a été montré que l'activation de PPAR γ par la troglitazone inhibe la prolifération des léiomyomes utérins (Houston, Copland et al. 2003). Dans ce contexte, le PA produit par la PLD en réponse à l'ET-1 pourrait inhiber le récepteur ce qui favoriserait la prolifération cellulaire. En revanche, dans les cellules de myomètre sain, la dégradation du PA par la LPP3 réduirait l'effet inhibiteur de l'ET-1 sur le PPAR γ , diminuant ainsi l'effet prolifératif de l'ET-1.

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois, le rôle potentiel des LPP dans le maintien du phénotype normal des cellules musculaires lisses utérines. Cette étude met en lumière le rôle fondamental des médiateurs lipidiques dans les voies de signalisation intervenant dans les différents mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, S. I., J. Thompson, J. M. Coulson and P. J. Woll (2000). "Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium." *Am J Respir Cell Mol Biol* 22(4): 422-431.
- Akao, Y., Y. Banno, Y. Nakagawa, N. Hasegawa, T. J. Kim, T. Murate, Y. Igarashi and Y. Nozawa (2006). "High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation." *Biochem Biophys Res Commun* 342(4): 1284-1290.
- An, S., T. Bleu, O. G. Hallmark and E. J. Goetzl (1998). "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid." *J Biol Chem* 273(14): 7906-7910.
- Aoki, J. (2004). "Mechanisms of lysophosphatidic acid production." *Semin Cell Dev Biol* 15(5): 477-489.
- Arai, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo and S. Nakanishi (1990). "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." *Nature* 348(6303): 730-732.
- Asham, E., A. Shankar, M. Loizidou, S. Fredericks, K. Miller, P. B. Boulous, G. Burnstock and I. Taylor (2001). "Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism." *Br J Cancer* 85(11): 1759-1763.
- Bagnato, A. and L. Rosano (2008). "The endothelin axis in cancer." *Int J Biochem Cell Biol* 40(8): 1443-1451.
- Balboa, M. A., J. Balsinde, D. A. Dillon, G. M. Carman and E. A. Dennis (1999). "Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate." *J Biol Chem* 274(1): 522-526.
- Balsinde, J., M. A. Balboa and E. A. Dennis (2000). "Group IV cytosolic phospholipase A2 activation by diacylglycerol pyrophosphate in murine P388D1 macrophages." *Ann N Y Acad Sci* 905: 11-15.
- Bandoh, K., J. Aoki, H. Hosono, S. Kobayashi, T. Kobayashi, K. Murakami-Murofushi, M. Tsujimoto, H. Arai and K. Inoue (1999). "Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid." *J Biol Chem* 274(39): 27776-27785.
- Bar-Sagi, D. (2001). "A Ras by any other name." *Mol Cell Biol* 21(5): 1441-1443.
- Barbarisi, A., O. Petillo, A. Di Lieto, M. A. Melone, S. Margarucci, M. Cannas and G. Peluso (2001). "17-beta estradiol elicits an autocrine leiomyoma cell proliferation: evidence for a stimulation of protein kinase-dependent pathway." *J Cell Physiol* 186(3): 414-424.
- Berkey, R., D. Bendigeri and S. Xiao (2012). "Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond." *Front Plant Sci* 3: 68.
- Billich, A., F. Bornancin, P. Devay, D. Mechtcheriakova, N. Urtz and T. Baumruker (2003). "Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases." *J Biol Chem* 278(48): 47408-47415.
- Billon-Denis, E. (2008). Rôle de l'acide lysophosphatidique et des médiateurs lipidiques dans la prolifération des cellules de léiomyomes utérins de rates. Orsay, Université Paris Sud. Ph. D: 127.
- Billon-Denis, E., Z. Tanfin and P. Robin (2008). "Role of lysophosphatidic acid in the regulation of uterine leiomyoma cell proliferation by phospholipase D and autotaxin." *J Lipid Res* 49(2): 295-307.
- Blaho, V. A. and T. Hla (2011). "Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors." *Chem Rev* 111(10): 6299-6320.
- Blake, R. E. (2007). "Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth." *J Natl Med Assoc* 99(10): 1170-1184.
- Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker and M. P. Wymann (1998). "Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK." *Science* 282(5387): 293-296.

- Boucharaba, A., C. M. Serre, J. Guglielmi, J. C. Bordet, P. Clezardin and O. Peyruchaud (2006). "The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases." Proc Natl Acad Sci U S A 103(25): 9643-9648.
- Breuille, M., B. Rouot, M. J. Leroy, P. Blot, L. Kaplan and F. Ferre (1987). "Adrenergic receptors in inner and outer layers of human myometrium near term: characterization of beta-adrenergic receptor sites by [125I]-iodocyanopindolol binding." Gynecol Obstet Invest 24(1): 28-37.
- Brindley, D. N., D. English, C. Pilquil, K. Buri and Z. C. Ling (2002). "Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids." Biochim Biophys Acta 1582(1-3): 33-44.
- Brindley, D. N. and D. W. Waggoner (1998). "Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases." J Biol Chem 273(38): 24281-24284.
- Budnik, L. T. and A. K. Mukhopadhyay (2002). "Lysophosphatidic acid and its role in reproduction." Biol Reprod 66(4): 859-865.
- Burke, J. E. and E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling." J Lipid Res 50 Suppl: S237-242.
- Burnett, C., P. Makridou, L. Hewlett and K. Howard (2004). "Lipid phosphate phosphatases dimerise, but this interaction is not required for in vivo activity." BMC Biochem 5: 2.
- Butterwith, S. C., R. Hopewell and D. N. Brindley (1984). "Partial purification and characterization of the soluble phosphatidate phosphohydrolase of rat liver." Biochem J 220(3): 825-833.
- Cai, J., H. Abramovici, S. H. Gee and M. K. Topham (2009). "Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid." Biochim Biophys Acta 1791(9): 942-948.
- Calixto, J. B. and G. A. Rae (1991). "Effects of endothelins, Bay K 8644 and other oxytocics in non-pregnant and late pregnant rat isolated uterus." Eur J Pharmacol 192(1): 109-116.
- Cameron, I. T., C. R. Bacon, G. P. Collett and A. P. Davenport (1995). "Endothelin expression in the uterus." J Steroid Biochem Mol Biol 53(1-6): 209-214.
- Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb and E. J. Goldsmith (1997). "Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation." Cell 90(5): 859-869.
- Cao, J., M. Yosida, T. Kitazawa and T. Taneike (2005). "Uterine region-dependent differences in responsiveness to prostaglandins in the non-pregnant porcine myometrium." Prostaglandins Other Lipid Mediat 75(1-4): 105-122.
- Chatterjee, I., J. O. Humtsoe, E. E. Kohler, C. Sorio and K. K. Wary (2011). "Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via beta-catenin and CYCLIN-D1 signaling." Mol Cancer 10: 51.
- Chen, R. H., C. Sarnecki and J. Blenis (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." Mol Cell Biol 12(3): 915-927.
- Choi, W. S., T. Hiragun, J. H. Lee, Y. M. Kim, H. P. Kim, A. Chahdi, E. Her, J. W. Han and M. A. Beaven (2004). "Activation of RBL-2H3 mast cells is dependent on tyrosine phosphorylation of phospholipase D2 by Fyn and Fgr." Mol Cell Biol 24(16): 6980-6992.
- Chow, E. H. and J. M. Marshall (1981). "Effects of catecholamines on circular and longitudinal uterine muscle of the rat." Eur J Pharmacol 76(2-3): 157-165.
- Clouthier, D. E., K. Hosoda, J. A. Richardson, S. C. Williams, H. Yanagisawa, T. Kuwaki, M. Kumada, R. E. Hammer and M. Yanagisawa (1998). "Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice." Development 125(5): 813-824.
- Coleman, R. A. and D. P. Lee (2004). "Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation." Prog Lipid Res 43(2): 134-176.
- Colley, W. C., T. C. Sung, R. Roll, J. Jenco, S. M. Hammond, Y. Altshuler, D. Bar-Sagi, A. J. Morris and M. A. Frohman (1997). "Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization." Curr Biol 7(3): 191-201.
- Crabtree, J. S., S. A. Jelinsky, H. A. Harris, S. E. Choe, M. M. Cotreau, M. L. Kimberland, E. Wilson, K. A. Saraf, W. Liu, A. S. McCampbell, B. Dave, R. R. Broaddus, E. L. Brown, W. Kao, J. S. Skotnicki, M. Abou-Gharbia, R. C. Winneker and C. L. Walker (2009). "Comparison of

