

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1999

THESE N° 345.

**ETUDE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU
RECEPTEUR A LA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A**



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 10 Novembre 1999

Par

Géraldine IBARZ

Née le 5 Novembre 1974 à Bergerac (Dordogne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur LAGORCE Jean-François
Monsieur GAGNE Didier
Monsieur le Professeur RABY Claude
Mademoiselle CLEDAT Dominique
Mademoiselle BEYSSEN Marie-Laure

Président du jury
Directeur de thèse
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESSEURS :

Monsieur le Professeur DREYFUSS Gilles

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE et BIOLOGIE

MOLECULAIRE

BERNARD Michel

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE-ORGANIQUE

CHIME-THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE-ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE-BIOLOGIE MOLECULAIRE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE-HYDROLOGIE-

ENVIRONNEMENT

OUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :

POMMARET Maryse

Je dédie cette thèse,

A mes parents,

Je vous dédie cette thèse, en reconnaissance de l'amour, et de l'abnégation dont vous avez toujours fait preuve, de vos encouragements, et des études que vous m'avez permis de mener à bien.

Que ce travail puisse témoigner de l'intensité de mes sentiments à votre égard, mélange d'amour, d'admiration, de respect, et de reconnaissance.

A David,

Je te dédie, cette thèse, toi qui à été là tout au long de son élaboration.

Ta bienveillance, ta douceur, et ton altruisme, sont chères à mon cœur.

Témoin de mes joies, de mes peines, tu m'as permis, en m'insufflant ta force et ton soutien, de surpasser mes difficultés et de mener à bien mes travaux.

*A tous ceux qui m'étaient chers, et qui ont
aujourd'hui disparu.*

*A ma famille, mes amis, et tous ceux qui m'ont
apporté leur affection et leur soutien.*

A Monsieur LAGORCE Jean-François,

Maître de conférences en Chimie Organique, HDR

Docteur en Pharmacie

Je tiens à vous dire toute ma gratitude pour le grand honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Soyez remercié pour l'accueil et la disponibilité dont vous avez fait preuve à mon égard tout au long de mes études, et pour les conseils que vous m'avez apportés avec la gentillesse qui vous caractérise.

Vous trouverez ici toute l'expression de ma reconnaissance et l'assurance de mon profond respect.

A Monsieur GAGNE Didier,

Maître de conférences en Biochimie, HDR

Sincères remerciements pour avoir bien voulu être le directeur de cette thèse. J'ai été sensible à l'accueil que vous avez réservé à ce travail, à l'aide que vous m'avez apportée, et à la disponibilité dont vous avez fait preuve lors de son élaboration.

Veillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.

A Monsieur le Professeur RABY Claude,

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Professeur de Pharmacie Chimique et de Chimie Organique

Licencié ès Sciences

Ancien interne des Hôpitaux de Bordeaux

Je tiens à vous témoigner ma vive gratitude pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je garderais toujours présents en moi la valeur de votre enseignement et de vos travaux.

Veillez trouver dans cette thèse, le témoignage de mon admiration et de ma respectueuse considération.

A Mademoiselle CLEDAT Dominique,

Maître de conférences en Chimie Analytique

Profondément touchée pour l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail, je tiens à vous remercier pour l'accueil et l'amabilité dont vous avez toujours fait preuve à mon égard.

Veillez trouver dans cette thèse, l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Mademoiselle BEYSSEN Marie-Laure,

Docteur en Pharmacie

Docteur de l'Université, option pharmacie

Je suis très honorée de l'enthousiasme et de l'intérêt dont vous avez fait preuve pour juger ce travail.

Vous m'avez permis de confirmer mon goût pour la Recherche., lors de notre collaboration pendant l'élaboration de votre thèse d'Université.

Veillez trouver dans cette thèse, l'expression de ma profonde reconnaissance, et de ma sincère amitié.

PLAN

PLAN	14
INTRODUCTION	19
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	22
<i>CHAPITRE I : CHOLECYSTOKININE ET RECEPTEUR A LA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A</i>	<i>23</i>
I- LE RÉCEPTEUR À LOA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A : UN DES RÉCEPTEURS À LA CHOLÉCYSTOKININE	23
II- DEUX LIGANDS DU RÉCEPTEUR À LA CHOLÉCYSTOKININE	28
<i>CHAPITRE II : TRANSDUCTION DU SIGNAL</i>	<i>38</i>
I- COUPLAGE DU RÉCEPTEUR ET GÉNÉRATION DE SECONDS MESSAGERS	38
II- ACTIVATION DES DIFFÉRENTES VOIES « MAP KINASE »	41
III- FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DU GÈNE C-FOS	49
MATERIEL ET METHODES	54
I- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	55
II- DETERMINATION DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE INDUITE PAR LES LIGANDS DANS DIFFÉRENTS MODÈLES CELLULAIRES ETABLIS	63
RESULTATS ET DISCUSSION	76
I- <u>RESULTATS</u>	78

II- <u>DISCUSSION</u>	87
<u>CONCLUSION</u>	<u>96</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>99</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>108</u>
<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>116</u>
<u>FIGURES ET TABLEAUX</u>	<u>122</u>

NOMENCLATURE EN CODES TROIS LETTRES ET UNE LETTRE DES ACIDES AMINES

Acide aminé	Nomenclature trois lettres	Nomenclature une lettre
Glycine	Gly	G
Alanine	Ala	A
Valine	Val	V
Leucine	Leu	L
Isoleucine	Ile	I
Acide aspartique	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Lysine	Lys	K
Arginine	Arg	R
Histidine	His	H
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Phénylalanine	Phe	F
Tyrosine	Tyr	Y
Tryptophane	Trp	W
Cystéine	Cys	C
Méthionine	Met	M
Proline	Pro	P

ABREVIATIONS

ABREVIATION	SIGNIFICATION
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate cyclique
CaMK	Calmoduline kinase
CaMK-4Ca ⁺⁺	Calmoduline kinase liant quatre calcium
CBP	CREB Binding Protein : protéine de liaison de la protéine CREB
CCK-8	Octapeptide sulfaté de la cholécystokinine
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CoA	Coenzyme A
DAG	1,2-diacylglycérol
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
ERK	Extracellular signal regulated kinase : kinase régulée par les signaux extracellulaires
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HBS	HEPES buffer saline
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
JNK	Jun N terminal kinase
Kd	Constante de dissociation
LB	Milieu Luria Bertani
MAPK	Mitogen activated protein kinase : protéine kinase activée par les mitogènes
MCS	Site de multiclonage
Mnk 1	MAPK interacting kinase : kinase interagissant avec les MAPK

Pi	Phosphate inorganique
PIP ₂	Inositol bis-phosphate
PKA	Protéine kinase de type A
PKC	Protéine kinase de type C
PLC _β	Phospholipase C de type β
R-CCK _A	Récepteur à la cholécystokinine de type A
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SAPK	Stress activated kinase : protéine kinase activée par le stress
TBE 1X	Tris borate EDTA une fois concentré
(17M)5-Luc	Plasmide reporter dans lequel l'expression de la luciférase est sous le contrôle de la séquence 17M répétée cinq fois. Cette séquence est spécifiquement reconnue par la protéine Gal-4.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

RECEPTEUR A LA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A ET CONTROLE DE LA SATIETE

Il est bien établi que les évènements qui sont issus de la membrane cellulaire et qui impliquent la reconnaissance d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines par leurs récepteurs spécifiques jouent un rôle important dans des phénomènes biologiques complexes comme la croissance et la différenciation cellulaire.

De nombreux points ont déjà pu être élucidés concernant les évènements initiés par les facteurs de croissance et d'autres mitogènes comme :

- ↪ l'implication de leur récepteur spécifique,
- ↪ l'activation de fonction tyrosine kinase,
- ↪ l'activation de cascades de signalisation formant un véritable réseau de transduction en séquences relativement linéaires (voie des MAP kinases, voie des SAP Kinases, voie p38, voie des protéines STAT, etc) [1].

En revanche il n'en est pas de même pour les récepteurs à sept domaines trans-membranaires et leurs ligands spécifiques : on commence seulement maintenant à suggérer que ce type de récepteur pourrait agir de manière très voisine de celle d'un récepteur de facteur de croissance à activité tyrosine kinase. Actuellement, la multiplicité des récepteurs à sept domaines trans-membranaires ainsi que leur diversité d'action biologique n'autorise pas à les assimiler à des récepteurs tyrosine kinase.

Pour notre part nous nous intéressons à l'étude de la transduction du signal initiée par la liaison de la cholécystokinine (CCK-8) à son récepteur de type A (R-CCK_A) qui est un

récepteur à sept domaines trans-membranaires. Plusieurs études ont montré que le sous type A du récepteur à la cholécystokinine se comportait de façon différente selon l'espèce (rat ou souris) pour un même ligand : la molécule de JMV-180 qui a été conçue et synthétisée au laboratoire, et qui est un analogue de la CCK-8 [2]. Ce travail a été initié au laboratoire à partir de données expérimentales mettant clairement en évidence que la molécule JMV-180 avait un rôle unique dans la pharmacologie des neuropeptides puisqu'elle est agoniste à la fois sur le site de haute et de basse affinité du R-CCK_A de souris, alors que chez le rat, elle se comportait comme un agoniste sur le site de haute affinité, et comme un antagoniste sur le site de basse affinité du R-CCK_A [3].

Des études menées en parallèle mesurant le taux d'inositol phosphate ainsi que celui de calcium induit par la CCK-8 ou le JMV-180 via le R-CCK_A de rat ou de souris n'ont pas permis de reproduire ce comportement différent de la molécule de JMV-180 qui était observé chez l'animal vis à vis de ce type de récepteur.

Notre objectif a donc été d'étudier l'impact de l'activation du R-CCK_A de rat ou de souris par le JMV-180 ainsi que par la CCK-8 sur les grandes voies de signalisation intracellulaires connues, comme celle de la voie des MAP kinases, SAP Kinases, et p38^{MAPK}.

Ce travail devrait permettre la détermination des régions du R-CCK_A responsables de son orientation vers un comportement de type agoniste ou antagoniste. Comme ce sous-type de récepteur est impliqué dans le contrôle de la satiété, nous présageons que ce travail devrait aboutir à la conception de nouvelles molécules agonistes potentiellement actives dans ce domaine.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :**CHOLECYSTOKININE ET
RECEPTEUR A LA CHOLECYSTOKININE
DE TYPE A****I- LE RECEPTEUR A LA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A : UN DES
RECEPTEURS A LA CHOLECYSTOKININE****I-1- Deux types de récepteurs à la cholécystokinine**

Il existe différents types de récepteurs à la cholécystokinine qui sont les récepteurs de type A (R-CCK_A), et de type B (R-CCK_B).

Les R-CCK_A, « A » provenant du terme anglais « alimentary », tiennent leur nom de leur localisation pancréatique et biliaire, bien qu'ils aient été découverts ultérieurement au niveau du cerveau, où ils contribueraient à l'induction d'un effet satiétogène.

Les deux types de récepteur se différencient pharmacologiquement, sur la base de leur affinité pour leurs agonistes et les différents types de ligands. En effet, le R-CCK_A, lie par

exemple, la CCK-8 sulfatée avec beaucoup plus d'affinité que la CCK-8 ou la gastrine non sulfatées, alors que le R-CCK_B a la même affinité pour les agonistes sulfatés ou non.

Dans le pancréas de rat ou de souris, il a été montré que le R-CCK_A, présente deux sites d'affinité de liaison différente pour leur agoniste naturel : un site de haute affinité ($K_d = 69$ pM), et un site de basse affinité ($K_d = 10$ nM). Ces deux états existent dans un équilibre réversible. Dans les conditions normales, le récepteur se présente sous la configuration de basse affinité [10, 12, 14].

I-2- Structure primaire du récepteur

Les récepteurs à la cholécystokinine, qu'ils soient de type A ou B, sont des récepteurs à sept domaines trans-membranaires, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) [4, 5].

La structure primaire du récepteur à la cholécystokinine de type A diffère légèrement d'une espèce animale à l'autre. Il est constitué de 428 acides aminés chez l'homme [6], et de 492 chez le rat [7].

Des différences de structure primaire sont observées entre les R-CCK_A de rat et de souris (cf. tableau I page suivante).

Alors que l'on a souligné que les R-CCK_A de rat et de souris se comportaient de façon différente vis à vis du JMV-180, il semblerait que la différence dans la structure primaire de ces récepteurs pourrait en être responsable.

Acide amine n°	Domaine protéique	Rat	Souris
43	TM 1 : 1 ^{er} domaine trans-membranaire	L	V
50		I	F
220	TM 5 : 5 ^{ème} domaine trans-membranaire	L	I
223		I	V
254	i3 : troisième boucle intracellulaire	K	R
255		P	L
257		T	S
[259-265]		-	[GGGGGGS]
268		T	S
294		S	T
295		G	S
297		G	S
299		S	G
301		L	I
308		S	G
402	partie C-ter	P	T
420		L	S

Tableau 1 : Différences en acides aminés, indiquées selon la nomenclature à une lettre des acides aminés entre les structures primaires du récepteur CCK-A de rat et de souris. La place de chaque acide aminé différent est indiquée par référence à sa place dans le récepteur CCK-A de souris. La situation de chaque acide aminé différent est également précisée (TM 1 et TM 5 : 1^{er} et 5^{ème} domaine transmembranaire, i3 : 3^{ème} boucle intracellulaire, C-ter : extrémité C terminale).

La comparaison entre les structures primaires de R-CCK_A de rat et de souris met en évidence plusieurs différences :

- au niveau du premier domaine trans-membranaire, des acides aminés leucine (L) (L₄₃) et isoleucine (I) (I₅₀) de rat sont transformés respectivement en valine (V) et phénylalanine (P) chez la souris.

- au niveau du cinquième domaine trans-membranaire, ce sont également les leucine (L) (L₂₂₀) et isoleucine (I) (I₂₂₃) de rat qui sont transformés respectivement par l'isoleucine (I) et la valine (V), chez la souris.

Outre ces six différences, toutes les autres se situent dans la troisième boucle intracellulaire. C'est un fait très important, car c'est à ce niveau qu'est principalement induite la majeure partie des voies de transduction du signal. Ces différences sont reportées dans le tableau I. Le fait marquant, est la présence d'une cassette composée de six glycines et une sérine chez la souris, localisée entre les acides aminés 259 et 265, qui n'existe pas chez le rat. De plus, il est important de noter que cette différence se situe à une jonction intron-exon.

- les deux dernières, localisées au niveau de la partie COOH-terminale du récepteur, concernent les acides aminés leucine (L) (L₄₂₀) et phénylalanine (P) (P₄₀₂) de rat, qui sont remplacés chez la souris, respectivement par l'isoleucine (I) et la sérine (S).

(Cf. figure 1 pour la matérialisation des différences)

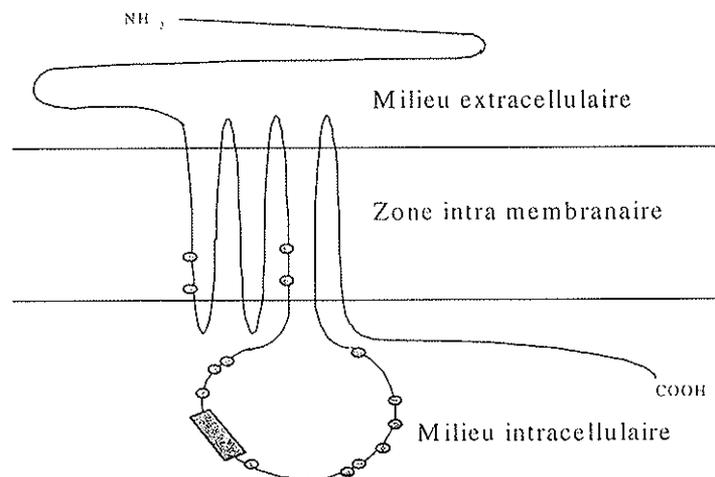


Figure 1 : Représentation schématique des différences en acides aminés, entre les structures primaires du récepteur CCK- α de rat et de souris.

Les principales différences entre ces deux récepteurs sont schématisées comme suit :

⊙ : différence ponctuelle entre acides aminés,

▨ : présence d'une cassette [GGGGGS] dans le R-CCK α de souris, absente dans le R-CCK α de rat, ainsi que dans tous les CCK α de toute autre espèce.

La différence entre les R-CCK α de rat et de souris sont plus précisément indiquées dans le tableau I.

I-3- Gène codant pour le R_{CKA}

Le gène du récepteur est constitué de cinq exons et quatre introns. La figure 2 schématise la structure de ce gène.

- L'exon numéro 1 code pour la partie extracellulaire NH₂-terminale du R-CCK_A.
- L'exon numéro 2 code pour la partie allant du domaine trans-membranaire 1 jusqu'à la première partie du domaine trans-membranaire 3.
- L'exon numéro 3 code pour la partie allant du domaine trans-membranaire 3 jusqu'à la première partie du domaine trans-membranaire 5.
- L'exon numéro 4 code pour la partie allant du domaine trans-membranaire 5 jusqu'au premier quart de la troisième boucle intracellulaire.
- L'exon numéro 5 code pour la partie allant du deuxième quart de la troisième boucle intracellulaire jusqu'à l'extrémité COOH terminale.

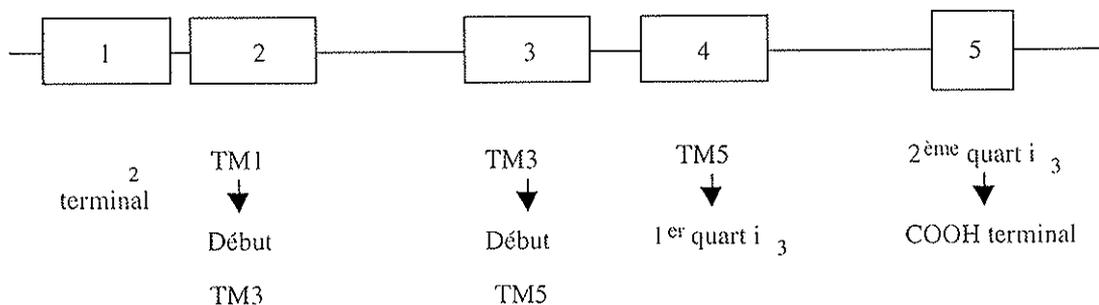


Figure 2 : Structure du gène codant pour le récepteur à la cholécystokinine de type A. Les exons sont représentés par des rectangles, et les introns par des traits pleins.

II- DEUX LIGANDS DU RÉCEPTEUR À LA CHOLÉCYSTOKININE

II-1- La Cholécystokinine

II-1-1- Historique

La découverte de la cholécystokinine (CCK-8) remonte à 1928, date à laquelle Ivy et Oldberg ont remarqué qu'un extrait intestinal était capable de stimuler la contraction de la vésicule biliaire [8]. Quinze ans plus tard, en 1943, Harper et Raper constataient que des extraits intestinaux similaires stimulaient également la sécrétion d'enzymes pancréatiques. Ils donnèrent au produit responsable de cet effet le nom de pancréozymine. La purification n'était pas encore achevée, qu'il a été démontré que la pancréozymine et la CCK-8 ne faisaient qu'un. Il a été gardé le nom de cholécystokinine.

II-1-2- Nature

La CCK-8 est une hormone peptidique amidée, produite suite à la maturation de la préprocholécystokinine. Ce processus fait intervenir plusieurs enzymes. La première d'entre elles est une signal peptidase qui permet l'élimination du peptide signal, situé à la partie N-terminale de la préprocholécystokinine, conduisant à la transformation de la préprocholécystokinine en procholécystokinine. Le résidu amidé de la procholécystokinine est suivi de la séquence Gly-Arg-Arg-Ser-Ala-Glu contenant le motif consensus composé d'une glycine et de deux résidus basiques. Ensuite, une endopeptidase et une carboxypeptidase clivent la prohormone au niveau des doublets d'acides aminés basiques, libérant l'hormone peptidique étendue d'une glycine. L'ultime étape de maturation consiste en l'amidation du résidu carboxyle précédant la glycine, par action de la «peptidyl glycine α -amidating

monoxygénase » (PAM) sur la fonction amine de la glycine (figure 3). Cette α -amidation, est indispensable à l'activité des hormones peptidiques, afin qu'elles puissent exercer leurs différents effets physiologiques.

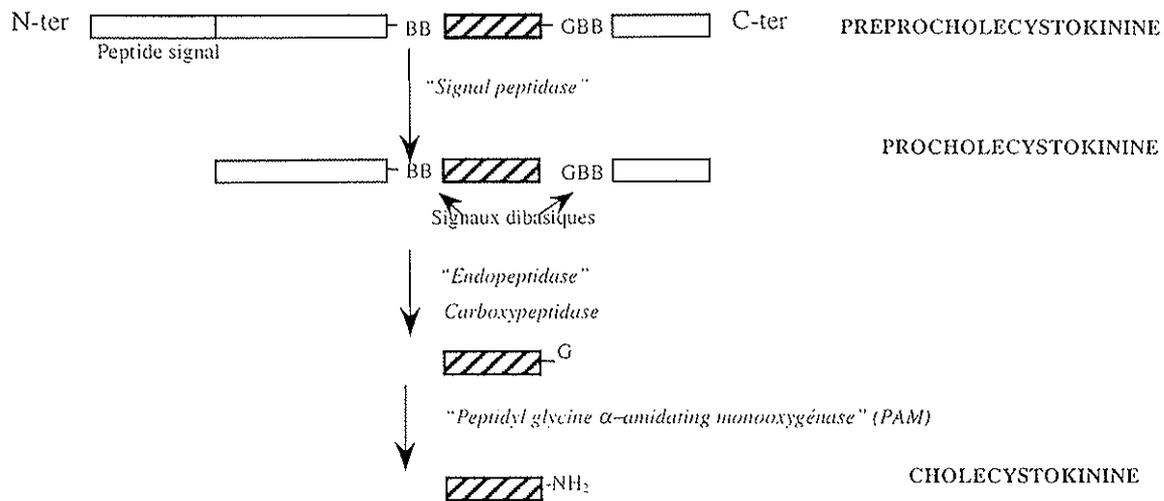


Figure 3 : Processus de maturation de la cholécystokinine, hormone peptidique amidée, à partir de sa préprohormone, la préprocholécystokinine. BB indique les doublets d'acides aminés basiques, et G la glycine.

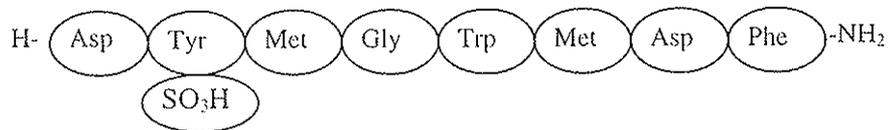
La CCK-8 est à la fois hormone et neuropeptide.

Elle est d'une part hormone gastro-intestinale, jouant un rôle prépondérant dans la nutrition. Elle est aussi considérée comme neuropeptide, car on la retrouve parallèlement dans le système nerveux central [5], et sa synthèse peut également se faire au niveau des neurones entériques.

La cholécystokinine peut exister sous différentes formes dans le sang. Les plus abondantes dans l'intestin, le sang et le cerveau sont la CCK-58, la CCK-33, et la CCK-8, forme majoritaire [9].

II-1-3- Structure

La CCK-8 est un peptide de huit acides aminés, sulfaté en position 7, dont la formule est la suivante :



(Cf. figure 4).

Son activité biologique provient du pentapeptide C-terminal. Cependant, celui-ci (Gly-Trp-Met-Asp-Phe), est également présent dans la gastrine. L'heptapeptide C-terminal présentant la tyrosine en position 7 sulfatée, et le COOH terminal amidé, possède une spécificité vis à vis du R-CCK_A. Des études utilisant des fragments synthétiques ont démontré que l'octapeptide amidé sur le COOH-terminal et sulfaté sur la tyrosine en 7 présente le spectre maximal d'activité biologique [4]. Le résidu phénylalanine, côté COOH terminal, est primordial pour son activité biologique [10], et l'élimination du résidu aspartique côté N-terminal, diminue la capacité de distinction de la CCK-8 des sites de basse et de haute affinité, sur les acini pancréatiques [11].

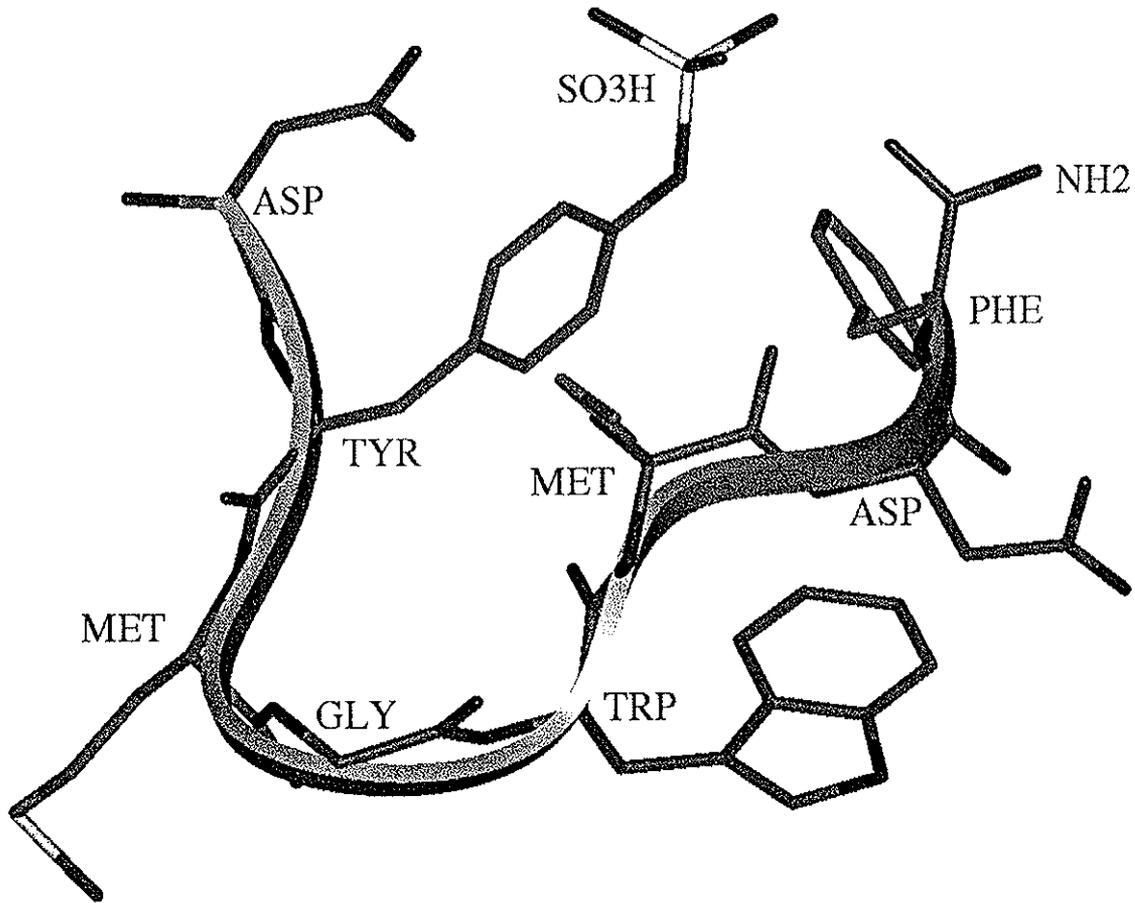


Figure 4 : Représentation tridimensionnelle de la cholécystokinine (CCK-8) dans sa conformation de plus basse énergie.

Les différentes liaisons peptidiques sont réunies sous forme d'un ruban de couleur violette permettant de visualiser de façon schématique la forme tridimensionnelle de la molécule.

II-1-4- Lieu de synthèse

Comme beaucoup d'hormones gastro-intestinales, la CCK-8 est produite par des cellules endocrines de la muqueuse intestinale, appelées cellules I. Elles se trouvent concentrées au niveau du duodénum et du jéjunum proximal, et sont orientées de façon à ce que les surfaces apicales soient dirigées vers la lumière intestinale [1].

La libération de la CCK-8 est augmentée par l'absorption d'aliments, et notamment par les produits de digestion de lipides et de protéines. Parmi les protéines, les acides aminés comme le tryptophane ou la phénylalanine sont les plus stimulants.

II-1-5- Effets biologiques induits suite à l'activation du récepteur à la cholécystokinine de type A

La fixation de la CCK-8 sur le R-CCK_A induit des effets divers, que ce soit au niveau du tractus digestif ou du système nerveux. [2]

II-1-5-1- Au niveau du tractus digestif

L'occupation du récepteur à la cholécystokinine de type A génère de nombreux effets, dont le plus important est l'effet trophique observé au niveau du pancréas [12]. La CCK-8 stimule la libération post-prandiale des enzymes pancréatiques, qui fait intervenir le R-CCK_A et l'activation de la phospholipase C de type β (PLC β), qui induit la libération de nombreux autres messagers [13]. Parmi les enzymes, nous pouvons citer l'amylase qui est libérée d'une façon biphasique [3, 10, 11, 14] (*Cf.* figure 5). La partie ascendante de la courbe correspond à une action stimulatrice de la sécrétion d'amylase, et provient de l'occupation des sites de haute affinité [11, 15], par des concentrations de CCK-8, inférieures à 100 pM [14]. Au contraire, la partie descendante de la courbe, traduisant une action inhibitrice de la sécrétion d'amylase et provenant de l'occupation des sites de basse affinité [11, 15], est observée à de plus fortes concentrations de CCK-8 [10, 3].

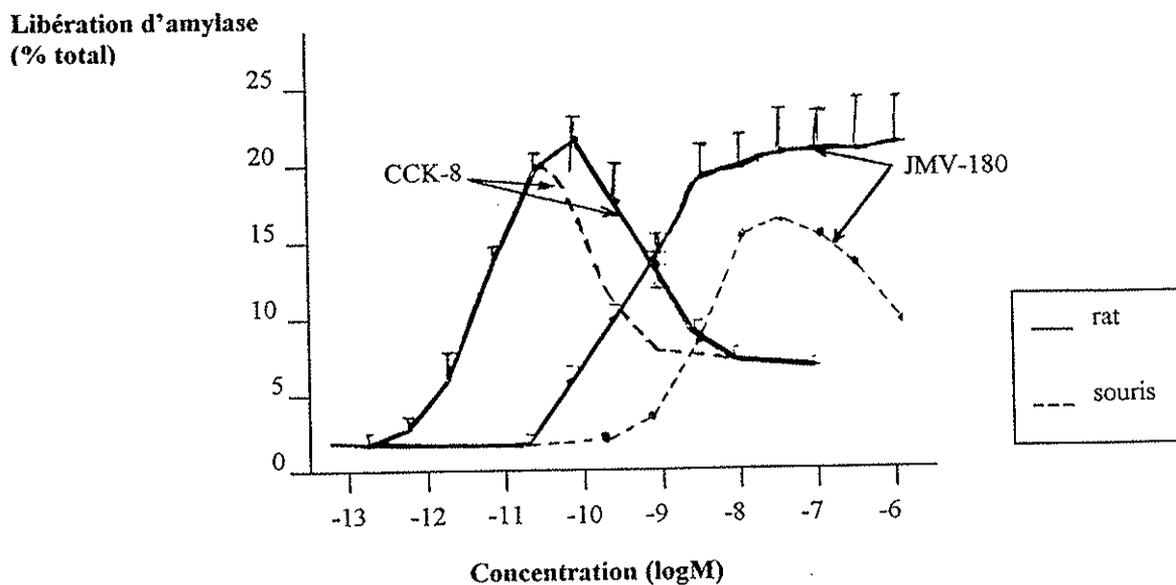


Figure 5 : Libération d'amylase consécutive à l'occupation des sites de haute puis de basse affinité des récepteurs à la cholécystokinine de type A.

Le R-CCK_A est également impliqué dans la satiété et le contrôle de l'alimentation [10, 13, 16]. La CCK-8 possède de nombreux autres effets résumés dans le tableau II ci-après [5].

II-1-5-2- Au niveau du système nerveux

Bien que le récepteur à la cholécystokinine soit largement décrit comme un récepteur périphérique, il a été également localisé au niveau des fibres nerveuses de certaines aires du système nerveux central. Suite à une prise alimentaire, la cholécystokinine, synthétisée par les neurones entériques et les cellules I de l'intestin grêle, active les R-CCK_A localisés sur les neurones afférents du nerf vague. Ces neurones transmettent alors l'information sensorielle à différentes régions cérébrales, comme le noyau du tractus solitaire, l'area postrema et l'hypothalamus, et on assiste à une diminution de la prise alimentaire [17]. Cet effet satiétogène a été mis en évidence, chez l'homme et le rat, par l'administration centrale ou

périphérique de fortes doses de CCK-8 qui induisaient une diminution de la prise alimentaire [19].

Enfin, la CCK-8 augmente la libération de la dopamine, et provoque, comme cela a été précédemment cité, l'effet de satiété après la prise alimentaire, effet qui vient renforcer les effets périphériques, tels les retardements de vidanges gastrique et intestinale.

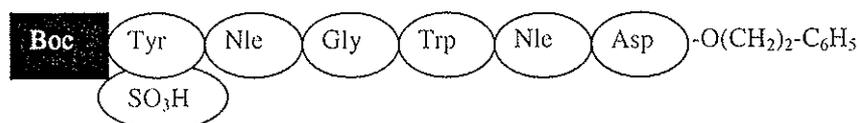
Localisation tissulaire	Effet biologique induit par la liaison de la CCK-8 sur le R-CCK _A
Estomac	<ul style="list-style-type: none"> • augmentation de la sécrétion de pepsine par les cellules principales, • augmentation de la libération de la somatostatine des cellules D, qui va inhiber la sécrétion acide, • effet trophique, • Diminution du taux de vidange gastrique.
Pancréas	<ul style="list-style-type: none"> • augmentation de la sécrétion exocrine d'enzymes pancréatiques, • augmentation de la sécrétion endocrine d'insuline et de peptides, • effet trophique.
Muscle lisse	<ul style="list-style-type: none"> • vidange de la vésicule biliaire, • augmentation du tonus du sphincter pylorique, qui retarde la vidange gastrique, • Relaxation du sphincter d'Oddi.
Intestin	<ul style="list-style-type: none"> • diminution de la vidange de l'intestin grêle, • augmentation du temps de passage dans le colon.
Augmentation de la sécrétion d'hormones.	<ul style="list-style-type: none"> • Insuline • Somatostatine pancréatique • Polypeptides pancréatiques • Calcitonine (effet potentialisé par la sécrétine)
Alimentation	<ul style="list-style-type: none"> • Induction de la satiété.

Tableau II : Exemple des principales fonctions biologiques périphériques exercées par la cholécystokinine.

II-2- La molécule de JMV-180

II-2-1- Structure

Le JMV-180 est un analogue heptapeptidique de la CCK-8 ne possédant pas de fonction amide C-terminale [3], et dans lequel la liaison entre les résidus acide aspartique et phénylalanine a été modifiée.



Boc = Protection de la fonction amine de la tyrosine par un groupement tert-butyloxycarbonyl

(Cf. figure 6).

Cette molécule interagit avec les deux sites du récepteur à la CCK-8, et ceci avec des affinités différentes. Sur les sites de haute affinité ($K_d = 2.2 \text{ nM}$), le JMV-180 se comporte comme un agoniste, car il provoque une stimulation de la sécrétion d'amylase. Au contraire, il est antagoniste sur les sites de basse affinité ($K_d = 19 \text{ nM}$) [3, 10, 11, 14, 19], et ne peut alors induire comme le fait la CCK-8, une inhibition de la sécrétion. Ainsi, contrairement à la CCK-8, le JMV-180 n'induit pas de phase décroissante lors de la sécrétion d'amylase. C'est à ce titre un outil précieux car il permet, sur la base de son activité biologique, la distinction entre les sites de haute et de basse affinité [19].

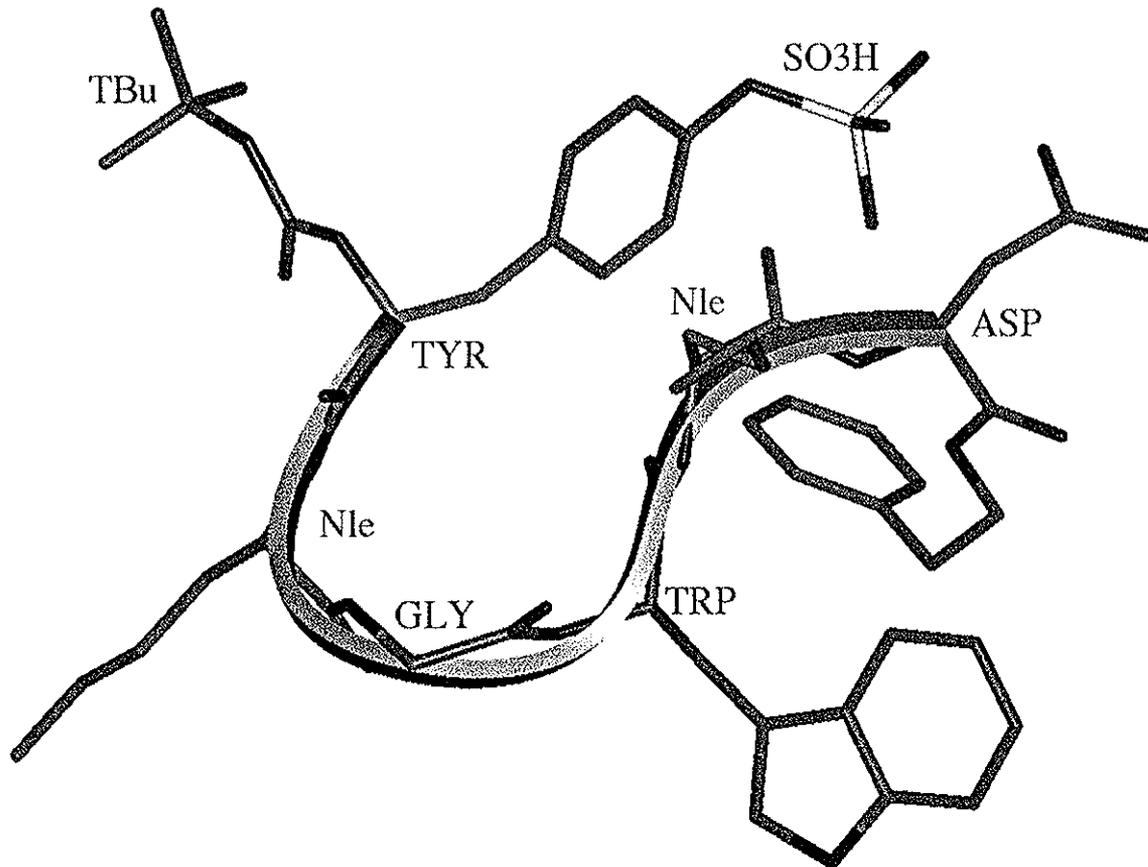


Figure 6 : Représentation tridimensionnelle de la molécule de JMV-180 dans sa conformation la plus proche de la conformation active de la cholécystokinine (figure 4).
Les différentes liaisons peptidiques sont réunies sous forme d'un ruban de couleur violette permettant de visualiser de façon schématique la forme tridimensionnelle de la molécule.