- human and rat uterine leiomyomata: identification of a dysregulated mammalian target of rapamycin pathway." Cancer Res 69(15): 6171-6178.
- Cunningham, M. R., K. A. McIntosh, J. D. Padiani, J. Robben, A. E. Cooke, M. Nilsson, G. W. Gould, S. Mundell, G. Milligan and R. Plevin (2012). "Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4)." J Biol Chem 287(20): 16656-16669.
- Cussac, D., A. Newman-Tancredi, V. Pasteau and M. J. Millan (1999). "Human dopamine D(3) receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation via a phosphatidylinositol 3-kinase and an atypical protein kinase C-dependent mechanism." Mol Pharmacol 56(5): 1025-1030.
- Dallenbach, F. D. and J. A. Thomas (1982). "Experimentally induced myofibroblastic neoplasia in guineapigs." Indian J Med Res 76: 272-280.
- Dawson, R. M. (1954). "The measurement of ³²P labelling of individual kephalins and lecithin in a small sample of tissue." Biochim Biophys Acta 14(3): 374-379.
- de Nucci, G., R. Thomas, P. D'Orleans-Juste, E. Antunes, C. Walder, T. D. Warner and J. R. Vane (1988). "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." Proc Natl Acad Sci U S A 85(24): 9797-9800.
- Di, X., L. Yu, A. B. Moore, L. Castro, X. Zheng, T. Hermon and D. Dixon (2008). "A low concentration of genistein induces estrogen receptor-alpha and insulin-like growth factor-I receptor interactions and proliferation in uterine leiomyoma cells." Hum Reprod 23(8): 1873-1883.
- Divakar, H. (2008). "Asymptomatic uterine fibroids." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 22(4): 643-654.
- Donkor, J., M. Sariahmetoglu, J. Dewald, D. N. Brindley and K. Reue (2007). "Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns." J Biol Chem 282(6): 3450-3457.
- Downward, J., J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter and D. A. Cantrell (1990). "Stimulation of p21ras upon T-cell activation." Nature 346(6286): 719-723.
- Eberle, J., L. F. Fecker, C. E. Orfanos and C. C. Geilen (2002). "Endothelin-1 decreases basic apoptotic rates in human melanoma cell lines." J Invest Dermatol 119(3): 549-555.
- Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn and J. C. Stone (1998). "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." Science 280(5366): 1082-1086.
- Eguchi, S., K. Numaguchi, H. Iwasaki, T. Matsumoto, T. Yamakawa, H. Utsunomiya, E. D. Motley, H. Kawakatsu, K. M. Owada, Y. Hirata, F. Marumo and T. Inagami (1998). "Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem 273(15): 8890-8896.
- Elshourbagy, N. A., J. A. Lee, D. R. Korman, P. Nuthalaganti, D. R. Sylvester, A. G. Dilella, J. A. Sutiphong and C. S. Kumar (1992). "Molecular cloning and characterization of the major endothelin receptor subtype in porcine cerebellum." Mol Pharmacol 41(3): 465-473.
- Elstner, E., C. Muller, K. Koshizuka, E. A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J. W. Said, D. Heber and H. P. Koeffler (1998). "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice." Proc Natl Acad Sci U S A 95(15): 8806-8811.
- Emori, T., Y. Hirata, T. Imai, K. Ohta, K. Kanno, S. Eguchi and F. Marumo (1992). "Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell." Biochem Pharmacol 44(12): 2409-2411.
- Eto, M., J. Bennouna, O. C. Hunter, M. T. Lotze and A. A. Amoscato (2006). "Importance of C16 ceramide accumulation during apoptosis in prostate cancer cells." Int J Urol 13(2): 148-156.
- Evans, N. J. and J. W. Walker (2008). "Endothelin receptor dimers evaluated by FRET, ligand binding, and calcium mobilization." Biophys J 95(1): 483-492.

- Everitt, J. I., D. C. Wolf, S. R. Howe, T. L. Goldsworthy and C. Walker (1995). "Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Clinical and pathological features." *Am J Pathol* 146(6): 1556-1567.
- Fang, X., M. Schummer, M. Mao, S. Yu, F. H. Tabassam, R. Swaby, Y. Hasegawa, J. L. Tanyi, R. LaPushin, A. Eder, R. Jaffe, J. Erickson and G. B. Mills (2002). "Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer." *Biochim Biophys Acta* 1582(1-3): 257-264.
- Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan and J. Chen (2001). "Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling." *Science* 294(5548): 1942-1945.
- Farnsworth, C. L., N. W. Freshney, L. B. Rosen, A. Ghosh, M. E. Greenberg and L. A. Feig (1995). "Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF." *Nature* 376(6540): 524-527.
- Fennessy, F. M., C. M. Tempany, N. J. McDannold, M. J. So, G. Hesley, B. Gostout, H. S. Kim, G. A. Holland, D. A. Sarti, K. Hynynen, F. A. Jolesz and E. A. Stewart (2007). "Uterine leiomyomas: MR imaging-guided focused ultrasound surgery--results of different treatment protocols." *Radiology* 243(3): 885-893.
- Ferry, G., N. Moulharat, J. P. Pradere, P. Desos, A. Try, A. Genton, A. Giganti, M. Beucher-Gaudin, M. Lonchamp, M. Bertrand, J. S. Saulnier-Blache, G. C. Tucker, A. Cordi and J. A. Boutin (2008). "S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool." *J Pharmacol Exp Ther* 327(3): 809-819.
- Finck, B. N., M. C. Gropler, Z. Chen, T. C. Leone, M. A. Croce, T. E. Harris, J. C. Lawrence, Jr. and D. P. Kelly (2006). "Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway." *Cell Metab* 4(3): 199-210.
- Fischer, D. J., N. Nusser, T. Virag, K. Yokoyama, D. Wang, D. L. Baker, D. Bautista, A. L. Parrill and G. Tigyi (2001). "Short-chain phosphatidates are subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors." *Mol Pharmacol* 60(4): 776-784.
- Fleming, I. N. and S. J. Yeaman (1995). "Purification and characterization of N-ethylmaleimide-insensitive phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP2) from rat liver." *Biochem J* 308 (Pt 3): 983-989.
- Fourcade, O., M. F. Simon, C. Viode, N. Rugani, F. Leballe, A. Ragab, B. Fournie, L. Sarda and H. Chap (1995). "Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells." *Cell* 80(6): 919-927.
- Freedman, N. J., A. S. Ament, M. Oppermann, R. H. Stoffel, S. T. Exum and R. J. Lefkowitz (1997). "Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity." *J Biol Chem* 272(28): 17734-17743.
- Furnesen, J. M. and G. M. Carman (2000). "Enzymological properties of the LPP1-encoded lipid phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1484(1): 71-82.
- Ghosh, S., J. C. Strum, V. A. Sciorra, L. Daniel and R. M. Bell (1996). "Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* 271(14): 8472-8480.
- Giganti, A., M. Rodriguez, B. Fould, N. Moulharat, F. Coge, P. Chomarat, J. P. Galizzi, P. Valet, J. S. Saulnier-Blache, J. A. Boutin and G. Ferry (2008). "Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization." *J Biol Chem* 283(12): 7776-7789.
- Gupte, R., R. Patil, J. Liu, Y. Wang, S. C. Lee, Y. Fujiwara, J. Fells, A. L. Bolen, K. Emmons-Thompson, C. R. Yates, A. Siddam, N. Panupinthu, T. C. Pham, D. L. Baker, A. L. Parrill, G. B. Mills, G. Tigyi and D. D. Miller (2011). "Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity." *ChemMedChem* 6(5): 922-935.
- Han, G. S., L. O'Hara, G. M. Carman and S. Siniosoglou (2008). "An unconventional diacylglycerol kinase that regulates phospholipid synthesis and nuclear membrane growth." *J Biol Chem* 283(29): 20433-20442.