II-2-2- Comportement différent chez le rat et la souris

Chez le rat, le JMV-180 est uniquement agoniste sur les sites de haute affinité, alors que chez la souris, il est agoniste sur les sites de haute et de basse affinité [3]. Ainsi chez la souris, à des concentrations supra-maximales, il peut inhiber la sécrétion d'amylase et la synthèse protéique [10], tout comme la CCK-8.

On remarque en outre que le JMV-180 présente un effet satiétogène minime. En effet seule une diminution de la prise alimentaire est observé après trois à quatre jours de fortes doses de JMV-180 (10 μ g) [20].

CHAPITRE II :**TRANSDUCTION DU SIGNAL****I- COUPLAGE DU RECEPTEUR ET GENERATION DE SECONDS MESSAGERS****I-1- Couplage du R-CCK_A avec la protéine G**

Le R-CCK_A est un récepteur à sept domaines trans-membranaires, couplé à une protéine G de type q (Gq), de nature hétérotrimérique, constituée de sous-unités α , β , et γ .

La liaison du ligand à son récepteur, induit le recrutement de la protéine Gq (*cf.* figure 7-a et 7-b), et le départ au niveau de la sous-unité α du guanosyl diphosphate (GDP), (*cf.* figure 7-c).

Ce départ provoque la dissociation de Gq en sous-unité α et en complexe $\beta\gamma$. Sur la sous unité α , vient se fixer immédiatement une molécule de GTP (guanosyl triphosphate), ce qui la rend active.

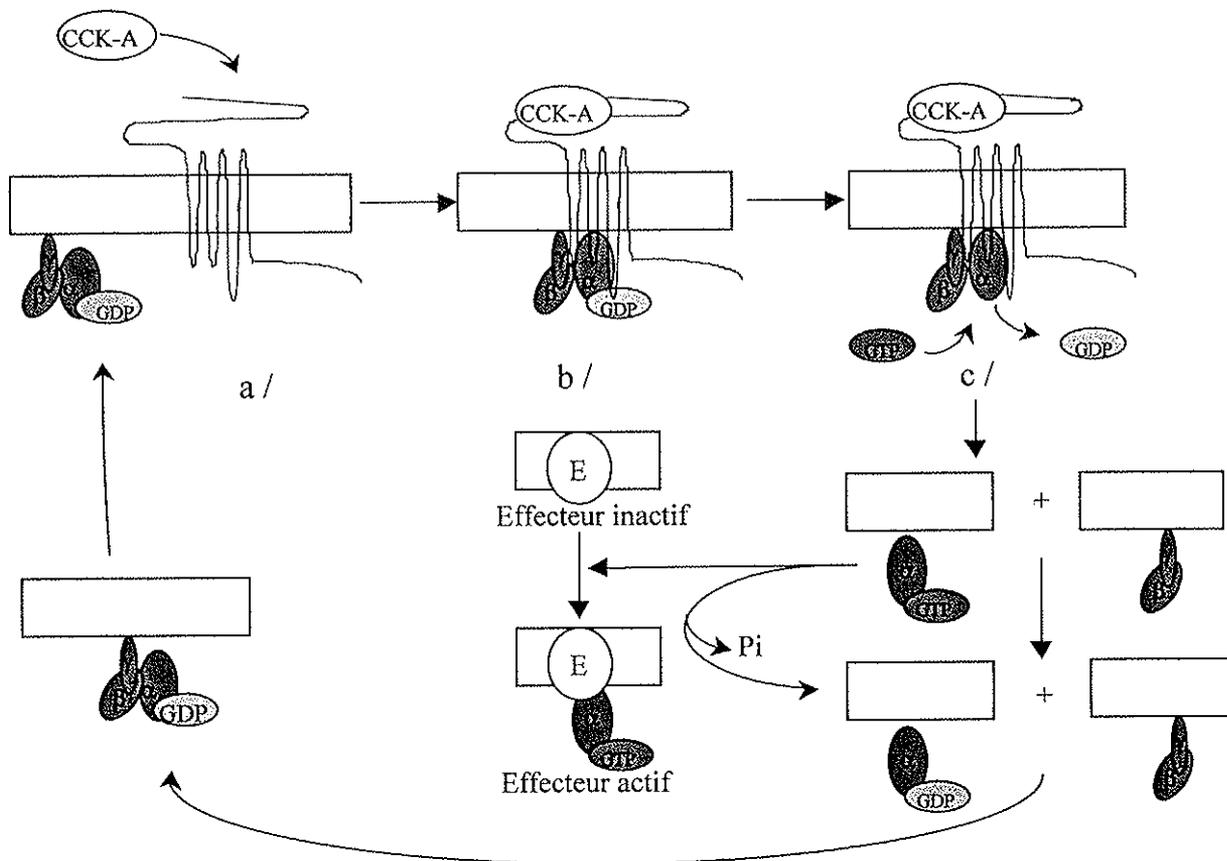


Figure 7 : Mode d'action d'un RCPG impliquant l'activation des protéines $G\alpha$ et / ou $G\beta\gamma$

I-2- Couplage de la protéine G avec la phospholipase C

La sous unité α -GTP, de type α_q ou α_{11} , active la $PLC\beta$. Ceci conduit à une hydrolyse des phospholipides membranaires, et plus particulièrement à la transformation de l'inositol bis-phosphate (PIP_2), en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) et 1,2-diacylglycérol (DAG).

L'augmentation de l' IP_3 serait induite par l'occupation des sites de basse affinité par la CCK-8 [18]. La libération d' IP_3 permet l'activation du récepteur à cette molécule du le réticulum endoplasmique, ce qui entraîne l'ouverture des canaux calciques et la libération des ions calcium (Ca^{++}).

En revanche, le JMV-180, étant antagoniste des sites de basse affinité, ne peut induire d'augmentation d'IP₃ [7].

Le JMV-180, induit une augmentation concentration-dépendante du calcium avec une efficacité deux fois moindre que la CCK-8 [14, 19]. Le calcium libéré permet l'activation de la calmoduline (CaM). Cette dernière, dans l'état conformationnel CaM-4Ca⁺⁺ active des protéines kinases CaM dépendantes, et permet la phosphorylation de protéines contenant des résidus sérine et tyrosine. (Cf. figure 8).

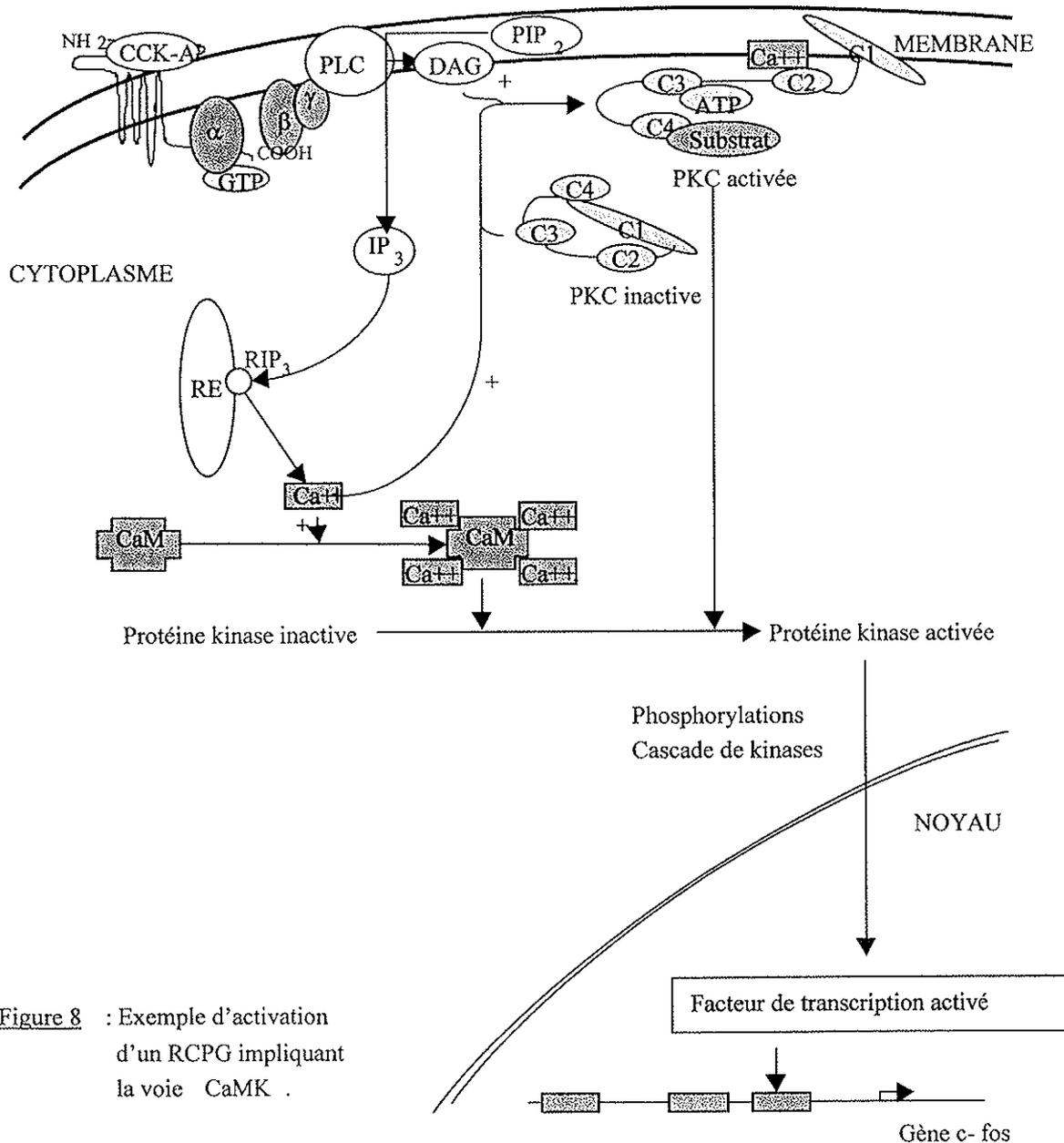


Figure 8 : Exemple d'activation d'un RCPG impliquant la voie CaMK .

D'autre part, de fortes concentrations en CCK-8 au niveau des acini pancréatiques provoquent une augmentation biphasique du taux de DAG qui reste sous-membranaire de par son hydrophobicité. Le premier pic survenant après cinq secondes, provient de l'hydrolyse du PIP₂, suite à la fixation de la CCK-8 sur les sites de basse affinité. Le second, survenant plus tard, provient de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine [10], et implique les sites de haute affinité.

Le DAG formé peut alors activer la PKC. Après translocation de cette dernière du cytoplasme vers la membrane, elle agit, entre autres, sur des protéines de régulation de la transcription pouvant aboutir à une régulation de la transcription.

II- ACTIVATION DES DIFFERENTES VOIES « MAP KINASE »

Le module « MAP Kinase » correspond à une cascade de kinases, qui permet la l'activation par phosphorylation de protéines, qui peuvent elles-mêmes posséder une activité de protéine kinase. Ce module renferme les voies p42-p44^{MAPK}, SAPK, et p38^{MAPK}.

Les signaux de transduction utilisent majoritairement des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation de protéines comme mécanisme de transmission des informations.

Les protéines kinases catalysent la phosphorylation, c'est à dire l'addition covalente de groupements phosphate à des acides aminés spécifiques (majoritairement les sérine, thréonine et tyrosine) à l'intérieur de protéines, alors que les phosphatases catalysent leur clivage par hydrolyse.

Les constituants du module MAP Kinase (« Mitogen Activated Protein Kinase ») font partie des protéines catalysant la phosphorylation. Ils sont eux même phosphorylés au niveau

des résidus tyrosine (Tyr ou Y), sérine (Ser ou S) et thréonine (Thr ou T), en réponse à un large panel de stimuli, de façon à permettre la transduction du signal de la surface cellulaire jusqu'au noyau. En dernier lieu est induite l'expression spécifique de gènes, par phosphorylation et activation des facteurs de transcription [20].

Il a été, jusqu'alors, identifié trois principales voies obéissant au module MAP Kinase [21, 22] :

- la voie p42^{MAPK}-p44^{MAPK} ou ERK1 et ERK2 (Extracellular Regulated Kinase)
- la voie p38^{MAPK}
- la voie JNK/SAPK (JNK : Jun N ter Kinase, SAPK : Stress Activated Kinase)

Ces kinases phosphorylent les résidus sérine (Ser ou S) et thréonine (Thr ou T) contenus dans la séquence consensus Ser/Thr-Pro, dictée par la Proline (Pro ou P) [23, 24].

II-1- Voie P42^{MAPK} - P44^{MAPK}

Les complexes $\beta\gamma$ des protéines Gq des RCPG fixées à la membrane, peuvent activer c-Ras, une petite protéine pouvant lier le GTP, selon des mécanismes voisins de ceux utilisés par les récepteurs à activité tyrosine kinase [25].

Les récepteurs couplés aux protéines G induisent une phosphorylation rapide de la protéine adaptatrice Shc sur les résidus tyrosine, via la protéine kinase C (PKC) [25]. Cette protéine Shc phosphorylée va alors recruter Grb₂ liée à la petite protéine sos, de façon à former le complexe [Shc-Grb₂-Sos]. Le complexe formé [Grb₂-Shc-Sos] va induire l'échange au niveau de Ras de GDP en GTP, de façon à le transformer en une configuration active. Il existe

cependant plusieurs voies d'activation des MAP Kinases, dont certaines sont Ras indépendantes, et d'autres, Ras dépendantes.

Ces dernières font intervenir la liaison de Ras-GTP à la MAP Kinase Kinase Kinase (c-Raf-1) localisée au niveau de la membrane plasmique [24]. c-Raf-1 alors activée phosphoryle les MAP Kinase Kinase, MEK1 et MEK2, contenant des inserts riches en proline sur le domaine C-terminal. A leur tour, les MEK 1/2 induisent spécifiquement la phosphorylation des $p42^{\text{MAPK}}$ - $p44^{\text{MAPK}}$ (ou ERK : « Extracellular signal Regulated Kinase », kinase régulée par les signaux extracellulaires) sur les résidus tyrosine et thréonine dans le motif Thr-Gly-Tyr (T-G-Y) [22, 26]. (Cf. figure 9).

Une fois activées les $p42^{\text{MAPK}}$ - $p44^{\text{MAPK}}$ peuvent phosphoryler un certain nombre de protéines dont la MAPK-Activated Protein Kinase-1 (MAPKAP-K1 ou $p90^{\text{RSK}}$), qui est une protéine sérine/thréonine kinase, et les Mnk1 et 2 (MAPK Interacting Kinase, kinase interagissant avec les MAPK). Les kinases $p42^{\text{MAPK}}$ - $p44^{\text{MAPK}}$ et MAPKAP-K1, se transloquent au noyau après activation, et phosphorylent, entre autres, différents facteurs de transcription [24], qui peuvent alors se fixer spécifiquement sur une des cassettes régulatrices de l'expression des gènes, et ainsi entraîner leurs expressions.

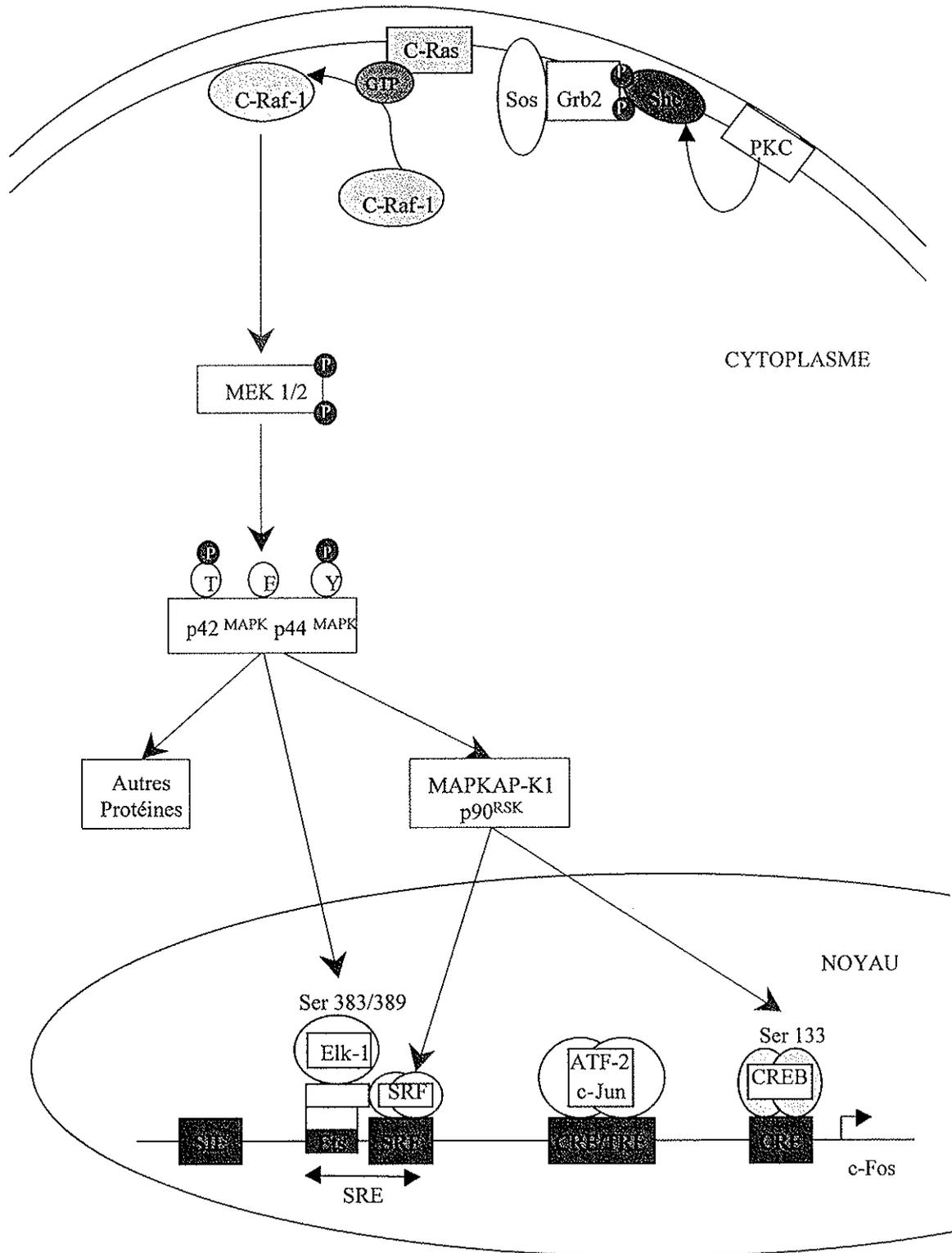


Figure 9 :Voie d'activation des p42 et p44 MAPK, conduisant à la phosphorylation des familles des facteurs de transcription Elk-1, et CREB. Le SRF est nécessaire à l'activation de la cassette SRE par Elk-1. Comme le montre cette figure, les facteurs ATF-2 et c-Jun ne sont théoriquement pas activés par cette voie.

Les facteurs de transcription activés par la voie p42-p44 MAPK sont :

- les protéines de la famille Elk-1 (par phosphorylation sur les sérines 383 et 389)
- les protéines de la famille CREB via la phosphorylation par p90^{RSK}

II-2- Voie JNK/SAPK

Cette voie, homologue à la précédente dans son ensemble, peut être activée par un large panel de stimuli comme les cytokines inflammatoires et les messagers du stress cellulaire (les ultraviolets, les chocs membranaires ...) [23].

La Jun N-terminal kinase a été au départ identifiée comme une kinase qui liait et phosphorylait le facteur de transcription c-Jun, à l'intérieur de son domaine d'activation NH₂-terminal, sur les sérines 63 et 73. Elle est activée par double phosphorylation sur les thréonines et tyrosines contenues dans le motif tripeptidique Thr-Pro-Tyr (T-P-Y), en réponse à l'activation des RCPG, par le stress cellulaire et certaines cytokines [24].

Cette voie fait intervenir les petites protéines liant le GTP, comme les protéines Rac, Rho et Ras, qui phosphorylent et activent la MEKK 1. Cette dernière va activer, par double phosphorylation, la SEK 1 ou MKK 4 et la SEK 4 ou MKK 7 [24]. Ces deux protéines, et préférentiellement SEK 4, activent la SAPK 1. Cette dernière passe dans le noyau et va phosphoryler les domaines de transactivation des familles de facteurs de transduction suivantes :

- Elk1 sur les sérines 383 et 389
- ATF-2 sur les thréonines 69 et 71
- c-Jun sur les sérines 63 et 73

Ce dernier peut alors se dimériser avec Fos ou ATF-2, qui, sous forme d'hétérodimère contrôle ainsi l'expression de nombreux gènes [27].

(Cf. figure 10).

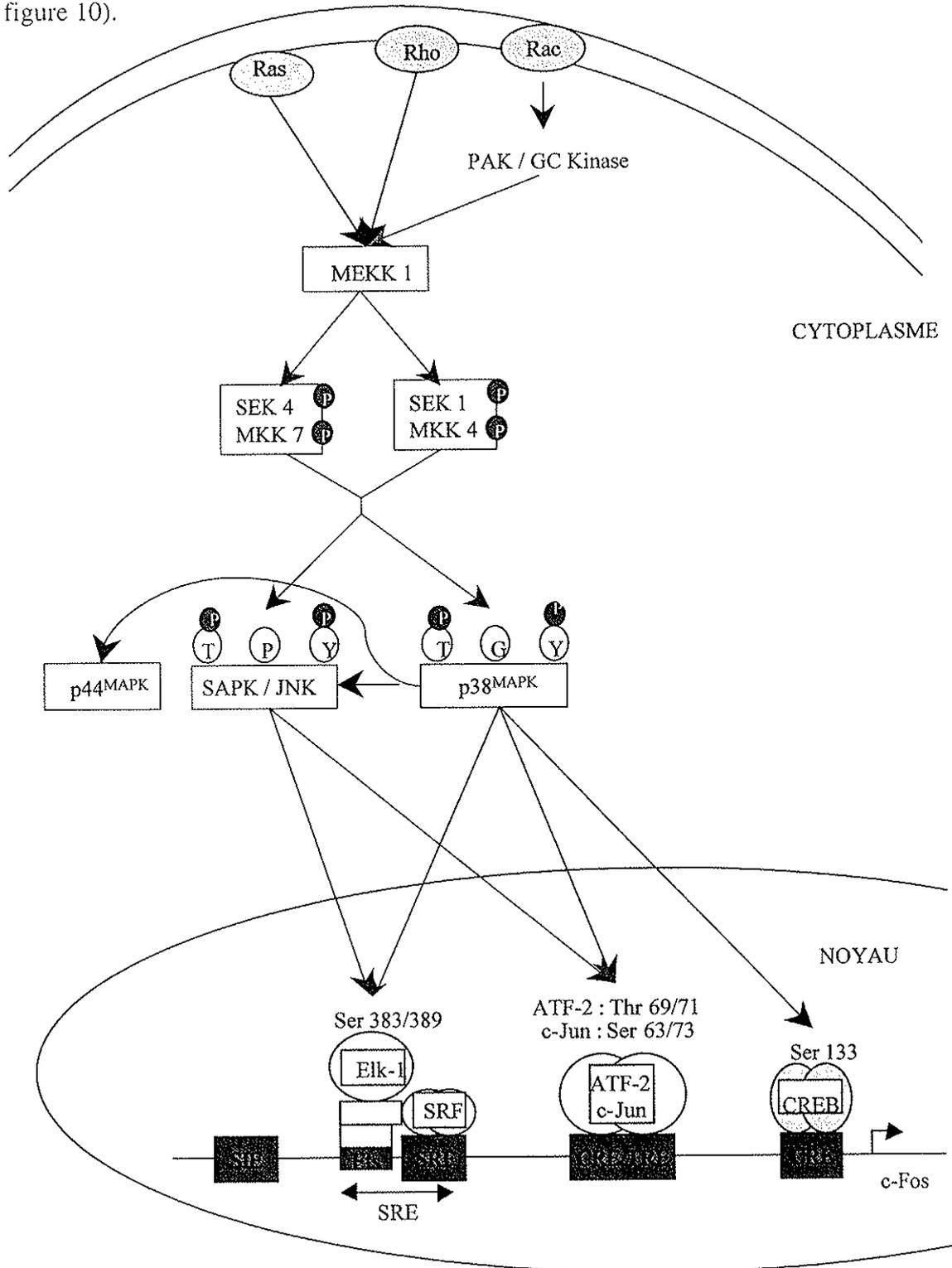


Figure 10 : Voie Jun N-terminal Kinase, conduisant à la phosphorylation des facteurs de transcription, Elk-1, Jun, ATF-2 et CREB, et à l'activation, au niveau du gène c-Fos, des cassettes régulatrices SRE, CRE/TRE et CRE.

II-3- Voie P38^{MAPK}

Tout comme la précédente voie, celle ci est activée par une multitude de stimuli du stress cellulaire, par des lipopolysaccharides et des cytokines.

L'activation par les cytokines de la p38^{MAPK}, également nommée SAPK 2a, passerait via les MEKK et les SEK, après activation de la petite protéine liant le GTP, Rac-1. L'activation des MEKK passe par une PAK/GC kinase. Les SKK 2 (ou MKK 3) et SKK 3 (ou MKK 6), sont à leur tour phosphorylées par des MEKK dont la nature est imprécise. Les SEK, issues de la voie JNK, et la MKK3 sont capables de phosphoryler la p38^{MAPK} sur les tyrosines et thréonines contenues dans le motif Tyr-Gly-Thr (Y-G-T). La p38^{MAPK} se trouve alors dans un état activé qui lui permet de stimuler la voie p42-p44^{MAPK} et de phosphoryler les facteurs de transcription Elk-1 (sur les sérines 383 et 389), CREB (sur la sérine 133) et c-Myc (sur la sérine 62). Parallèlement MKK 6 activée va induire la phosphorylation de MAPKAP-K2 et MAPKAP-K3 qui peuvent à leur tour stimuler la protéine CREB [28]. (Cf. figure 11).

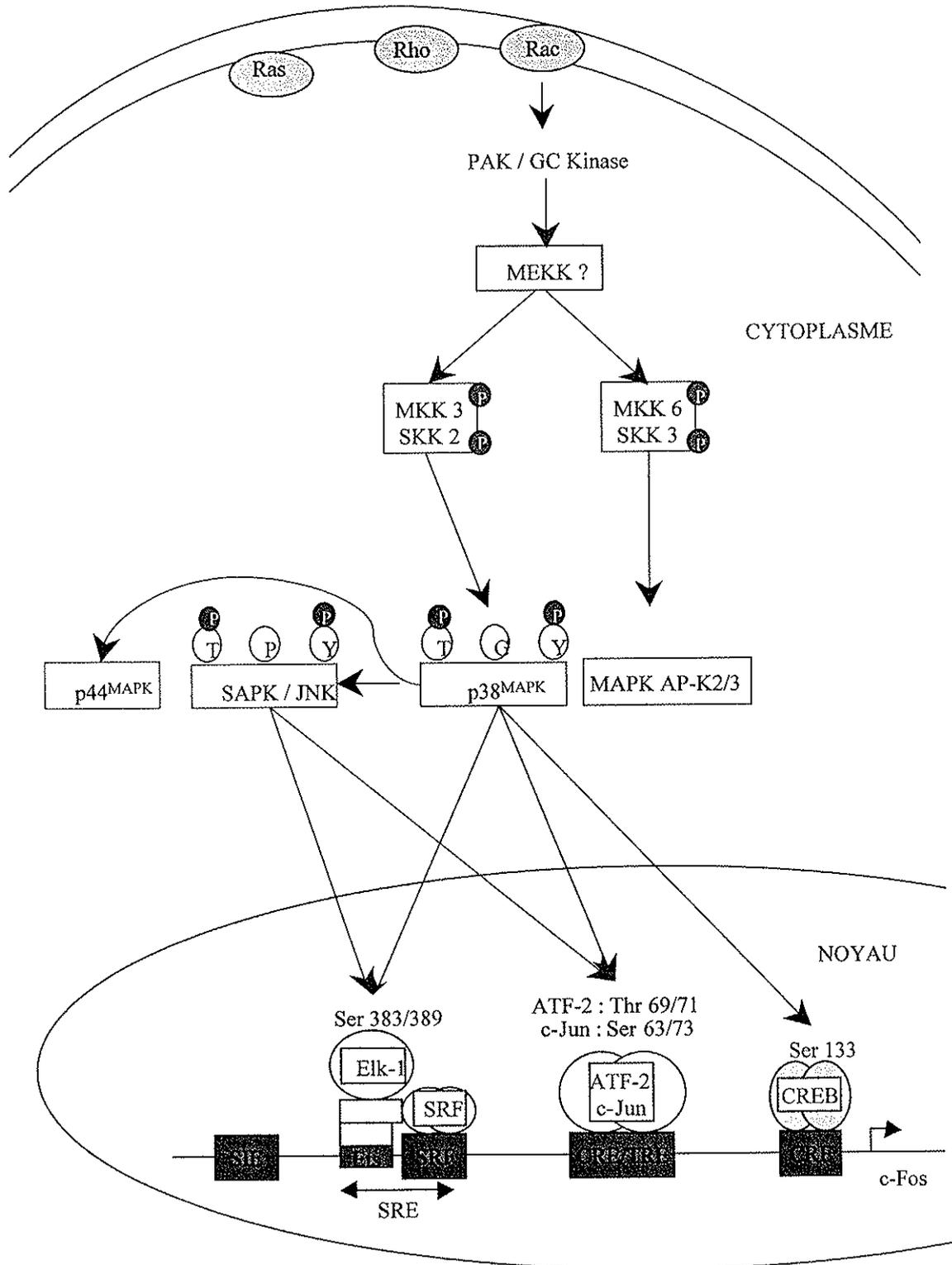


Figure 11 : Voie p38^{MAPK}, conduisant à la phosphorylation des familles de facteurs de transcription, Elk-1, c-Jun, ATF-2 et CREB, et donc à l'activation, au niveau du gène c-Fos, des cassettes régulatrices SRE, CRE/TRE et CRE.

III- FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU GENE C-FOS

L'activation des voies de transduction MAP Kinase résulte dans la phosphorylation des facteurs de transcription, comme Elk-1, c-Jun, ATF-2, et CREB, par les kinases terminales de ces cascades. Chacun de ces facteurs peut alors se lier aux cassettes régulatrices des gènes, via le DBD (DNA Binding Domain ou domaine de liaison à l'ADN), pour activer la transcription du gène.

III-1- Elk-1

La famille des protéines Elk-1 est un puissant substrat de la voie p42-p44^{MAPK}, mais elle peut être également phosphorylée par les kinases terminales des voies JNK et p38^{MAPK} sur différents sites de la partie COOH-terminale de son domaine d'activation de la transcription [29, 30, 31]. Elle fait partie de la famille des TCF (« Ternary Complex Factor » ou facteur de complexe ternaire), et possède, comme tous les membres de cette famille, sept motifs S/T-P caractéristiques des sites phosphorylables par les kinases dictées par la proline, et un domaine Ets. Ce dernier, fortement conservé, permet la liaison de séquences cibles. Dans le cas d'Elk-1, cette séquence est présente à la partie N-terminale, correspond au DBD [32].

La famille Elk-1, comme tout TCF, ne peut interagir de façon stable avec le SRE (élément de réponse du sérum), cassette localisée dans la partie régulatrice du gène codant entre autre pour la protéine c-Fos. Elle a besoin, pour ce faire, du recrutement d'un dimère du facteur de réponse du sérum liant le SRE : le SRF (« serum responsive factor » ou facteur de

réponse du sérum) [1, 31, 32, 33, 34]. Cette interaction Elk-1-SRF se fait au niveau de la « B-Box », encore appelée le « SRF-Binding Domain » (domaine de liaison au SRF) [30, 34].

La phosphorylation de ce facteur de transduction, a été montrée [31] comme facilitant la formation du complexe ternaire, formé du SRE, du SRF, et de Elk-1, et comme stimulant son aptitude à activer la transcription, sans toutefois affecter ses capacités de liaison à l'ADN.

C'est au niveau du domaine C, localisé à la partie C-terminale, que se trouve le site activateur de la transcription, constitué de cinq motifs S/T-P [33], régulé par les MAP Kinases [30]. Les deux autres motifs S/T-P se situent à l'extrémité carboxyterminale d'Elk-1 et sont indispensables à la régulation de son activité transcriptionnelle.

Plusieurs sites contenus dans le domaine C peuvent être phosphorylés par les p42-p44^{MAPK}, les JNK, et la p38^{MAPK}.

Outre la « B-Box », le DBD, et le domaine C, Elk-1 contient un autre domaine, le domaine D, localisé dans la partie N-terminale par rapport au domaine d'activation de la transcription. Il est nécessaire à une phosphorylation et à une activation efficace par les p42-p44^{MAPK}, et JNK/SAPK [35]. Toutefois, la liaison de JNK à Elk-1 n'est pas indispensable pour la phosphorylation de ce dernier [29]. La p38^{MAPK}, n'agit pas sur Elk-1 via ce domaine. (Cf. figure 12)



Figure 12 : Structure schématique de la protéine Elk-1 (d'après Treisman [1]). L'interaction avec l'ADN d'Elk-1 se fait via le domaine ETS. C'est au sein de la boîte C que se trouvent les sérines 383 et 389. Leur phosphorylation par les différentes voies de transduction du signal, est nécessaire à l'activation d'Elk-1. Le complexe ternaire est établi entre le SRE, séquence d'ADN liée par le domaine ETS de Elk-1, le SRF lié par le domaine d'interaction avec SRF d'Elk-1, et le facteur de transcription Elk-1.

III-2- c-Jun

L'activation de la famille des facteurs de transcription c-Jun se fait via la voie JNK/SAPK, par phosphorylation des sérines 63/73. Plusieurs études ont déjà montré qu'une interaction entre JNK et le sous-domaine δ de c-Jun est nécessaire à une phosphorylation efficace [34]. Ce sous-domaine δ , domaine de trente acides aminés, a peu d'homologie avec le domaine D d'Elk-1. Il se situe en amont des sites de phosphorylation à l'intérieur du domaine d'activation, côté NH₂-terminal. (Cf. figure 13).

C-Jun activé peut alors s'homodimériser ou s'hétérodimériser, selon un motif leucine-zipper (b-ZIP) [30], de façon à créer l'activateur AP-1, composé de l'homodimérisation des oncogènes nucléaires des familles Jun, ou de l'hétérodimérisation des oncogènes nucléaires des familles Jun avec ceux des familles Fos. L'association de ces protéines étant effective, les dimères formés peuvent alors interagir avec l'ADN.



Figure 13 : Structure schématique de la protéine c-Jun (d'après Treisman [1]). L'activation de ce facteur par la voie SAPK / JNK, se ferait via la phosphorylation des sérines 63 et 73, et probablement des thréonines 91 et 93. La liaison de la kinase serait médiée par le domaine delta.

Cependant, une nouvelle voie d'activation de ce facteur a été récemment décrite [36]. Celle-ci s'opère via le calcium et la calmoduline kinase IV. Cette voie, contrairement à la précédente, ne nécessite pas la phosphorylation des sérines 63 et 73 par SAPK 1, et reste indépendante du stress.

III-3- ATF-2

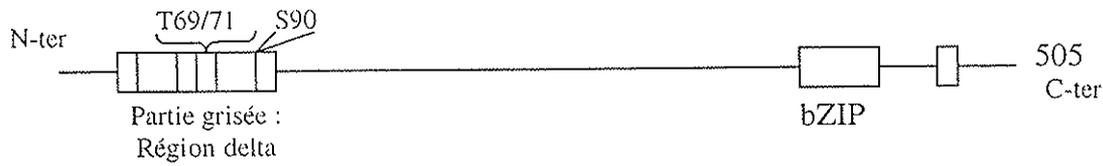


Figure 14 : structure schématique d'ATF-2 (d'après Treisman [1]). Son activation peut se faire par phosphorylation des thréonines 69 et 71, et de la sérine 90. Le domaine bZIP permet l'établissement de dimères, par formation d'une liaison de type fermeture éclair.