- Han, G. S., S. Siniossoglou and G. M. Carman (2007). "The cellular functions of the yeast lipin homolog PAH1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity." J Biol Chem 282(51): 37026-37035.
- Harris, T. E. and B. N. Finck (2011). "Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism." Trends Endocrinol Metab 22(6): 226-233.
- Hausmann, J., S. Kamtekar, E. Christodoulou, J. E. Day, T. Wu, Z. Fulkerson, H. M. Albers, L. A. van Meeteren, A. J. Houben, L. van Zeijl, S. Jansen, M. Andries, T. Hall, L. E. Pegg, T. E. Benson, M. Kasiem, K. Harlos, C. W. Kooi, S. S. Smyth, H. Ovaa, M. Bollen, A. J. Morris, W. H. Moolenaar and A. Perrakis (2011). "Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin." Nat Struct Mol Biol 18(2): 198-204.
- Hawes, B. E., L. M. Luttrell, T. van Biesen and R. J. Lefkowitz (1996). "Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway." J Biol Chem 271(21): 12133-12136.
- Hecht, J. H., J. A. Weiner, S. R. Post and J. Chun (1996). "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex." J Cell Biol 135(4): 1071-1083.
- Hickey, K. A., G. Rubanyi, R. J. Paul and R. F. Highsmith (1985). "Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells." Am J Physiol 248(5 Pt 1): C550-556.
- Hiramatsu, T., H. Sonoda, Y. Takanezawa, R. Morikawa, M. Ishida, K. Kasahara, Y. Sanai, R. Taguchi, J. Aoki and H. Arai (2003). "Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta." J Biol Chem 278(49): 49438-49447.
- Hogberg, C., O. Gidlof, F. Deflorian, K. A. Jacobson, A. Abdelrahman, C. E. Muller, B. Olde and D. Erlinge (2012). "Farnesyl pyrophosphate is an endogenous antagonist to ADP-stimulated P2Y(1)(2) receptor-mediated platelet aggregation." Thromb Haemost 108(1): 119-132.
- Houston, K. D., J. A. Copland, R. R. Broaddus, M. M. Gottardis, S. M. Fischer and C. L. Walker (2003). "Inhibition of proliferation and estrogen receptor signaling by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in uterine leiomyoma." Cancer Res 63(6): 1221-1227.
- Howe, S. R., J. I. Everitt, M. M. Gottardis and C. Walker (1995). "Estrogen/antiestrogen responsiveness in an in vivo/in vitro model for myometrial tumorigenesis." Ann N Y Acad Sci 761: 373-375.
- Hu, Q., A. Klippel, A. J. Muslin, W. J. Fantl and L. T. Williams (1995). "Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase." Science 268(5207): 100-102.
- Humtsoe, J. O., R. A. Bowling, Jr., S. Feng and K. K. Wary (2005). "Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand." Biochem Biophys Res Commun 335(3): 906-919.
- Humtsoe, J. O., S. Feng, G. D. Thakker, J. Yang, J. Hong and K. K. Wary (2003). "Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP." EMBO J 22(7): 1539-1554.
- Igarashi, N., T. Okada, S. Hayashi, T. Fujita, S. Jahangeer and S. Nakamura (2003). "Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis." J Biol Chem 278(47): 46832-46839.
- Imai, A., T. Furui, T. Tamaya and G. B. Mills (2000). "A gonadotropin-releasing hormone-responsive phosphatase hydrolyses lysophosphatidic acid within the plasma membrane of ovarian cancer cells." J Clin Endocrinol Metab 85(9): 3370-3375.
- Inagaki, Y., P. Y. Li, A. Wada, S. Mitsutake and Y. Igarashi (2003). "Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1." Biochem Biophys Res Commun 311(1): 168-173.

- Inoue, A., N. Arima, J. Ishiguro, G. D. Prestwich, H. Arai and J. Aoki (2011). "LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling." EMBO J 30(20): 4248-4260.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto and T. Masaki (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A 86(8): 2863-2867.
- Ishikawa, H., K. Ishi, V. A. Serna, R. Kakazu, S. E. Bulun and T. Kurita (2010). "Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma." Endocrinology 151(6): 2433-2442.
- Jang, J. H., C. S. Lee, D. Hwang and S. H. Ryu (2012). "Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners." Prog Lipid Res 51(2): 71-81.
- Jasinska, R., Q. X. Zhang, C. Pilquill, I. Singh, J. Xu, J. Dewald, D. A. Dillon, L. G. Berthiaume, G. M. Carman, D. W. Waggoner and D. N. Brindley (1999). "Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters." Biochem J 340 (Pt 3): 677-686.
- Jia, Y. J., M. Kai, I. Wada, F. Sakane and H. Kanoh (2003). "Differential localization of lipid phosphate phosphatases 1 and 3 to cell surface subdomains in polarized MDCK cells." FEBS Lett 552(2-3): 240-246.
- Kai, M., F. Sakane, Y. J. Jia, S. Imai, S. Yasuda and H. Kanoh (2006). "Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts." J Biochem 140(5): 677-686.
- Kaminska, K., M. Wasielek, I. Bogacka, M. Blitek and M. Bogacki (2008). "Quantitative expression of lysophosphatidic acid receptor 3 gene in porcine endometrium during the periimplantation period and estrous cycle." Prostaglandins Other Lipid Mediat 85(1-2): 26-32.
- Kanoh, H., S. Imai, K. Yamada and F. Sakane (1992). "Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from porcine thymus membranes." J Biol Chem 267(35): 25309-25314.
- Kawanabe, Y., N. Hashimoto and T. Masaki (2004). "Effects of phosphoinositide 3-kinase on endothelin-1-induced activation of voltage-independent Ca²⁺ channels and vasoconstriction." Biochem Pharmacol 68(2): 215-221.
- Kennedy, E. P. (1953). "Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria." J Biol Chem 201(1): 399-412.
- Kimura, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinmi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto and T. Masaki (1988). "Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety." Biochem Biophys Res Commun 156(3): 1182-1186.
- Kimura, T., T. Watanabe, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, K. Tamama, A. Kuwabara, T. Kanda, I. Kobayashi, H. Ohta, M. Ui and F. Okajima (2000). "Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3." Biochem J 348 Pt 1: 71-76.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia and M. S. Marshall (1998). "The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338." Nature 396(6707): 180-183.
- Kisanuki, Y. Y., N. Emoto, T. Ohuchi, B. Widiantoro, K. Yagi, K. Nakayama, R. M. Kedzierski, R. E. Hammer, H. Yanagisawa, S. C. Williams, J. A. Richardson, T. Suzuki and M. Yanagisawa (2010). "Low blood pressure in endothelial cell-specific endothelin 1 knockout mice." Hypertension 56(1): 121-128.
- Kloog, Y. and M. Sokolovsky (1989). "Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins." Trends Pharmacol Sci 10(6): 212-214.
- Kobayashi, T., Y. Hirayama, E. Kobayashi, Y. Kubo and O. Hino (1995). "A germline insertion in the tuberous sclerosis (Tsc2) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer." Nat Genet 9(1): 70-74.
- Koh, Y. K., M. Y. Lee, J. W. Kim, M. Kim, J. S. Moon, Y. J. Lee, Y. H. Ahn and K. S. Kim (2008). "Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network