La famille des facteurs de transcription ATF-2 est activée par phosphorylation des thréonines 69 et 71, localisées à la partie NH₂-terminale du domaine d'activation, par les JNK et les p38^{MAPK} [29] (Cf. figure 14). Les trois constituants du module MAPK, peuvent se lier à ATF-2, mais seuls les voies de phosphorylation impliquant JNK et p38^{MAPK} peuvent l'activer [29]. ATF-2 est capable de s'hétérodimériser, selon un motif leucine-zipper avec c-Jun, de façon à activer la transcription du gène CRE/TRE, après liaison, à une cassette régulatrice de celui-ci.

III-4- CREB

La famille des facteurs de transcription CREB est constitué :

- ✓ d'un domaine d'activation,
- ✓ d'un domaine de dimérisation, qui permet les homodimérisations entre CREB et CREB mais aussi des hétérodimérisations entre CREB et ATF-2 par exemple,
- ✓ d'un domaine de liaison à l'ADN.

(Cf. figure 15)

Le domaine de trans-activation de la famille CREB est bipartite. Il est formé d'un activateur constitutif, Q2, riche en glutamine, et d'un domaine inductible par les kinases, KID, qui fonctionnent de façon synergique afin de stimuler l'expression du gène cible [29].

L'activation de CREB se fait par phosphorylation de la sérine 133, par les MAPKAP-K1, MAPKAP-K2, et les MAPKAP-K3.

Celle-ci peut se faire également via la protéine kinase A (PKA), l'AMPc et le calcium, sans modification de l'affinité de CREB pour le CRE (« cAMP Responsive Element » ou élément de réponse de l'AMPc) [36]. Cependant, ce facteur de transcription ne peut être phosphorylé, si la CBP (CREB Binding Protein) n'a pas été recrutée. Ce phénomène nécessite la phosphorylation de CREB sur la sérine 133.



Figure 15 : structure schématique de CREB (d'après Treisman [1]). Le domaine KID serait un substrat pour la protéine kinase A, et bZIP permet l'établissement de dimères, par formation d'une liaison de type fermeture éclair.

MATERIEL

ET

METHODES

I- BIOLOGIE MOLECULAIRE

I-1 Système gène « reporter »

Au vu des résultats acquis, l'étude du comportement différent des R-CCK_A de rat et de souris vis-à-vis de la molécule de JMV-180 s'est poursuivie par l'étude des voies de signalisation intracellulaire initiées par l'activation de ce type de récepteur (R-CCK_A). Pour cela, nous avons étudié l'expression de gènes dans des cellules eucaryotes HeLa en reliant une séquence promotrice à un gène « reporter » facilement décelable, comme par exemple celui qui code pour la luciférase, qui rentre dans la définition du gène « reporter » idéal, car d'une part, il n'est pas endogéniquement exprimé dans les cellules eucaryotes, et d'autre part, l'activité luciférase est facilement quantifiable par bioluminescence [38, 39, 40].

Les différents modèles d'expression nécessaires à notre étude furent obtenus par transfection transitoire, c'est à dire par introduction de plasmides, petits fragments d'ADN circulaire principalement d'origine bactérienne [36], contenant en fait deux grands types d'information :

- l'une de nature procaryote permettant la réplication du plasmide (la bactérie sera alors utilisée pour permettre la production du plasmides),
- l'autre, de nature eucaryote sera la copie fidèle d'un gène eucaryote type (partie régulatrice et partie structurale conduisant à l'expression constitutive ou régulée d'une protéine). Les gènes exprimés constitutivement dans les modèles cellulaires utilisés, sont les gènes codant pour le R-CCK_A, les protéines chimériques, ou les kinases, alors que le gène codant pour la luciférase a une expression régulée.

Les différents plasmides utilisés codent pour les R-CCK_A de rat et de souris, les facteurs de transcription chimériques Elk-1, c-Jun, ATF-2, et CREB. Pour ces constructions, la partie transactivatrice des protéines Elk-1 (acides aminés 307 à 428), c-Jun (acides aminés 1 à 223), ATF-2 (acides aminés 1 à 96), CREB (acides aminés 1 à 283) a été fusionné au DBD de la protéine Gal-4 de levure. Le gène « reporter » utilisé est le plasmide (17M)₅-Luciférase. Il permet la détection de toute activation transcriptionnelle de ces différents facteurs chimériques, une fois leur phosphorylation réalisée dans leur partie transactivatrice. Des plasmides entraînant l'expression constitutive des kinases MEK1, MEKK, et PKA ont été également transfectés. (Cf. figures 16 et 17).

Ainsi, suite à l'activation par phosphorylation par les différentes voies de transduction du signal des pôles transactivateurs des différents facteurs de transcription, seuls les chimériques pourront reconnaître la séquence (17M)₅ localisée dans la partie régulatrice du gène « reporter », et ainsi activer la transcription de la luciférase.

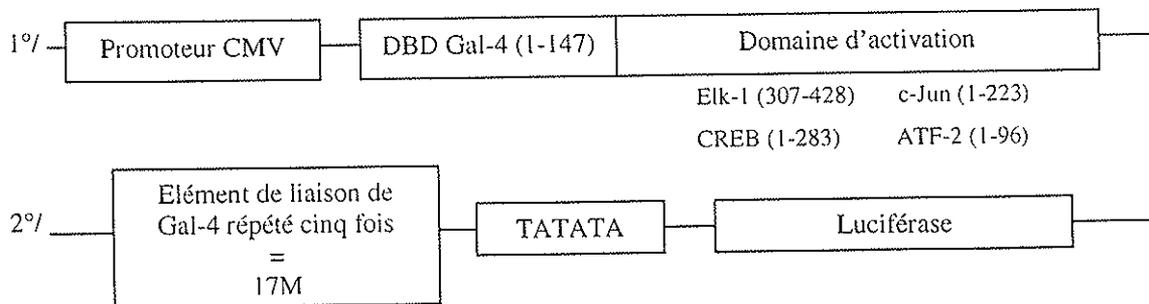


Figure 16 : représentation schématique des constructions d'ADN utilisées pour la stratégie gène « reporter » :

1 - ADN codant pour les facteurs de transcription chimériques étudiés, constitués d'un promoteur constitutif fort, (promoteur CMV), du domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal-4 de levure, et fusionné au domaine d'activation du facteur de transcription naturel.

2 - ADN codant pour le « reporter » luciférase, régulée par une partie promotrice contenant le séquence 17M répété cinq fois, et la cassette TATA.

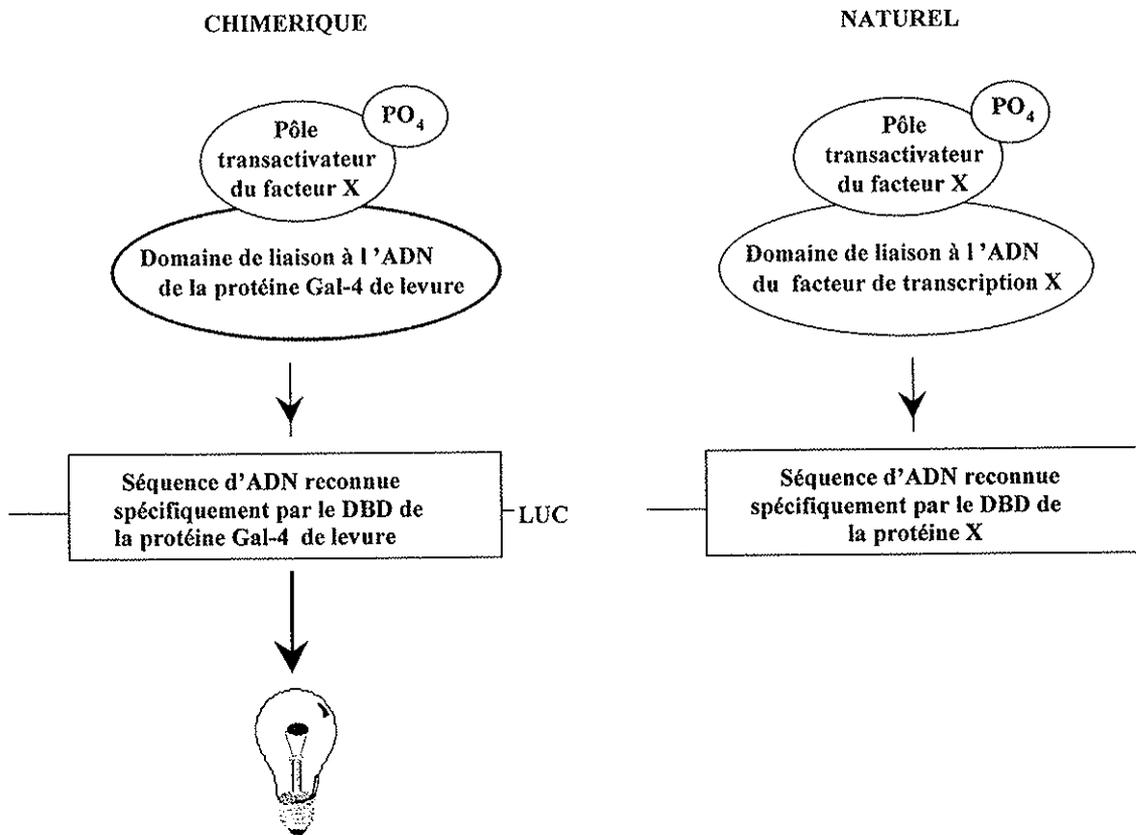


Figure 17 : Structures comparées des facteurs de transcription chimériques et naturels. L'activation des facteurs de transcription, quelle que soit leur nature, se fait par phosphorylation de leur pôle transactivateur. Ils sont ainsi capables d'activer la transcription de gènes, après leur fixation sur une cassette régulatrice de ces derniers. Il apparaît donc, que dans le système gène « reporter » utilisé, seul le facteur chimérique est apte, suite à sa fixation spécifique sur une cassette de levure, d'induire l'expression de luciférase. L'activité de cette dernière est mesurée, dans une réaction de bioluminescence, impliquant la dégradation dégradé la luciférine en produisant des photons.

Ainsi, la détermination de l'activité enzymatique de la luciférase par bioluminescence permet d'évaluer l'intensité d'activation de chaque facteur de transcription.

I-2- Transformation bactérienne

I-2-1- Principe

L'introduction de plasmides dans des bactéries se nomme la transformation bactérienne. L'ADN plasmidique est incorporé dans des bactéries dites « compétentes » comme *Escherichia Coli*. Cependant, il convient de ne sélectionner que les bactéries ayant incorporé le plasmide. Ceci se fait par culture de celles-ci sur milieu nutritif, de type LB, supplémenté en antibiotique auquel elles sont résistantes. Ainsi, seules les bactéries ayant incorporé le plasmide pourront se multiplier sur ce type de milieu. Celles-ci sont alors placées dans un volume plus important, de l'ordre de 500 mL, de milieu additionné d'antibiotique, de façon à ce qu'elles croissent, et que nous puissions extraire l'ADN plasmidique amplifié, après lyse bactérienne et purification alcaline. L'ADN amplifié est purifié par le kit Nucléobond, avant d'être transféré dans des cellules eucaryotes en culture, par transfection.

I-2-2- Protocole de transformation bactérienne

I-2-2-1- Mise en présence des bactéries avec l'ADN à incorporer, et choc thermique

Les réactions de transformation requièrent environ 1 ng d'ADN plasmidique. Les bactéries compétentes, stockées à -80°C, sont placées cinq minutes dans un bain de glace. Après homogénéisation des bactéries, 100 µL de ces cellules compétentes sont placées dans les tubes contenant l'acide nucléique à transférer. Chaque tube, après homogénéisation est placé dans la glace pendant dix minutes. Passé ce délai, les tubes sont immédiatement

plongés, pendant 45 à 50 secondes, dans un bain thermostaté à 42°C, puis replacé dans la glace pendant deux minutes. Le choc thermique ainsi créé permet l'incorporation d'ADN dans les bactéries.

Après avoir additionné 900 µL de milieu LB (voir composition en annexe) sans antibiotique à chaque tube, chacun est alors placé pendant une heure dans un bain thermostaté à 37°C et sous agitation.

I-2-2-2- Ensemencement des bactéries transformées sur du milieu LB-Agar avec antibiotique

Les bactéries transformées sont ensuite mises en culture sur milieu LB-Agar contenant l'antibiotique auquel elles sont résistantes, l'ampicilline ou un autre antibiotique selon le type de plasmide, à raison de 100 µL par boîte de Pétri. Il convient de faire au moins deux boîtes de Pétri par type d'ADN plasmidique. Le reste de bactéries transformées est placé dans 10 mL de milieu avec antibiotique, à 37°C sous agitation, pendant une nuit. Ces cultures serviront à faire des « Maxi-préparations », afin d'obtenir de grandes quantités d'ADN plasmidique, et à réaliser des sauvegardes bactériennes, appelées « stock glycérol », pour des expériences ultérieures.

I-2-2-3- Amplification de plasmides

Pour ce faire, il suffit d'isoler une colonie, de l'ensemencer dans un grand volume de milieu LB avec antibiotique, et de la placer sous agitation à 37°C pendant une nuit. Cette technique est appelée couramment « Maxi Préparation ». Lors de la « Maxi préparation », on peut faire une étape de contrôle du plasmide en le traitant avec certaines enzymes de

restriction, puis en effectuant un gel d'agarose. La taille des fragments obtenus confirmera que le plasmide est correct.

L'extraction de l'ADN plasmidique se fait après la lyse bactérienne.

I-2-2-3- Purification et extraction de l'ADN plasmidique

I-2-2-3-1- Obtention du culot bactérien

Les bactéries *Escherichia Coli* transformées, après la « Maxi préparation », sont centrifugées pendant dix minutes à 4°C, à la vitesse de 3000 tours par minute. Le surnageant est éliminé. L'extraction de l'ADN plasmidique se réalise à l'aide du kit Nucleobond PC500 (ref 740574).

I-2-2-3-2- Obtention du précipité d'ADN

Le culot bactérien est repris avec 12 mL de tampon S1 (voir composition des différents tampons en annexe), de façon à obtenir une suspension homogène. A cette suspension sont ajoutés 12 mL de tampon S2. Après cinq minutes, 12 mL de tampon S3 sont ajoutés au mélange. Ce dernier, après homogénéisation, est placé dans la glace pendant cinq minutes. C'est au cours de ces étapes que s'opère la lyse bactérienne.

Le contenu du tube est filtré sur papier filtre, puis à deux reprises sur laine de verre.

La colonne d'extraction est équilibrée avec 5 mL du tampon N2. La solution précédemment filtrée est versée sur la colonne. Cette étape permet à l'ADN d'être adsorbé. Une fois que le lysat est passé à travers la colonne, cette dernière est lavée à deux reprises avec 12 mL de tampon N3. L'élution de l'ADN se fait par ajout à deux reprises de 6 mL de tampon N5.

L'ADN élué est alors précipité avec 0.7 volume d'isopropanol. Après deux heures, les tubes sont centrifugés pendant trente minutes à 4°C, à la vitesse de 15000 g.

I-2-2-3-3- Lavage et solubilisation de l'ADN

Il est possible, après l'étape précédente, de visualiser le précipité. Après élimination du surnageant, celui-ci est lavé par 1 mL d'éthanol à 70% glacé, et chaque tube est centrifugé pendant cinq minutes à 4°C, à la vitesse de 10000 tours par minute. L'éthanol est éliminé. Après séchage du précipité à l'air libre, celui-ci est repris avec un volume de 250 µL d'eau. Ce volume est adapté au volume de la culture bactérienne (Maxi - préparation).

I-2-2-3-4- Détermination du titre de la solution d'ADN

Le titre de la solution d'ADN plasmidique est déterminé, après dilution, par la mesure sur spectrophotomètre de la densité optique (D.O.), à 260 nm, en tenant compte de la dilution effectuée, et du fait qu'une densité optique de 1 correspond à 50 µg/mL d'ADN.

I-2-3- Vérification de la pureté des ADN plasmidiques obtenus

I-2-3-1- Préparation d'un gel d'agarose à 0.8%

La pureté des ADN plasmidiques est estimée après migration sur gel d'agarose à 0.8%, dont la réticulation est adaptée au poids moléculaire des ADN. Ce dernier se fait par mélange à chaud de 0.8 g d'agarose et de 100 mL de tris-borate EDTA (tampon TBE 1X). Après léger refroidissement, 10 µL de bromure d'éthidium (BET) à la concentration de 10 mg/mL, sont rajoutés avec de grandes précautions, à cause de la très forte cancérrogénicité de

ce produit. La solution est coulée dans les supports plastiques. Après prise du gel, celui-ci est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X.

I-2-3-2- Préparation des dépôts d'ADN

Une dilution de la solution d'ADN plasmidique obtenue après extraction, est effectuée de façon à obtenir une concentration en ADN inférieure à $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

A $10 \mu\text{L}$ de cette solution diluée, sont ajoutés $2 \mu\text{L}$ de mélange bleu / orange 6X (Blue / Orange 6V Loading Dye, Promega Ref 7089212), de façon à pouvoir suivre la migration du dépôt.

I-2-3-3- Dépôt d'ADN

Le gel d'agarose à 0.8% est plongé dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 1X. Les dépôts d'ADN se font par injection méticuleuse et précise des solutions préparées, à raison de 10 à $15 \mu\text{L}$ dans les différents puits. L'ADN, chargé négativement, va migrer vers l'électrode positive.

Après migration, le gel est visualisé sous éclairage U.V. de façon à contrôler la taille et la nature de l'ADN étudié. Ce contrôle peut être complété par le contrôle de la taille des différents obtenus suite à l'action d'enzymes de restriction. (Cf. figure 18).

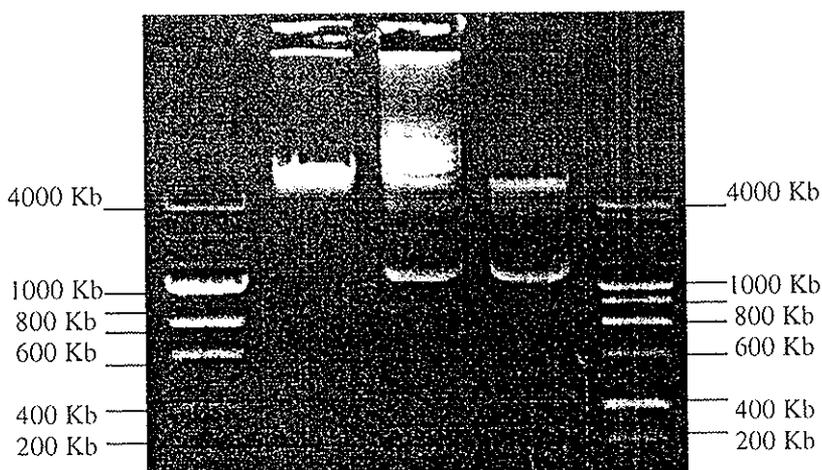


Figure 18 : Gel d'électrophorèse visualisé sous lumière U.V. ; les bandes extérieures correspondent aux marqueurs de poids moléculaire, et les trois bandes intérieures sont des analyses de pureté, de taille, et de nature de DNA obtenus après amplification bactérienne.