- with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2." *J Biol Chem* 283(50): 34896-34906.
- Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marme and U. R. Rapp (1993). "Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation." *Nature* 364(6434): 249-252.
- Kolesnikov, Y. S., K. P. Nokhrina, S. V. Kretynin, I. D. Volotovski, J. Martinec, G. A. Romanov and V. S. Kravets (2012). "Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells." *Biochemistry (Mosc)* 77(1): 1-14.
- Kornberg, A. and W. E. Pricer, Jr. (1953). "Enzymatic esterification of alpha-glycerophosphate by long chain fatty acids." *J Biol Chem* 204(1): 345-357.
- Kotarsky, K., A. Boketoft, J. Bristulf, N. E. Nilsson, A. Norberg, S. Hansson, C. Owman, R. Sillard, L. M. Leeb-Lundberg and B. Olde (2006). "Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes." *J Pharmacol Exp Ther* 318(2): 619-628.
- Kraft, C. A., J. L. Garrido, E. Fluharty, L. Leiva-Vega and G. Romero (2008). "Role of phosphatidic acid in the coupling of the ERK cascade." *J Biol Chem* 283(52): 36636-36645.
- Kranenburg, O. and W. H. Moolenaar (2001). "Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists." *Oncogene* 20(13): 1540-1546.
- Krinke, O., M. Flemr, C. Vergnolle, S. Collin, J. P. Renou, L. Taconnat, A. Yu, L. Burketova, O. Valentova, A. Zachowski and E. Ruelland (2009). "Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis cell suspensions." *Plant Physiol* 150(1): 424-436.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2012). "Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update." *Physiol Rev* 92(2): 689-737.
- Lambeau, G. and M. H. Gelb (2008). "Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2." *Annu Rev Biochem* 77: 495-520.
- LaMontagne, K., A. Littlewood-Evans, C. Schnell, T. O'Reilly, L. Wyder, T. Sanchez, B. Probst, J. Butler, A. Wood, G. Liau, E. Billy, A. Theuer, T. Hla and J. Wood (2006). "Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization." *Cancer Res* 66(1): 221-231.
- Lee, C. W., R. Rivera, S. Gardell, A. E. Dubin and J. Chun (2006). "GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5." *J Biol Chem* 281(33): 23589-23597.
- Lee, M., S. Choi, G. Hallden, S. J. Yo, D. Schichnes and G. W. Aponte (2009). "P2Y5 is a G(alpha)i, G(alpha)12/13 G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297(4): G641-654.
- Leiber, D., Y. Banno and Z. Tanfin (2007). "Exogenous sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase activated by endothelin-1 induced myometrial contraction through differential mechanisms." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C240-250.
- Lenormand, P., C. Sardet, G. Pages, G. L'Allemain, A. Brunet and J. Pouyssegur (1993). "Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts." *J Cell Biol* 122(5): 1079-1088.
- Li, G., F. Lin and H. W. Xue (2007). "Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD beta 1 in seed germination." *Cell Res* 17(10): 881-894.
- Ligon, A. H. and C. C. Morton (2000). "Genetics of uterine leiomyomata." *Genes Chromosomes Cancer* 28(3): 235-245.
- Liliom, K., T. Tsukahara, R. Tsukahara, M. Zelman-Femiak, E. Swiezewska and G. Tigyi (2006). "Farnesyl phosphates are endogenous ligands of lysophosphatidic acid receptors: inhibition of LPA GPCR and activation of PPARs." *Biochim Biophys Acta* 1761(12): 1506-1514.

- Lin, Y. P. and G. M. Carman (1989). "Purification and characterization of phosphatidate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 264(15): 8641-8645.
- Liscovitch, M., M. Czarny, G. Fiucci and X. Tang (2000). "Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family." *Biochem J* 345 Pt 3: 401-415.
- Liszewska, E., P. Reinaud, E. Billon-Denis, O. Dubois, P. Robin and G. Charpigny (2009). "Lysophosphatidic acid signaling during embryo development in sheep: involvement in prostaglandin synthesis." *Endocrinology* 150(1): 422-434.
- Liszewska, E., P. Reinaud, O. Dubois and G. Charpigny (2012). "Lysophosphatidic acid receptors in ovine uterus during estrous cycle and early pregnancy and their regulation by progesterone." *Domest Anim Endocrinol* 42(1): 31-42.
- Long, J., P. Darroch, K. F. Wan, K. C. Kong, N. Ktistakis, N. J. Pyne and S. Pyne (2005). "Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools." *Biochem J* 391(Pt 1): 25-32.
- Long, J. S., J. Edwards, C. Watson, S. Tovey, K. M. Mair, R. Schiff, V. Natarajan, N. J. Pyne and S. Pyne (2010). "Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells." *Mol Cell Biol* 30(15): 3827-3841.
- Long, J. S., N. J. Pyne and S. Pyne (2008). "Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function." *Biochem J* 411(2): 371-377.
- Lopez-Illasaca, M., P. Crespo, P. G. Pellici, J. S. Gutkind and R. Wetzker (1997). "Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma." *Science* 275(5298): 394-397.
- Lynch, D. V., M. Chen and E. B. Cahoon (2009). "Lipid signaling in Arabidopsis: no sphingosine? No problem!" *Trends Plant Sci* 14(9): 463-466.
- Maceyka, M., H. Sankala, N. C. Hait, H. Le Stunff, H. Liu, R. Toman, C. Collier, M. Zhang, L. S. Satin, A. H. Merrill, Jr., S. Milstien and S. Spiegel (2005). "SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism." *J Biol Chem* 280(44): 37118-37129.
- Marais, R., Y. Light, C. Mason, H. Paterson, M. F. Olson and C. J. Marshall (1998). "Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C." *Science* 280(5360): 109-112.
- Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." *Neuron* 27(1): 97-106.
- Marinetti, G. V. and E. Stotz (1956). "Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper." *Biochim Biophys Acta* 21(1): 168-170.
- Marsden, P. A. and B. M. Brenner (1992). "Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha." *Am J Physiol* 262(4 Pt 1): C854-861.
- Marshall, L. M., D. Spiegelman, M. B. Goldman, J. E. Manson, G. A. Colditz, R. L. Barbieri, M. J. Stampfer and D. J. Hunter (1998). "A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata." *Fertil Steril* 70(3): 432-439.
- Martin, A., A. Gomez-Munoz, D. W. Waggoner, J. C. Stone and D. N. Brindley (1993). "Decreased activities of phosphatidate phosphohydrolase and phospholipase D in ras and tyrosine kinase (fps) transformed fibroblasts." *J Biol Chem* 268(32): 23924-23932.
- Martin, A., P. Hales and D. N. Brindley (1987). "A rapid assay for measuring the activity and the Mg²⁺ and Ca²⁺ requirements of phosphatidate phosphohydrolase in cytosolic and microsomal fractions of rat liver." *Biochem J* 245(2): 347-355.
- Maruo, T., N. Ohara, J. Wang and H. Matsuo (2004). "Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis." *Hum Reprod Update* 10(3): 207-220.