II- DETERMINATION DE L'ACTIVITE LUCIFERASE INDUITE PAR LES LIGANDS DANS DIFFERENTS MODELES CELLULAIRES ETABLIS

II-1- Culture cellulaire

II-1-1- Nature des cellules HeLa, et milieu requis pour leur culture

Les cellules HeLa, provenant d'un carcinome épithéloïde du col de l'utérus, sont des cellules adhérentes. Leur culture se fait dans du milieu DMEM, dont la composition est indiquée en annexe (p 33), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 0.5% de glutamine stérile (Gibco 25030-024), et 0.5% d'un mélange de pénicilline (10000 U.I/mL) et de streptomycine (10000 µg/mL) (Gibco 15140-024). L'incubation, dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂ est nécessaire au bon doublement cellulaire, qui s'effectue, généralement, toutes les 24 heures. La culture se fait en routine, dans des flacons T75 (Falcon ref. 3024), ou T150 (Falcon ref. 3028), pouvant contenir respectivement des volumes de milieu de 20 et 40 mL de milieu, et correspondant respectivement à confluence, à environ 20 et 40 millions de cellules.

II-1-2- Repiquage des cellules

Juste avant la confluence, les cellules sont repiquées. Pour ce faire, le tapis cellulaire est rincé une fois par un volume de 4 mL de trypsine-EDTA 1X (Gibco 25300-054) ou de milieu sans sérum, afin d'éliminer toute trace de sérum qui pourrait inhiber l'action ultérieure de cette dernière. 4 mL de trypsine sont ensuite placés sur le tapis cellulaire pour procéder au décollement des cellules HeLa. Le flacon est remplacé pour un temps d'environ cinq minutes,

dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂, jusqu'à ce que le décollement soit effectif. L'action de la trypsine est bloquée par l'ajout de 6 mL de milieu DMEM à 10% de SVF, pour éviter la survenue d'effets inhibiteurs du sérum.

Après détermination du nombre de cellules par millilitre sur cellule de Thoma, celles-ci sontensemencées dans les flacons contenant du milieu DMEM à 10% de SVF, en tenant compte de leur temps de doublement cellulaire, et du délai jusqu'à confluence des cellules.

II-2- Transfection

II-2-1- Principe

On appelle transfection, tout procédé d'introduction d'acides nucléiques dans des cellules, par des méthodes non virales, utilisant des réactions de nature chimique ou des procédés physiques. Les transfections sont ainsi à distinguer des infections, méthodes virales d'introduction des acides nucléiques dans les cellules.

Les objectifs d'une transfection sont variés et incluent :

- une haute efficacité de transfert d'acide nucléique dans les cellules utilisées,
- une intrusion et une interférence minimale avec la physiologie de la cellule,
- une faible toxicité,
- une facilité d'emploi,
- une bonne reproductibilité.

Les cellules HeLa, n'exprimant pas le R-CCK_A, sont co-transfectées avec différents plasmides afin d'étudier la voie de signalisation intracellulaire du R-CCK_A.

Les différents plasmides pouvant être transfectés sont les suivants :

- ✓ (17M)₅-Luc : plasmide « reporter » présent à chaque transfection. La séquence (17M) est reconnue spécifiquement par les facteurs de transcription chimériques, contenant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal-4 de levure.

- ✓ Les plasmides conduisant à l'expression de protéines chimériques contenant le DBD de la protéine Gal-4 de levure fusionné au domaine de transactivation des protéines Elk-1 (pFA-Elk-1 ; acides aminés 307 à 428), c-Jun (pFA-c-Jun; acides aminés 1 à 223), CREB (pFA CREB; acides aminés 1 à 283), ou ATF-2 (pFA-ATF-2; acides aminés 1 à 96). L'activation par phosphorylation de ces différentes protéines chimériques entraînera alors l'activité luciférase via, comme indiqué plus haut, la séquence 17M du plasmide « reporter » (17M)₅-Luc.

- ✓ Les plasmides d'expression des récepteurs de R-CCK_A de rat ou de souris, ainsi que leurs formes mutantes S1 et T15. Le mutant S1 correspond au récepteur de souris dans lequel la troisième boucle intracellulaire a été remplacée par celle du rat, alors que pour T15 celle-ci est constituée, des acides aminés 254 à 268 de souris, et 294 à 308 de rat.

- ✓ Les plasmides d'expression des kinases MEK1, MEK2, et PKA.

II-2-2- Méthodes d'introduction d'ADN plasmidique

II-2-2-1- Méthodes chimiques

Parmi les méthodes chimiques d'introduction d'ADN plasmidique, nous pouvons citer celles au DEAE dextran, au phosphate de calcium, et celles faisant intervenir l'utilisation des liposomes artificiels.

II-2-2-1-1- Transfection au D.E.A.E dextran

Le DEAE dextran fut utilisé pour la première fois par Vaheiri et Pagano en 1965 en tant que facilitateur, pour l'introduction de l'ARN du virus de la poliomyélite dans des cellules. C'est un polymère cationique qui s'associe avec les acides nucléiques, chargés négativement. Un excès de charges positives, généré par le complexe ADN/polymère, permet au complexe d'entrer en association avec la membrane cellulaire, chargée négativement. L'entrée du complexe dans la cellule est supposée être faite par endocytose.

Cette technique continue à être largement utilisée pour la transfection transitoire de génome viral, et de plasmides portant des séquences virales. Elle permet, en outre, l'utilisation de faibles taux d'ADN, mais elle peut malheureusement se révéler toxique vis à vis de certaines lignées cellulaires.

Cette méthode est couramment utilisée pour la transfection de cellules en suspension ou adhérentes par des acides nucléiques.

II-2-2-1-2- Transfection au phosphate de calcium

Cette technique, que nous avons utilisé lors de nos travaux, fut développée la première fois, en 1973, par Graham et Van der Eb, et est applicable aux cellules adhérentes. La co-précipitation de phosphate de calcium et d'ADN est une technique largement utilisée, car les composants sont de coût raisonnable, le protocole est réalisable sans de grandes difficultés, et différents types cellulaires peuvent être transfectés.

Le protocole impose de mélanger l'ADN avec du calcium, composé qui confère une protection contre les nucléases intracellulaires et du milieu, et d'ajouter de façon très progressive, un tampon HBS, tampon salin d'une solution de phosphate, et de laisser incubé à température ambiante.

Cette étape génère un précipité qui est dispersé sur les cultures cellulaires, et ensuite incorporé par endocytose.

II-2-2-1-3- Transfection par molécules polycationiques

L'ADN, chargé négativement, vient s'enrouler autour des molécules polycationiques utilisées pour la transfection. La formation d'un tel complexe, permet une entrée facilitée dans les cellules, qui se fait par endocytose. A titre d'exemple, nous pouvons citer comme molécule polycationique utilisée pour la transfection d'acides nucléiques, le transfectan, et la lypofectamine.

II-2-2-2- Méthodes physiques

II-2-2-2-1- Transfection par Micro Injection directe

La Micro Injection directe dans les cellules cultivées ou directement dans les noyaux, est une technique laborieuse, mais efficace, pour introduire des molécules dans les cellules. Elle impose de traiter les cellules une à une. Elle peut être applicable pour l'introduction de protéines, mais n'est pas envisageable pour la transfection d'acides nucléiques.

II-2-2-2-2- Transfection par électroporation

Cette technique est généralement utilisée pour l'introduction d'acides nucléiques habituellement résistante aux techniques plus douces, ou afin d'augmenter le rendement de transfection. Le procédé d'introduction dans les cellules, est basé sur la perturbation générée au niveau de la membrane par une impulsion électrique. Celle-ci provoque au sein de la membrane plasmique, la formation de pores de quelques nanomètres de diamètre. Les acides nucléiques sont incorporés directement dans le cytoplasme, par ces pores. Cependant, compte tenu de la toxicité du rouge de phénol pour les cellules, il conviendra de n'utiliser que des milieux dépourvus de ce composé.

II-2-2-2-3- Transfection par libération de particules biologiques

Cette méthode confère un haut rendement d'introduction d'acides nucléiques dans les cellules cibles, via des micro projectiles. Elle est surtout utilisée pour la transfection d'acides nucléiques dans les tissus.

L'ADN à transférer est fixé sur des billes d'or (ou constituées par un autre métal noble), et l'ensemble est placé dans un flux d'Argon afin de bombarder les cellules à transférer. Avant de percuter les cellules, les particules de métal sont arrêtées, et laissent seul l'ADN percuter les cellules.

II-2-2-2-4- Transfection par fusion de protoplaste

Les protoplastes sont préparés à partir de bactéries portant l'acide nucléique voulu. Les bactéries sont mises en culture en présence de chloramphénicol de façon à amplifier l'ADN plasmidique. Elles sont ensuite traitées au lysosyme pour détruire leur membrane. Les protoplastes sont centrifugés sur une couche monocellulaire de cellules eucaryotes, et le mélange obtenu est traité au polyéthylène glycol (PEG) pour favoriser la fusion. Pendant cette étape, les acides nucléiques plasmidiques et bactériens sont transférés dans la membrane. Le PEG est éliminé, et les cellules sont incubées dans du milieu de culture supplémenté en antibiotique, de façon à inhiber la croissance des bactéries survivantes.

II-2-3- Facteurs influençant l'efficacité des transfusions

Divers paramètres peuvent influencer le taux de transfection, outre la méthode ou les réactifs utilisés. Parmi eux, nous pouvons citer la santé des cellules, le degré de confluence, le nombre de passage, ainsi que la qualité et la quantité d'ADN. L'acide nucléique ne doit comporter aucune contamination, que celle-ci soit protéique, chimique, ou due à la présence d'ARN (acide ribonucléique).

II-2-4- Protocole de transfection des cellules HeLa au phosphate de calcium

Pour la transfection transitoire des cellules HeLa, nous avons utilisé la technique de co-précipitation de phosphate de calcium avec les différents plasmides. Celle-ci se fait dans des boîtes de Pétri, contenant un nombre de cellules approprié à l'ensemencement ultérieur des boîtes de 24 puits, soit 250 000 cellules par puits.

(Cf. tableau III pour les quantités de plasmide transfectées).

Type de molécule		Quantité transfectée
Récepteur à la CCK de type A	Rat	0.2 µg/point
	Souris	
	Mutant S1	
	Mutant T15	
Facteur de transcription	Gal4-Elk-1	0.75 µg/point
	Gal4-c-Jun	
	Gal4-CREB	
	Gal4-ATF-2	
Kinases	MEK	0.05 µg/point
	MEKK	
	PKA	

Tableau III : Quantités de plasmides à transfecter pour l'établissement d'un modèle cellulaire, en transfectant de façon transitoire 250 000 cellules.

II-2-4-1- Ensemencement des cellules en boites de Pétri pour la transfection

Les cellules, cultivées en flacons sont décollées par « trypsinisation », selon le même protocole décrit pour la culture cellulaire, puis centrifugées pendant 5 minutes à une vitesse inférieure à 1000 tours par minute afin de ne pas lyser les cellules. Le surnageant est éliminé, et le culot cellulaire repris par un volume de 2 mL de milieu DMEM à 10% de SVF. Après une parfaite homogénéisation des cellules, du milieu DMEM à 10% de SVF est ajouté, de façon à pouvoir ensemercer les boites de pétri à raison de 10 mL du mélange milieu-cellule par boite. Une boite de Pétri est requise pour chaque type de co-transfection.

II-2-4-2- Préparation des précipités

Une heure et demie après l'ensemencement, les précipités sont préparés et déposés sur les cellules en pleine phase d'adhérence. Pour ce faire, dans des tubes à hémolyse, à 500 μ L d'une solution de chlorure de calcium 0.25 M préparée extemporanément à partir d'une solution de CaCl_2 2M, sont ajoutés les plasmides dans les quantités exprimées dans le tableau III. Puis, 500 μ L de solution HBS 1X (voir la composition en annexe), sont additionnés goutte à goutte et sous faible agitation, de façon à générer un précipité dont les cristaux aient une taille assimilable par endocytose par les cellules HeLa. L'ajout du précipité se fait après trente minutes d'attente à température ambiante.

II-2-4-3- Mise en boîtes de 24 puits des cellules transfectées (Falcon n°3047)

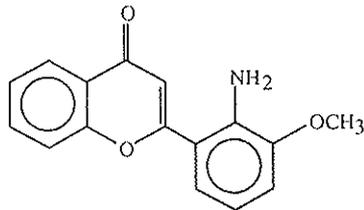
Après une nuit d'incubation, le précipité et le milieu sont éliminés, et les cellules décollées par « trypsinisation », puis centrifugées. Le culot cellulaire est remis en suspension dans un volume de milieu DMEM à 10% de SVF en accord avec le nombre de puits à ensemercer, sachant qu'un puits reçoit 1 mL de mélange milieu-cellule.

II-2-4-4- Remplacement du milieu à 10% de sérum, par du milieu DMEM à 0.3% de SVF

Dès l'adhérence des cellules, c'est à dire après un délai de quatre heures, les cellules sont lavées par du milieu sans sérum, puis, remises à incuber avec 400 μ L de milieu DMEM à 0.3% de SVF, de façon à diminuer le bruit de fond généré par la présence de nombreux facteurs de croissance. Des inhibiteurs de kinase, en solution dans le milieu à 0.3% de SVF à la concentration de 5 μ M, peuvent être mis en contact à ce moment là avec les cellules. Ceux-ci nous permettent d'inhiber certaines voies de signalisation, et donc de mieux connaître les effets de la CCK-8 et du JMV-180 quant à leur impact sur les différentes voies de signalisation.

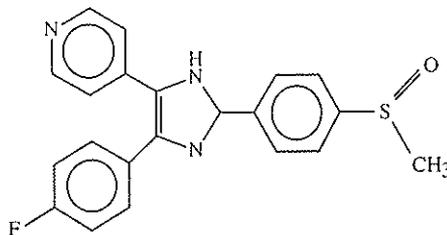
Parmi les inhibiteurs connus, nous avons utilisé :

- la molécule PD 98059, ou 2'-amino-3'-methoxyflavone, qui est un inhibiteur sélectif de la MEK, bloquant de ce fait l'activation des MAP Kinases, et la phosphorylation consécutive des substrats de la MEK 1.



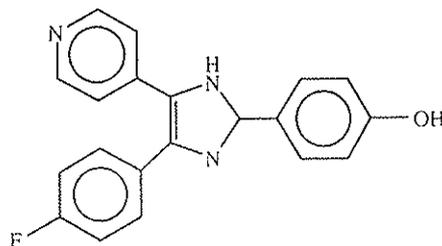
PD 98059

- la molécule SB 203580, ou [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole], qui est un inhibiteur hautement spécifique de la p38^{MAPK}. Il supprime l'activation de la MAPK AP-K2, mais n'inhibe pas JNK et p42^{MAPK}.



SB 203580

- la molécule SB 202190, ou [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole], qui est un puissant inhibiteur, mais moins sélectif que le précédent, de la p38^{MAPK}. Il inhibe l'activité de la p38β^{MAPK}, et la phosphorylation de ATF-2 par la p38^{MAPK}.



SB 202190

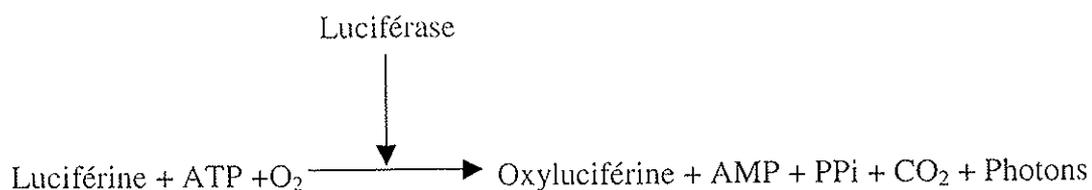
II-2-4-5- Ajout des ligands

Ce n'est que le lendemain matin que sont ajoutés les ligands, à des concentrations de 30 nM pour la CCK-8, et 3 μ M pour le JMV-180. Les cellules sont lysées après six heures de contact. Deux lavages préliminaires avec du PBS 1X sont nécessaires afin d'éliminer toute trace de rouge de phénol contenu dans le milieu DMEM, qui pourrait moduler l'activité de la luciférase. Celle-ci peut être également inhibée par les sels du tampon PBS 1X, c'est pourquoi un séchage doit être effectué avec une grande attention. Le tampon de lyse 1X (Promega LT#9726701), est ajouté sur les tapis cellulaires, à raison de 200 μ L par puits. L'extrait cellulaire est récupéré après environ 10 minutes, et servira à la détermination de l'activité luciférase par bioluminescence.

II-3- Mesure de l'activité luciférase

II-3-1- *Principe*

La mesure de l'activité luciférase par bioluminescence, est une alternative aux autres systèmes gène « reporter », extrêmement sensible, rapide, facile à mener et non radioactive. La luciférase, catalyse la décarboxylation oxydative, ATP et magnésium dépendante, de la luciférine, produisant une émission de photons à une longueur d'onde de 562 nm [41].



Ainsi, à l'extrait cellulaire obtenu après lyse des cellules, est ajouté le tampon de flash luminescence, contenant de l'ATP, du magnésium, et le substrat de l'enzyme, la luciférine. Ceci implique une homogénéisation et une mesure des photons générés rapide. La cinétique de luminescence se présente sous forme de flash, avec un pic bref et intense après 0.3 à 0.5 seconde. La durée du signal peut être augmentée par l'ajout, au tampon précédent, de coenzyme A (CoA). Le tampon obtenu est appelé tampon « enhancement luminescence ».

La mesure de luminescence est effectuée à l'aide d'un luminomètre (LKB Wallac 1251) muni d'un système d'injection (LKB Wallac 1291 dispenser). Chaque tube contenant le lysat cellulaire est traité individuellement lors de l'injection du tampon de luminescence.

II-3-2- Protocole expérimental

Pour cette détermination, 100 µL de lysat cellulaire sont introduits dans les tubes de luminescence, chaque tube correspondant à un puits. Les tubes sont automatiquement introduits dans le luminomètre, et 100 µL de tampon de détection supplémenté en CoA de façon à augmenter la durée du signal (cf. composition en annexe), sont ajoutés à l'aide d'un injecteur. L'activité luciférase est déterminée en intégrant le signal de luminescence pendant 15 secondes. L'aire sous la courbe obtenue, nous permet de déterminer la luminescence, exprimée en unités arbitraires (U.A.), et de calculer des facteurs d'induction des ligands par rapport aux témoins. Pour la représentation des résultats, nous avons choisi d'utiliser les facteurs d'induction calculés par le rapport des unités arbitraires relevées en présence de la CCK ou du JMV-180, et de celles relevées dans les modèles témoin.

$$\text{F.I.} = \frac{\text{Unités Arbitraires de luminescence des cellules traitées par la CCK-8 ou le JMV-180}}{\text{Unités Arbitraires de luminescence des cellules non traitées}}$$

RESULTATS

ET

DISCUSSION

RESULTATS

ET

DISCUSSION

Dans les prochaines explications les termes suivants signifient :

Modèle « Rat témoin » : Cellules HeLa transfectées par le gène « reporter » (17M)₅-Luciférase, ainsi qu'avec les plasmides d'expression du R-CCK_A de rat, et du facteur de transcription chimérique. Ces cellules sont ensuite, soit non traitées (contrôle), soit incubées en présence de JMV-180, ou de CCK-8.

Modèle « Rat MEK 1 » : Cellules HeLa transfectées par le gène « reporter » (17M)₅-Luciférase, ainsi qu'avec les plasmides d'expression du R-CCK_A de rat, du facteur de transcription chimérique, et de la kinase MEK1, de façon à sur-exprimer cette dernière dans les cellules. Celles-ci sont ensuite, soit non traitées (contrôle), soit incubées en présence de JMV-180, ou de CCK-8.

Modèle « Rat MEKK » : : Cellules HeLa transfectées par le gène « reporter » (17M)₅-Luciférase, ainsi qu'avec les plasmides d'expression du R-CCK_A de rat, du facteur de transcription chimérique, et de la kinase MEKK, de façon à sur-exprimer cette dernière dans les cellules. Celles-ci sont ensuite, soit non traitées (contrôle), soit incubées en présence de JMV-180, ou de CCK-8.

Modèle « Rat PKA » : Cellules HeLa transfectées par le gène « reporter » (17M)₅-Luciférase, ainsi qu'avec les plasmides d'expression du R-CCK_A de rat, du facteur de transcription chimérique, et de la kinase PKA, de façon à sur-exprimer cette dernière dans les cellules. Celles-ci sont ensuite, soit non traitées (contrôle), soit incubées en présence de JMV-180, ou de CCK-8.

Il en est de même pour les appellations concernant les récepteurs de souris, S1 et T15.

I- RESULTATS

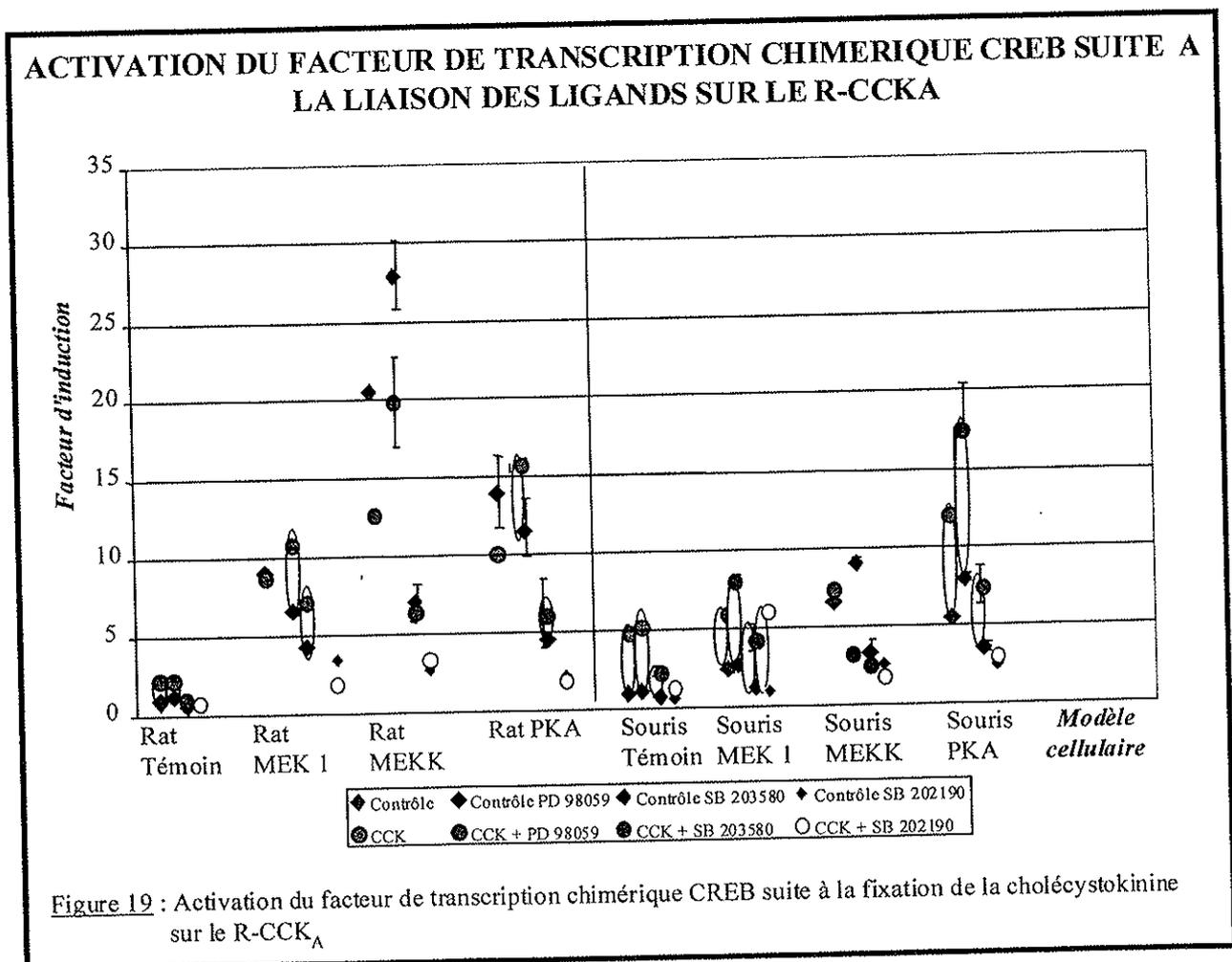
Quel que soit le modèle cellulaire de l'expérience, tous possèdent en coexistence des facteurs de transcription naturels et chimériques que nous avons transfecté. Seuls ces derniers peuvent, comme cela a déjà été expliqué précédemment, lier la séquence 17M localisée dans la partie régulatrice du gène « reporter » (17M)₅-Luciférase utilisé, et déclencher l'expression de l'enzyme.

Toutes les études ont été menées par réalisation de trois points (« triplicate ») pour chaque élément étudié, et en utilisant comme ligand la CCK-8 sulfatée ou le JMV-180. Les concentrations de ces deux molécules, déterminées par des expériences antérieures de liaison, sont respectivement de 30 nM et de 3 µM. Pour chaque modèle cellulaire établi, a été étudié l'effet d'inhibiteur de voies de transduction du signal, sur la réponse induite par la CCK-8 ou le JMV-180. Aussi, afin de permettre des comparaisons rigoureuses au sein d'un même modèle cellulaire, des témoins sans ligand mais avec les différents inhibiteurs (PD 98059, SB 203580, SB 202190), ont été réalisés pour tous les points étudiés. Les valeurs représentées

dans les graphiques suivants correspondent à des moyennes des facteurs d'induction calculés à partir des triplicates réalisés pour chaque item.

I-1- Activation du facteur de transcription chimérique CREB par les ligands

Quel que soit le modèle cellulaire étudié, aucune induction de l'activation de CREB n'a été observée avec le JMV-180. De ce fait, nous n'avons pas reporté sur la figure 19 les points obtenus avec cette molécule. Seules des réponses significatives, matérialisées par des ronds ont été obtenues avec la CCK-8 sulfatée.

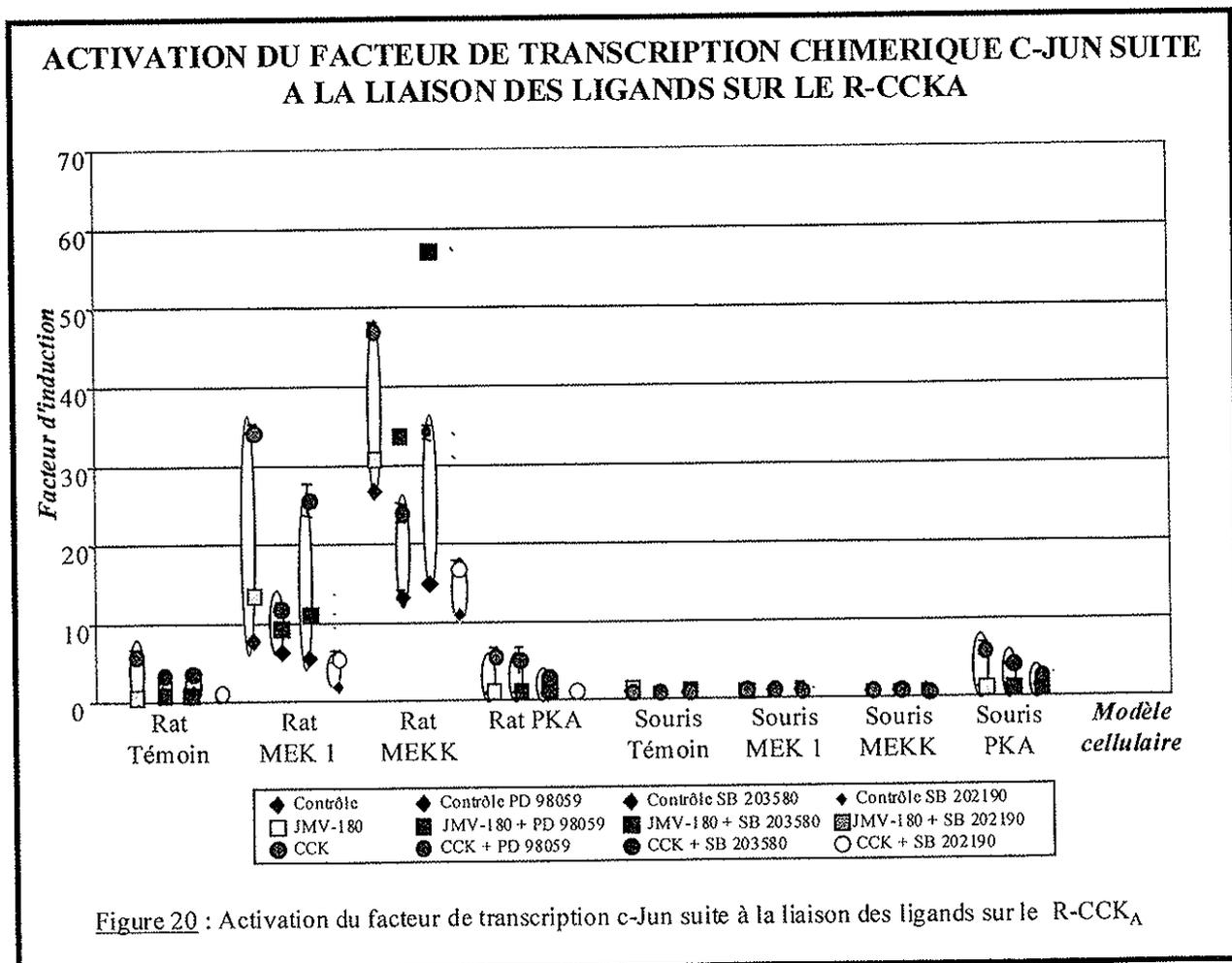


La figure 19 montre une activation de CREB par la CCK-8 supérieure chez la souris à celle de rat dans le modèle témoin. En effet, l'induction par rapport au contrôle, matérialisé par un losange, est de 4.8 chez la souris alors qu'elle s'élève à 2.25 chez le rat. La surexpression de la kinase MEK 1, favorisant la voie p42-p44^{MAPK} (se référer à la figure 9), provoque une annulation du signal généré par la CCK-8 chez le rat. Au contraire l'induction provoquée par cette même molécule chez la souris n'est pas modifiée par rapport au signal obtenu avec le modèle « souris témoin ». La surexpression de MEKK masque l'effet inductif de la CCK-8, que ce soit chez le rat ou la souris. Cependant, nous pouvons observer des signaux de contrôle en présence d'un excès de MEKK, reproduisant et même dépassant les signaux obtenus avec la CCK-8 sur les modèles témoins et MEK 1. La surexpression de PKA dans les modèles cellulaires n'induit pas chez le rat, en dehors de la présence des inhibiteurs, de signal significatif avec la CCK-8. Il n'en est pas de même chez la souris, où l'on peut observer une induction de 2 par rapport au contrôle. De plus, la mise en contact des différents modèles cellulaires avec l'inhibiteur de la phosphorylation de MEK 1, le PD 98059, n'a révélé aucune diminution des signaux obtenus avec les différents modèles cellulaires. En revanche, l'utilisation de SB 202190 et SB 203580 a provoqué, quel que soit le modèle cellulaire, une forte inhibition de la réponse induite par la CCK-8. Celle-ci avoisine les 100% en présence de SB 202190 et SB 203580, quel que soit le modèle cellulaire où le R-CCK_A de rat est exprimé. Le même résultat est observé quand le R-CCK_A de souris est exprimé, sauf quand il y a surexpression de MEK 1. Dans tous les cas, l'inhibition générée par SB 203580 est puissante mais moins intense par rapport à celle du SB 202190.

I-2- Activation du facteur de transcription chimérique c-Jun par les ligands

Contrairement à CREB, un léger effet du JMV-180, matérialisé par un rectangle, est observé sur l'activation de ce facteur de transcription. La figure 20, nous révèle une activation du R-CCK_A de rat par la CCK-8 qui n'est pas retrouvée chez la souris, sauf avec la surexpression de la PKA.

Le signal induit par la CCK-8 dans le modèle « rat témoin » est toutefois relativement faible. Cette induction est très fortement augmentée par la surexpression des kinases, que ce soit MEK 1 ou MEKK. La surexpression de PKA reproduit le signal obtenu dans le modèle « rat témoin ». Il est à remarquer qu'aucune réponse n'est observée en présence du R-CCK_A de souris. Seule la surexpression de PKA permet une activation significative de c-Jun chez cette espèce. Dans ce dernier cas, le profil de réponse dû au R-CCK_A de souris se rapproche de celui observé en présence du R-CCK_A de rat.



L'effet du JMV-180, contrairement à la CCK-8, n'est observable chez le rat qu'après la surexpression des kinases MEK 1 et MEKK. Aucune induction par le JMV-180 n'a été mise en évidence dans les modèles témoins et PKA. Dans les modèles « rat MEK 1 » et « rat MEKK » en dehors de toute présence d'inhibiteur, la réponse induite par le JMV-180 reste à 25% de celle observée avec la CCK-8. L'ajout d'inhibiteurs, que ce soit PD 98059 ou SB 203580, provoque, dans le modèle MEKK seulement, une augmentation intense de la réponse induite par le JMV-180. Dans le modèle « rat MEK 1 », aucune inhibition du signal induit par le JMV-180 n'a été observée. D'autre part, il a été mis en évidence que sur les signaux induits par la CCK-8 seuls PD 98059 et SB 202190, étaient capables de générer une réelle inhibition, avec une intensité plus forte pour le second. Cependant, dans les modèles PKA sont observés une perte de l'effet du PD 98059 et un effet inhibiteur de SB 203580

I-3- Activation du facteur de transcription chimérique ATF-2 par les ligands

L'analyse de la figure 21, nous révèle que seule une réponse dans les modèles MEKK est observable.

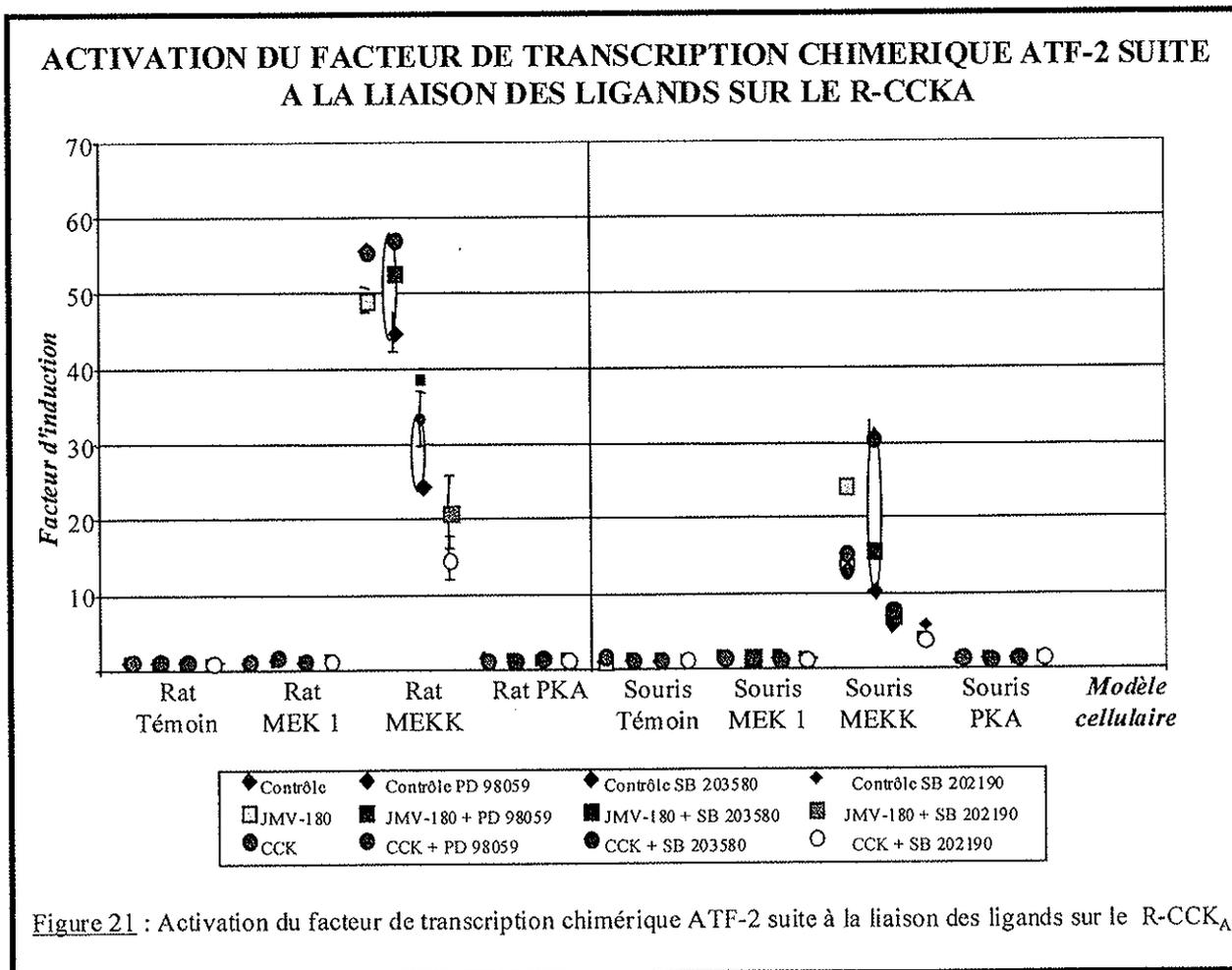
Tout comme pour le précédent facteur, un effet du JMV-180 est observé.