- McIntyre, T. M., A. V. Pontsler, A. R. Silva, A. St Hilaire, Y. Xu, J. C. Hinshaw, G. A. Zimmerman, K. Hama, J. Aoki, H. Arai and G. D. Prestwich (2003). "Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR γ agonist." Proc Natl Acad Sci U S A 100(1): 131-136.
- McKay, M. M. and D. K. Morrison (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." Oncogene 26(22): 3113-3121.
- Mills, G. B. and W. H. Moolenaar (2003). "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer." Nat Rev Cancer 3(8): 582-591.
- Monick, M. M., A. B. Carter, D. M. Flaherty, M. W. Peterson and G. W. Hunninghake (2000). "Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages." J Immunol 165(8): 4632-4639.
- Morisseau, C., N. H. Schebb, H. Dong, A. Ulu, P. A. Aronov and B. D. Hammock (2012). "Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids." Biochem Biophys Res Commun 419(4): 796-800.
- Morris, K. E., L. M. Schang and D. N. Brindley (2006). "Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts." J Biol Chem 281(14): 9297-9306.
- Mueller, E., P. Sarraf, P. Tontonoz, R. M. Evans, K. J. Martin, M. Zhang, C. Fletcher, S. Singer and B. M. Spiegelman (1998). "Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma." Mol Cell 1(3): 465-470.
- Murakami, M., A. Shiraishi, K. Tabata and N. Fujita (2008). "Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun 371(4): 707-712.
- Murakami, M., Y. Taketomi, H. Sato and K. Yamamoto (2011). "Secreted phospholipase A2 revisited." J Biochem 150(3): 233-255.
- Murph, M. and G. B. Mills (2007). "Targeting the lipids LPA and S1P and their signalling pathways to inhibit tumour progression." Expert Rev Mol Med 9(28): 1-18.
- Nam, S. W., T. Clair, Y. S. Kim, A. McMarlin, E. Schiffmann, L. A. Liotta and M. L. Stracke (2001). "Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor." Cancer Res 61(18): 6938-6944.
- Nanjundan, M. and F. Possmayer (2001). "Pulmonary lipid phosphate phosphohydrolase in plasma membrane signalling platforms." Biochem J 358(Pt 3): 637-646.
- Nelson, J., A. Bagnato, B. Battistini and P. Nisen (2003). "The endothelin axis: emerging role in cancer." Nat Rev Cancer 3(2): 110-116.
- Nelson, J. B. and M. A. Carducci (2000). "The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in prostate cancer." BJU Int 85 Suppl 2: 45-48.
- Nishimasu, H., S. Okudaira, K. Hama, E. Mihara, N. Dohmae, A. Inoue, R. Ishitani, J. Takagi, J. Aoki and O. Nureki (2011). "Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators." Nat Struct Mol Biol 18(2): 205-212.
- Noguchi, K., S. Ishii and T. Shimizu (2003). "Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family." J Biol Chem 278(28): 25600-25606.
- Noh, D. Y., S. J. Ahn, R. A. Lee, I. A. Park, J. H. Kim, P. G. Suh, S. H. Ryu, K. H. Lee and J. S. Han (2000). "Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues." Cancer Lett 161(2): 207-214.
- O'Brien, R. F., R. J. Robbins and I. F. McMurtry (1987). "Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance." J Cell Physiol 132(2): 263-270.
- Ohashi, Y., A. Oka, R. Rodrigues-Pousada, M. Possenti, I. Ruberti, G. Morelli and T. Aoyama (2003). "Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation." Science 300(5624): 1427-1430.
- Oka, S., R. Ota, M. Shima, A. Yamashita and T. Sugiura (2010). "GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun 395(2): 232-237.

- Okada, T., G. Ding, H. Sonoda, T. Kajimoto, Y. Haga, A. Khosrowbeygi, S. Gao, N. Miwa, S. Jahangeer and S. Nakamura (2005). "Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis." J Biol Chem 280(43): 36318-36325.
- Okudaira, S., H. Yukiura and J. Aoki (2010). "Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin." Biochimie 92(6): 698-706.
- Olive, D. L., S. R. Lindheim and E. A. Pritts (2004). "Non-surgical management of leiomyoma: impact on fertility." Curr Opin Obstet Gynecol 16(3): 239-243.
- Oliver, F. J., G. de la Rubia, E. P. Feener, M. E. Lee, M. R. Loeken, T. Shiba, T. Quertermous and G. L. King (1991). "Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells." J Biol Chem 266(34): 23251-23256.
- Olivera, A., T. Kohama, L. Edsall, V. Nava, O. Cuvillier, S. Poulton and S. Spiegel (1999). "Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival." J Cell Biol 147(3): 545-558.
- Paasche, J. D., T. Attramadal, C. Sandberg, H. K. Johansen and H. Attramadal (2001). "Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways." J Biol Chem 276(36): 34041-34050.
- Parker, W. H. (2007). "Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas." Fertil Steril 87(4): 725-736.
- Pasternack, S. M., I. von Kugelgen, K. Al Aboud, Y. A. Lee, F. Ruschendorf, K. Voss, A. M. Hillmer, G. J. Molderings, T. Franz, A. Ramirez, P. Nurnberg, M. M. Nothen and R. C. Betz (2008). "G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth." Nat Genet 40(3): 329-334.
- Paugh, S. W., B. S. Paugh, M. Rahmani, D. Kapitonov, J. A. Almenara, T. Kordula, S. Milstien, J. K. Adams, R. E. Zipkin, S. Grant and S. Spiegel (2008). "A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia." Blood 112(4): 1382-1391.
- Peng, H. J., K. M. Henkels, M. Mahankali, M. C. Dinauer and J. Gomez-Cambronero (2011). "Evidence for two CRIB domains in phospholipase D2 (PLD2) that the enzyme uses to specifically bind to the small GTPase Rac2." J Biol Chem 286(18): 16308-16320.
- Peterfy, M., J. Phan and K. Reue (2005). "Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis." J Biol Chem 280(38): 32883-32889.
- Peterfy, M., J. Phan, P. Xu and K. Reue (2001). "Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin." Nat Genet 27(1): 121-124.
- Pilquill, C., J. Dewald, A. Cherney, I. Gorshkova, G. Tigyi, D. English, V. Natarajan and D. N. Brindley (2006). "Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidate-induced fibroblast migration by controlling phospholipase D2-dependent phosphatidate generation." J Biol Chem 281(50): 38418-38429.
- Pitson, S. M., P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, P. Xia, M. A. Vadas and B. W. Wattenberg (2003). "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." EMBO J 22(20): 5491-5500.
- Pitson, S. M., P. A. Moretti, J. R. Zebol, R. Zareie, C. K. Derian, A. L. Darrow, J. Qi, R. J. D'Andrea, C. J. Bagley, M. A. Vadas and B. W. Wattenberg (2002). "The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1." J Biol Chem 277(51): 49545-49553.
- Ponting, C. P. and I. D. Kerr (1996). "A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues." Protein Sci 5(5): 914-922.
- Porter, K. B., J. C. Tsibris, S. V. Nicosia, J. M. Murphy, W. F. O'Brien, P. S. Rao and W. N. Spellacy (1995). "Estrogen-induced guinea pig model for uterine leiomyomas: do the ovaries protect?" Biol Reprod 52(4): 824-832.

- Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch and A. Ullrich (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." *Nature* 402(6764): 884-888.
- Pyne, S., K. C. Kong and P. I. Darroch (2004). "Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases." *Semin Cell Dev Biol* 15(5): 491-501.
- Pyne, S., J. S. Long, N. T. Ktistakis and N. J. Pyne (2005). "Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1370-1374.
- Rackow, B. W. and A. Arici (2006). "Options for medical treatment of myomas." *Obstet Gynecol Clin North Am* 33(1): 97-113.
- Raymond, M. N., C. Bole-Feysot, Y. Banno, Z. Tanfin and P. Robin (2006). "Endothelin-1 inhibits apoptosis through a sphingosine kinase 1-dependent mechanism in uterine leiomyoma ELT3 cells." *Endocrinology* 147(12): 5873-5882.
- Raymond, M. N., P. Robin, F. De Zen, G. Vilain and Z. Tanfin (2009). "Differential endothelin receptor expression and function in rat myometrial cells and leiomyoma ELT3 cells." *Endocrinology* 150(10): 4766-4776.
- Ricote, M. and C. K. Glass (2007). "PPARs and molecular mechanisms of transrepression." *Biochim Biophys Acta* 1771(8): 926-935.
- Roach, A. N., Z. Wang, P. Wu, F. Zhang, R. B. Chan, Y. Yonekubo, G. Di Paolo, A. A. Gorfe and G. Du (2012). "Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization." *J Lipid Res.*
- Roberts, R., V. A. Sciorra and A. J. Morris (1998). "Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform." *J Biol Chem* 273(34): 22059-22067.
- Robin, P., I. Boulven, C. Bole-Feysot, Z. Tanfin and D. Leiber (2004). "Contribution of PKC-dependent and -independent processes in temporal ERK regulation by ET-1, PDGF, and EGF in rat myometrial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4): C798-806.
- Robin, P., I. Boulven, C. Desmyter, S. Harbon and D. Leiber (2002). "ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(1): C251-260.
- Robin, P., S. Chouayekh, C. Bole-Feysot, D. Leiber and Z. Tanfin (2005). "Contribution of phospholipase D in endothelin-1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and proliferation in rat uterine leiomyoma cells." *Biol Reprod* 72(1): 69-77.
- Romagnolo, B., T. Molina, G. Leroy, C. Blin, A. Porteux, M. Thomasset, A. Vandewalle, A. Kahn and C. Perret (1996). "Estradiol-dependent uterine leiomyomas in transgenic mice." *J Clin Invest* 98(3): 777-784.
- Rosano, L., R. Cianfrocca, F. Spinella, V. Di Castro, P. G. Natali and A. Bagnato (2010). "Combination therapy of zibotentan with cisplatin and paclitaxel is an effective regimen for epithelial ovarian cancer." *Can J Physiol Pharmacol* 88(6): 676-681.
- Roskoski, R., Jr. (2012). "MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation." *Biochem Biophys Res Commun* 417(1): 5-10.
- Rozengurt, E. (2007). "Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors." *J Cell Physiol* 213(3): 589-602.
- Rusovici, R., A. Ghaleb, H. Shim, V. W. Yang and C. C. Yun (2007). "Lysophosphatidic acid prevents apoptosis of Caco-2 colon cancer cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of Bad." *Biochim Biophys Acta* 1770(8): 1194-1203.
- Sako, A., J. Kitayama, D. Shida, R. Suzuki, T. Sakai, H. Ohta and H. Nagawa (2006). "Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) by mesothelial cells and quantification of host-derived VEGF in malignant ascites." *J Surg Res* 130(1): 94-101.
- Salama, S. A., M. Kamel, G. Christman, H. Q. Wang, H. M. Fouad and A. Al-Hendy (2007). "Gene therapy of uterine leiomyoma: adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine

- kinase/ganciclovir treatment inhibits growth of human and rat leiomyoma cells in vitro and in a nude mouse model." *Gynecol Obstet Invest* 63(2): 61-70.
- Samadi, N., R. Bekele, D. Capatos, G. Venkatraman, M. Sariahmetoglu and D. N. Brindley (2011). "Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance." *Biochimie* 93(1): 61-70.
- Sang, Y., S. Zheng, W. Li, B. Huang and X. Wang (2001). "Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α ." *Plant J* 28(2): 135-144.
- Saulnier-Blache, J. S. (2004). "[Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]." *Med Sci (Paris)* 20(8-9): 799-803.
- Saunders, L. P., A. Ouellette, R. Bandle, W. C. Chang, H. Zhou, R. N. Misra, E. M. De La Cruz and D. T. Braddock (2008). "Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion." *Mol Cancer Ther* 7(10): 3352-3362.
- Schmid, G., M. Guba, I. Ischenko, A. Pappan, M. Joka, S. Schrepfer, C. J. Bruns, K. W. Jauch, C. Heeschen and C. Graeb (2007). "The immunosuppressant FTY720 inhibits tumor angiogenesis via the sphingosine 1-phosphate receptor 1." *J Cell Biochem* 101(1): 259-270.
- Sciorra, V. A. and A. J. Morris (1999). "Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells." *Mol Biol Cell* 10(11): 3863-3876.
- Selvy, P. E., R. R. Lavieri, C. W. Lindsley and H. A. Brown (2011). "Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation." *Chem Rev* 111(10): 6064-6119.
- Shen, Y., Y. Zheng and D. A. Foster (2002). "Phospholipase D2 stimulates cell protrusion in v-Src-transformed cells." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 201-206.
- Sigal, Y. J., M. I. McDermott and A. J. Morris (2005). "Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions." *Biochem J* 387(Pt 2): 281-293.
- Sliva, D., M. T. Rizzo and D. English (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator." *J Biol Chem* 277(5): 3150-3157.
- Smith, S. W., S. B. Weiss and E. P. Kennedy (1957). "The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids." *J Biol Chem* 228(2): 915-922.
- Smollich, M. and P. Wulfiging (2007). "The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies." *Curr Vasc Pharmacol* 5(3): 239-248.
- Sonoda, H., J. Aoki, T. Hiramatsu, M. Ishida, K. Bandoh, Y. Nagai, R. Taguchi, K. Inoue and H. Arai (2002). "A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid." *J Biol Chem* 277(37): 34254-34263.
- Sozeri, O., K. Vollmer, M. Liyanage, D. Frith, G. Kour, G. E. Mark, 3rd and S. Stabel (1992). "Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation." *Oncogene* 7(11): 2259-2262.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(5): 397-407.
- Spinella, F., L. Rosano, M. Del Duca, V. Di Castro, M. R. Nicotra, P. G. Natali and A. Bagnato (2010). "Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1 α in melanoma cells." *PLoS One* 5(6): e11241.
- Stahelin, R. V., J. H. Hwang, J. H. Kim, Z. Y. Park, K. R. Johnson, L. M. Obeid and W. Cho (2005). "The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1." *J Biol Chem* 280(52): 43030-43038.
- Stapleton, C. M., D. G. Mashek, S. Wang, C. A. Nagle, G. W. Cline, P. Thuillier, L. M. Leesnitzer, L. O. Li, J. B. Stimmel, G. I. Shulman and R. A. Coleman (2011). "Lysophosphatidic acid activates peroxisome proliferator activated receptor-gamma in CHO cells that over-express glycerol 3-phosphate acyltransferase-1." *PLoS One* 6(4): e18932.

- Stojilkovic, S. S., F. Merelli, T. Iida, L. Z. Krsmanovic and K. J. Catt (1990). "Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells." Science 248(4963): 1663-1666.
- Stracke, M. L., H. C. Krutzsch, E. J. Unsworth, A. Arestad, V. Cioce, E. Schiffmann and L. A. Liotta (1992). "Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein." J Biol Chem 267(4): 2524-2529.
- Strub, G. M., M. Maceyka, N. C. Hait, S. Milstien and S. Spiegel (2010). "Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate." Adv Exp Med Biol 688: 141-155.
- Stukey, J. and G. M. Carman (1997). "Identification of a novel phosphatase sequence motif." Protein Sci 6(2): 469-472.
- Sugiura, M., K. Kono, H. Liu, T. Shimizugawa, H. Minekura, S. Spiegel and T. Kohama (2002). "Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization." J Biol Chem 277(26): 23294-23300.
- Sunkara, S. K., M. Khairy, T. El-Toukhy, Y. Khalaf and A. Coomarasamy (2010). "The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis." Hum Reprod 25(2): 418-429.
- Tabata, K., K. Baba, A. Shiraishi, M. Ito and N. Fujita (2007). "The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun 363(3): 861-866.
- Taha, T. A., Y. A. Hannun and L. M. Obeid (2006). "Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease." J Biochem Mol Biol 39(2): 113-131.
- Takasaki, C., N. Tamiya, A. Bdolah, Z. Wollberg and E. Kochva (1988). "Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart." Toxicon 26(6): 543-548.
- Takeda, H., T. Matozaki, T. Takada, T. Noguchi, T. Yamao, M. Tsuda, F. Ochi, K. Fukunaga, K. Inagaki and M. Kasuga (1999). "PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor." EMBO J 18(2): 386-395.
- Takeuchi, M., M. Harigai, S. Momohara, E. Ball, J. Abe, K. Furuichi and N. Kamatani (2007). "Cloning and characterization of DPPL1 and DPPL2, representatives of a novel type of mammalian phosphatidate phosphatase." Gene 399(2): 174-180.
- Tanfin, Z., M. Serrano-Sanchez and D. Leiber (2011). "ATP-binding cassette ABCC1 is involved in the release of sphingosine 1-phosphate from rat uterine leiomyoma ELT3 cells and late pregnant rat myometrium." Cell Signal 23(12): 1997-2004.
- Tania, M., M. A. Khan, H. Zhang, J. Li and Y. Song (2010). "Autotaxin: a protein with two faces." Biochem Biophys Res Commun 401(4): 493-497.
- Tanyi, J. L., Y. Hasegawa, R. Lapushin, A. J. Morris, J. K. Wolf, A. Berchuck, K. Lu, D. I. Smith, K. Kalli, L. C. Hartmann, K. McCune, D. Fishman, R. Broaddus, K. W. Cheng, E. N. Atkinson, J. M. Yamal, R. C. Bast, E. A. Felix, R. A. Newman and G. B. Mills (2003). "Role of decreased levels of lipid phosphate phosphatase-1 in accumulation of lysophosphatidic acid in ovarian cancer." Clin Cancer Res 9(10 Pt 1): 3534-3545.
- Tanyi, J. L., A. J. Morris, J. K. Wolf, X. Fang, Y. Hasegawa, R. Lapushin, N. Auersperg, Y. J. Sigal, R. A. Newman, E. A. Felix, E. N. Atkinson and G. B. Mills (2003). "The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer." Cancer Res 63(5): 1073-1082.
- Taran, F. A., H. L. Brown and E. A. Stewart (2010). "Racial diversity in uterine leiomyoma clinical studies." Fertil Steril 94(4): 1500-1503.
- Templeman, C., S. F. Marshall, C. A. Clarke, K. D. Henderson, J. Largent, S. Neuhausen, P. Reynolds, G. Ursin and L. Bernstein (2009). "Risk factors for surgically removed fibroids in a large cohort of teachers." Fertil Steril 92(4): 1436-1446.

- Teplyakov, A. I. (2004). "Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis." *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S274-275.
- Toke, D. A., W. L. Bennett, D. A. Dillon, W. I. Wu, X. Chen, D. B. Ostrander, J. Oshiro, A. Cremesti, D. R. Voelker, A. S. Fischl and G. M. Carman (1998). "Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* DPP1 gene encoding diacylglycerol pyrophosphate phosphatase." *J Biol Chem* 273(6): 3278-3284.
- Tokumura, A., K. Harada, K. Fukuzawa and H. Tsukatani (1986). "Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma." *Biochim Biophys Acta* 875(1): 31-38.
- Tokumura, A., Y. Kanaya, M. Miyake, S. Yamano, M. Irahara and K. Fukuzawa (2002). "Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy." *Biol Reprod* 67(5): 1386-1392.
- Tokumura, A., E. Majima, Y. Kariya, K. Tominaga, K. Kogure, K. Yasuda and K. Fukuzawa (2002). "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase." *J Biol Chem* 277(42): 39436-39442.
- Tomiyasu, B. A., C. J. Chen and J. M. Marshall (1988). "Comparison of the activity of circular and longitudinal myometrium from pregnant rats: co-ordination between muscle layers." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15(9): 647-656.
- Tomsig, J. L., A. H. Snyder, E. V. Berdyshev, A. Skobeleva, C. Mataya, V. Natarajan, D. N. Brindley and K. R. Lynch (2009). "Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo." *Biochem J* 419(3): 611-618.
- Toschi, A., E. Lee, L. Xu, A. Garcia, N. Gadir and D. A. Foster (2009). "Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin." *Mol Cell Biol* 29(6): 1411-1420.
- Tsuiji, K., T. Takeda, B. Li, A. Kondo, M. Ito and N. Yaegashi (2010). "Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice." *Tohoku J Exp Med* 222(1): 55-61.
- Tsukahara, T., R. Tsukahara, S. Yasuda, N. Makarova, W. J. Valentine, P. Allison, H. Yuan, D. L. Baker, Z. Li, R. Bittman, A. Parrill and G. Tigyi (2006). "Different residues mediate recognition of 1-O-oleyllysophosphatidic acid and rosiglitazone in the ligand binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *J Biol Chem* 281(6): 3398-3407.
- Uchida, N., S. Okamura and H. Kuwano (1999). "Phospholipase D activity in human gastric carcinoma." *Anticancer Res* 19(1B): 671-675.
- Ueda, Y., S. Hirai, S. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno and S. Ohno (1996). "Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf." *J Biol Chem* 271(38): 23512-23519.
- Umezu-Goto, M., Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, T. Yamori, G. B. Mills, K. Inoue, J. Aoki and H. Arai (2002). "Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production." *J Cell Biol* 158(2): 227-233.
- van Meeteren, L. A., V. Brinkmann, J. S. Saulnier-Blache, K. R. Lynch and W. H. Moolenaar (2008). "Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D." *Cancer Lett* 266(2): 203-208.
- van Meeteren, L. A. and W. H. Moolenaar (2007). "Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis." *Prog Lipid Res* 46(2): 145-160.
- van Meeteren, L. A., P. Ruurs, E. Christodoulou, J. W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano and W. H. Moolenaar (2005). "Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate." *J Biol Chem* 280(22): 21155-21161.
- van Schooten, B., C. Testerink and T. Munnik (2006). "Signalling diacylglycerol pyrophosphate, a new phosphatidic acid metabolite." *Biochim Biophys Acta* 1761(2): 151-159.

- Venkataraman, K., S. Thangada, J. Michaud, M. L. Oo, Y. Ai, Y. M. Lee, M. Wu, N. S. Parikh, F. Khan, R. L. Proia and T. Hla (2006). "Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient." Biochem J 397(3): 461-471.
- Venuti, A., D. Salani, V. Manni, F. Poggiali and A. Bagnato (2000). "Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy." FASEB J 14(14): 2277-2283.
- Waggoner, D. W., J. Xu, I. Singh, R. Jasinska, Q. X. Zhang and D. N. Brindley (1999). "Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction." Biochim Biophys Acta 1439(2): 299-316.
- Wagner, F., S. Buz, H. H. Neumeyer, R. Hetzer and B. Hoher (2004). "Nitric oxide inhalation modulates endothelin-1 plasma concentration gradients following left ventricular assist device implantation." J Cardiovasc Pharmacol 44 Suppl 1: S89-91.
- Walker, C. L. (2002). "Role of hormonal and reproductive factors in the etiology and treatment of uterine leiomyoma." Recent Prog Horm Res 57: 277-294.
- Walker, C. L., D. Hunter and J. I. Everitt (2003). "Uterine leiomyoma in the Eker rat: a unique model for important diseases of women." Genes Chromosomes Cancer 38(4): 349-356.
- Walker, C. L. and E. A. Stewart (2005). "Uterine fibroids: the elephant in the room." Science 308(5728): 1589-1592.
- Wang, D., Z. Zhao, A. Caperell-Grant, G. Yang, S. C. Mok, J. Liu, R. M. Bigsby and Y. Xu (2008). "S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells." Mol Cancer Ther 7(7): 1993-2002.
- Wang, X., S. P. Devaiah, W. Zhang and R. Welti (2006). "Signaling functions of phosphatidic acid." Prog Lipid Res 45(3): 250-278.
- Watson, C., J. S. Long, C. Orange, C. L. Tannahill, E. Mallon, L. M. McGlynn, S. Pyne, N. J. Pyne and J. Edwards (2010). "High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients." Am J Pathol 177(5): 2205-2215.
- Watterson, K. R., P. H. Ratz and S. Spiegel (2005). "The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction." Cell Signal 17(3): 289-298.
- Wissing, J. B. and H. Behrbohm (1993). "Diacylglycerol pyrophosphate, a novel phospholipid compound." FEBS Lett 315(1): 95-99.
- Wu, W. I., Y. Liu, B. Riedel, J. B. Wissing, A. S. Fischl and G. M. Carman (1996). "Purification and characterization of diacylglycerol pyrophosphate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 271(4): 1868-1876.
- Xia, H., Z. D. Hornby and R. C. Malenka (2001). "An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits." Neuropharmacology 41(6): 714-723.
- Yamboliev, I. A., K. M. Wiesmann, C. A. Singer, J. C. Hedges and W. T. Gerthoffer (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinases regulate ERK and p38 MAP kinases in canine colonic smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol 279(2): C352-360.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature 332(6163): 411-415.
- Yang, S. Y., J. Lee, C. G. Park, S. Kim, S. Hong, H. C. Chung, S. K. Min, J. W. Han, H. W. Lee and H. Y. Lee (2002). "Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells." Clin Exp Metastasis 19(7): 603-608.
- Yokota, S., Y. Taniguchi, A. Kihara, S. Mitsutake and Y. Igarashi (2004). "Asp177 in C4 domain of mouse sphingosine kinase 1a is important for the sphingosine recognition." FEBS Lett 578(1-2): 106-110.

- Yoshizawa, T., O. Shinmi, A. Giaid, M. Yanagisawa, S. J. Gibson, S. Kimura, Y. Uchiyama, J. M. Polak, T. Masaki and I. Kanazawa (1990). "Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system." *Science* 247(4941): 462-464.
- Yoshizumi, M., H. Kurihara, T. Sugiyama, F. Takaku, M. Yanagisawa, T. Masaki and Y. Yazaki (1989). "Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 161(2): 859-864.
- Young, K. W., J. M. Willets, M. J. Parkinson, P. Bartlett, S. Spiegel, S. R. Nahorski and R. A. Challiss (2003). "Ca²⁺/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation." *Cell Calcium* 33(2): 119-128.
- Zalejski, C., Z. Zhang, A. L. Quettier, R. Maldiney, M. Bonnet, M. Brault, C. Demandre, E. Miginiac, J. P. Rona, B. Sotta and E. Jeannette (2005). "Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells." *Plant J* 42(2): 145-152.
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels." *Neuron* 22(3): 537-548.
- Zhang, H., X. Xu, J. Gajewiak, R. Tsukahara, Y. Fujiwara, J. Liu, J. I. Fells, D. Perygin, A. L. Parrill, G. Tigy and G. D. Prestwich (2009). "Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo." *Cancer Res* 69(13): 5441-5449.
- Zhang, J., V. M. Narayan, N. Juedes and J. M. Patel (2009). "Hypoxic upregulation of preendothelin-1 gene expression is associated with protein tyrosine kinase-PI3K signaling in cultured lung vascular endothelial cells." *Int J Clin Exp Med* 2(1): 87-94.
- Zhang, Q. X., C. S. Pilquill, J. Dewald, L. G. Berthiaume and D. N. Brindley (2000). "Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action." *Biochem J* 345 Pt 2: 181-184.
- Zhang, W., C. Wang, C. Qin, T. Wood, G. Olafsdottir, R. Welti and X. Wang (2003). "The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 15(10): 2285-2295.
- Zhang, Y., H. Zhu, Q. Zhang, M. Li, M. Yan, R. Wang, L. Wang, R. Welti, W. Zhang and X. Wang (2009). "Phospholipase dalpha1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 21(8): 2357-2377.
- Zhao, C., G. Du, K. Skowronek, M. A. Frohman and D. Bar-Sagi (2007). "Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos." *Nat Cell Biol* 9(6): 706-712.
- Zhao, Y., H. Ehara, Y. Akao, M. Shamoto, Y. Nakagawa, Y. Banno, T. Deguchi, N. Ohishi, K. Yagi and Y. Nozawa (2000). "Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 278(1): 140-143.
- Zhong, M., Y. Shen, Y. Zheng, T. Joseph, D. Jackson and D. A. Foster (2003). "Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 302(3): 615-619.
- Zhou, H. and K. S. Murthy (2004). "Distinctive G protein-dependent signaling in smooth muscle by sphingosine 1-phosphate receptors S1P1 and S1P2." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5): C1130-1138.