Dans les modèles MEKK, l'induction générée par la CCK n'est pas significativement différente des contrôles, en dehors de toute présence d'inhibiteur. L'ajout, dans le modèle « rat MEKK » des inhibiteurs PD 98059, SB 203580, et SB 202190 à la CCK-8, permet une activation de ATF-2 significativement différente du contrôle. De plus, SB 203580 et SB 202190, induisent, chez la souris une inhibition de près de 100%, alors qu'elle est nulle chez le rat.

En ce qui concerne l'autre ligand, la molécule de JMV-180, aucun effet n'est observé chez le rat, alors que chez la souris, il permet l'induction de ATF-2 de façon significativement différente du contrôle.

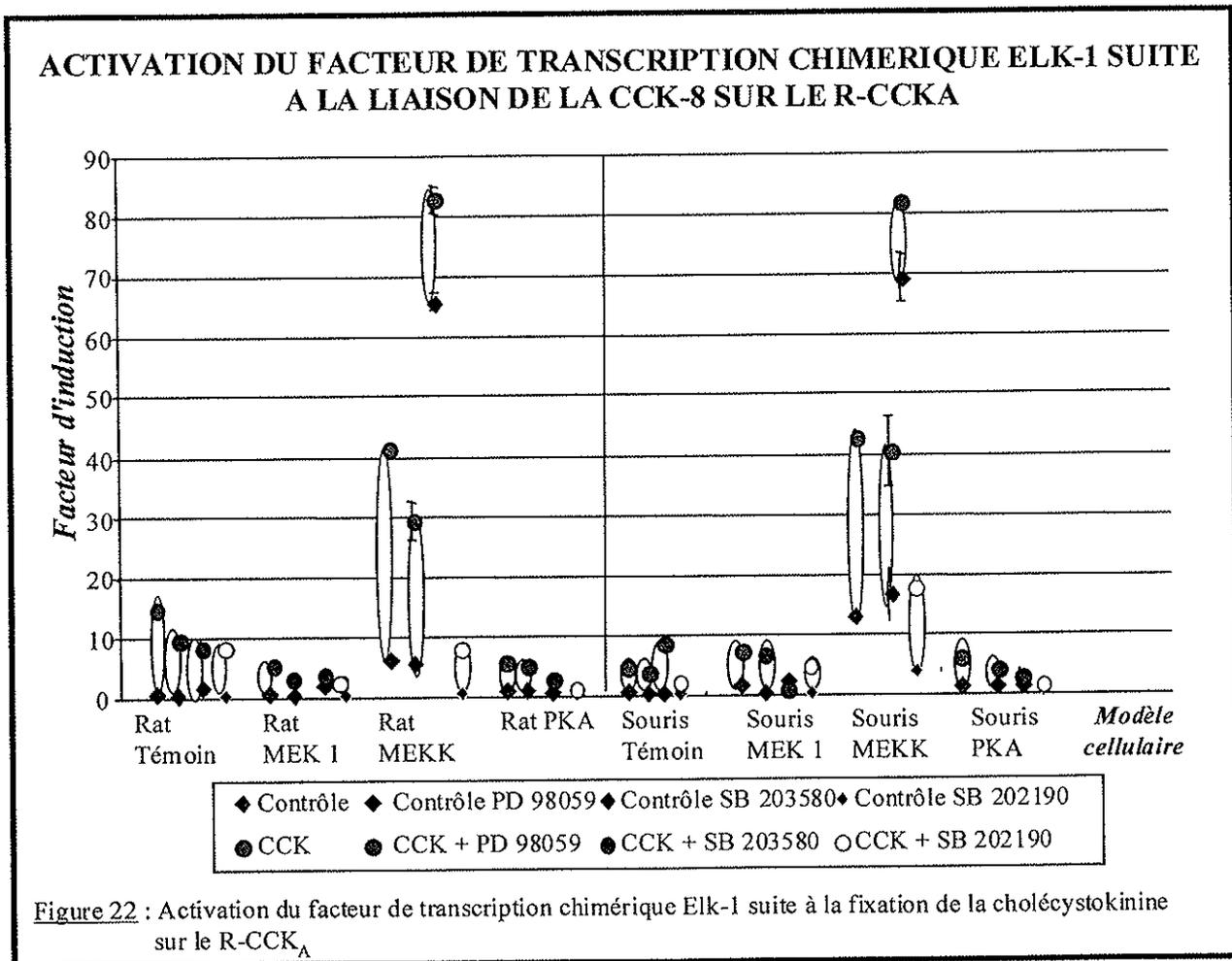
Chez la souris, la réponse induite est inhibée à 75% par le PD 98059, et à 100% avec SB 203580 et SB 202190. Chez le rat, seule une inhibition à 100% est observée avec SB 202190. Les deux autres inhibiteurs permettent la potentialisation de l'effet du JMV chez cette dernière espèce.

Toutefois, cette étude n'ayant été menée qu'une seule fois, les résultats obtenus demandent, encore plus que les autres à être confirmés



I-4- Activation du facteur de transcription chimérique Elk-1 par les ligands

Une activation du facteur de transcription Elk-1 plus ou moins intense par la CCK-8 a été observée dans tous les modèles cellulaires établis. Au contraire, aucune réponse n'a été relevée suite à la liaison du JMV-180 sur le R-CCKA. Aussi, nous n'avons volontairement pas reporté dans la figure 22, les points correspondant au JMV-180.



L'analyse de la figure 22 nous montre que, globalement, les signaux observés chez le rat et la souris, dans des modèles cellulaires équivalents, sont identiques, avec cependant une intensité supérieure du signal dans les modèles rat.

L'ajout de MEK 1 ne provoque aucune augmentation du signal, alors que dans les modèles MEKK, l'induction de Elk-1 par la CCK-8 est fortement augmentée par rapport au modèle témoin, alors que les contrôles sont peu augmentés.

Le profil de réponse des modèles PKA est similaire à celui des modèles PKA observé lors de l'étude de l'induction de c-Jun.

Afin de pousser plus loin notre analyse, nous avons étudié l'effet de la CCK sur des récepteurs mutants, à savoir S1 (récepteur de souris dont la troisième boucle intracellulaire a été mutée par celle du récepteur de rat), et T15 (récepteur de souris dont la troisième boucle intracellulaire a été mutée : la partie NH₂ terminale correspond au récepteur de souris, et la partie COOH-terminale, au récepteur de rat).

Il apparaît clairement (*Cf.* figure 23) lors de l'étude de l'activation de CREB, que les profils générés dans les modèles mutants S1, reproduisent, avec une intensité moindre, ceux observés chez le rat. Il en est de même pour le mutant T15 et le récepteur de souris.

Cet état de fait est moins retrouvé lors de l'étude de l'activation de c-Jun (*cf.* figure 24). Seules des activations chez les mutants sont relevées au niveau des modèles surexprimant la MEKK. Celles-ci sont inhibées par les molécules SB 203580 et SB202190.

Les figures 23 et 24 sont reportées pages suivante.

INDUCTION DE CREB PAR ACTION DE LA CCK-8 SUR DIFFERENTS TYPES DE R-CCKA

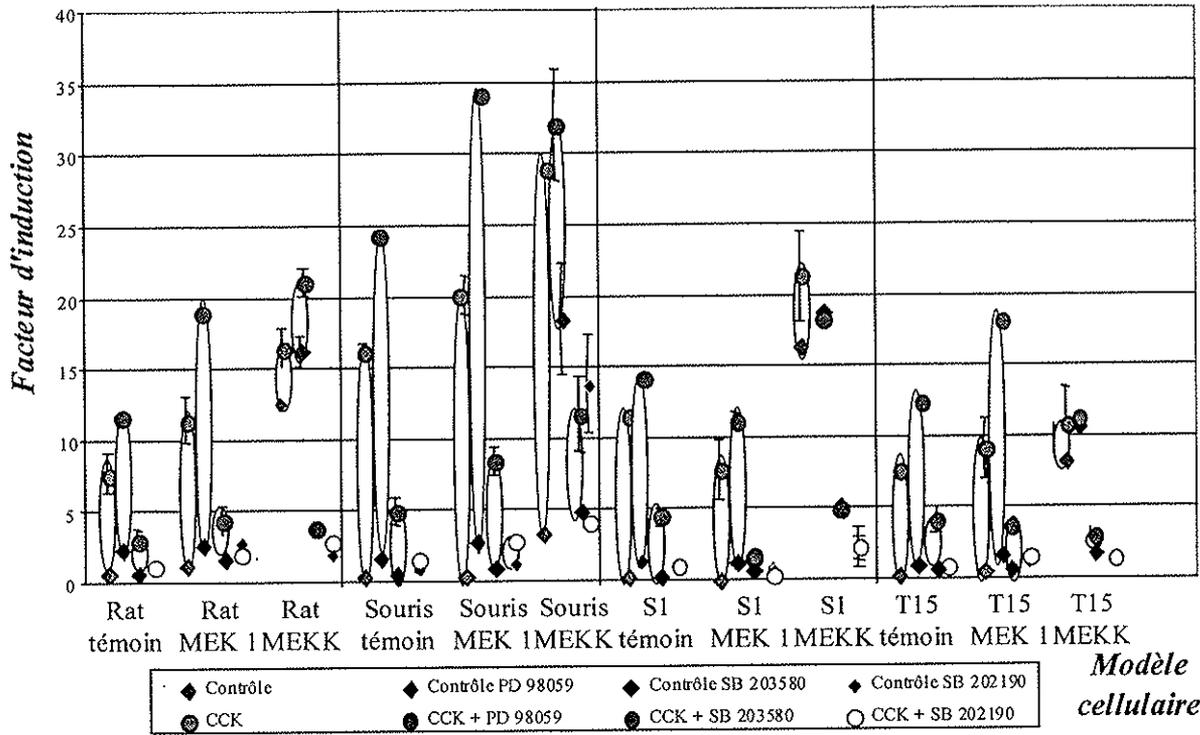


Figure 23 : Activation du facteur de transcription CREB, par la fixation de la CCK-8 sur différents types de R-CCK_A

INDUCTION DE C-JUN PAR ACTION DE LA CCK-8 SUR DIFFERENTS TYPES DE R-CCKA

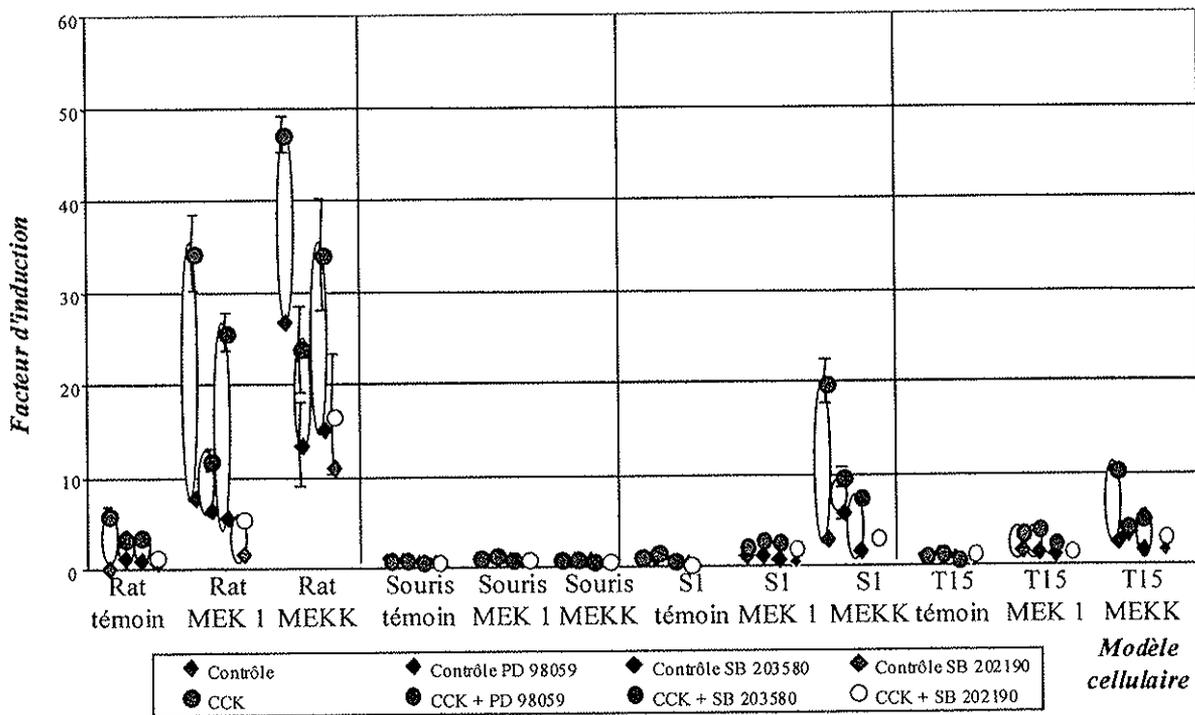


Figure 24 : Activation du facteur de transcription CREB, par la fixation de la CCK-8 sur différents types de R-CCK_A

II- DISCUSSION

Depuis les dernières années, de rapides progrès ont été effectués dans l'étude, l'activation, et la fonction des voies MAP Kinase, qui sont maintenant connues comme étant une clé des voies de transduction de signaux initiés au niveau de la membrane cellulaire. Dans nos travaux, nous avons étudié l'implication des différentes voies MAP Kinase dans la transduction du signal liée à l'activation du récepteur à la cholécystokinine de type A.

II-1- Activation du facteur de transcription chimérique CREB par les ligands

L'activation de CREB par la CCK-8, dans les différents modèles cellulaires, nous permet d'avancer dans la compréhension des voies de transduction aboutissant à ce facteur de transcription. En effet, l'ajout de SB 203580, agissant au niveau de la phosphorylation de MAPKAP-K2, et de SB 202190, agissant au niveau de la phosphorylation de la $p38^{\text{MAPK}}$, inhibent le signal induit par la CCK-8 dans les modèles rat et souris. De plus, les signaux générés par la sur-expression de la MEKK, kinase agissant en amont de la phosphorylation de la $p38^{\text{MAPK}}$ et de la SAPK, sont tous fortement augmentés, ne montrant plus de différence entre la CCK-8 et le témoin. Il apparaît donc que la sur-expression de MEKK mime les effets de la CCK-8.

L'action des inhibiteurs, et la surexpression de la MEKK, permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle la voie $p38^{\text{MAPK}}$ et le facteur MAPKAP-K2 seraient impliqués dans l'activation de CREB suite à la liaison de la CCK-8 sur la R-CCK_A. Il est à noter, étant donné les inhibitions de même amplitude provoquées par SB 203580 et SB 202190 chez le rat et la souris, que la voie $p38^{\text{MAPK}}$ serait induite de la même façon chez le rat et chez la souris. Nous

ne pouvons donc pas mettre en évidence au niveau de cette voie, de comportement différent entre les deux espèces étudiées.

D'autre part, l'ajout de l'inhibiteur PD 98059, n'exerce aucune diminution du signal, ce qui nous laisse présager, à condition que cet inhibiteur pénètre dans la cellule, que la kinase MEK1 ou la kinase $p42^{\text{MAPK}}-p44^{\text{MAPK}}$, n'exerceraient aucune action directe sur la phosphorylation de CREB. Or, dans les modèles surexprimant la MEK, l'ajout de cet inhibiteur provoque une augmentation du signal induit par la CCK-8. Ceci nous laisse penser que la MEK 1 exercerait un effet potentialisateur, quand il est en quantité suffisante, sur l'activation sur facteur CREB par la $p38^{\text{MAPK}}$.

D'autre part, une action différentielle de la PKA existerait entre le rat et la souris. En effet, seule une activation par la CCK-8, est induite chez la souris. Celle-ci est inhibée par l'ajout des inhibiteurs de la voie $p38^{\text{MAPK}}$, ce qui permettrait de mettre en évidence un éventuel effet de la PKA sur la phosphorylation de la $p38^{\text{MAPK}}$.

II-2- Activation du facteur de transcription chimérique c-Jun par les ligands

Contrairement au facteur précédent, une légère induction est relevée avec le JMV-180. Quel que soit le ligand testé, aucune induction n'a été relevée chez la souris, en dehors du modèle PKA. Il n'a été décrit dans la littérature (*cf.* figure 7), qu'une seule voie d'induction du facteur c-Jun, qui est la voie SAPK. Son implication est confirmée, par le modèle cellulaire « rat MEKK », car la surexpression de la kinase MEKK, permettant l'activation de SEK qui à son tour phosphoryle la JNK/SAPK, induit une augmentation de la réponse du contrôle, qui mime alors les effet de la CCK-8.

L'activation du R-CCK_A par la CCK-8 ou le JMV-180, induirait la voie SAPK/JNK uniquement chez le rat, ce qui pourrait mettre en évidence à ce niveau, un comportement différentiel entre le rat et la souris.

II-2-1- Effets induits par la CCK-8

L'induction relevée chez le rat est d'une part fortement inhibée dans les modèles témoin et MEKK par la molécule SB 202190, et d'autre part, fortement augmentée dans le modèle présentant une sur-expression de la MEKK, kinase phosphorylant les SAPK et p38^{MAPK}. Ceci nous laisse penser que la p38^{MAPK} aurait un rôle sur l'activation de c-Jun. Or, il a été démontré avec les études réalisés sur CREB, que cette voie serait impliquée de la même façon suite à l'activation des R-CCK_A de rat ou de souris. Ainsi, cette p38^{MAPK} exercerait un effet sur la phosphorylation de la SAPK.

D'autre part, l'inhibiteur SB 203580 n'exerçant aucune action, nous présageons que le facteur MAPKAP-K2 ne possède pas d'effet sur l'activation de la SAPK.

Par ailleurs, la surexpression de la kinase MEK 1 génère une augmentation du signal, qui est inhibée par PD 98059 et SB 202190, inhibition retrouvée dans le modèle « rat MEKK », ce qui nous laisse penser que la MEK 1, tout comme la p38^{MAPK}, auraient une action potentialisatrice de l'effet de la voie SAPK.

La surexpression, de la PKA induit, dans le « modèle souris », une réponse identique à celle observée dans le même modèle chez le rat. Alors qu'on ne révèle pas de différence pour le rat par rapport au modèle « rat témoin », on établit, chez la souris, par sur-expression de la

PKA, un signal de type rat. Cet effet est inhibé fortement par le SB 203580 et totalement par le SB 202190, ce qui indiquerait que la PKA exercerait son effet au niveau de la phosphorylation de la p38^{MAPK}. Toutefois, nous ne pouvons encore nous expliquer la raison de ce comportement.

Il apparaît donc, que seule la voie SAPK serait induite chez le rat, voie renforcée par l'action de la p38^{MAPK} et de la MEK 1 sur la SAPK.

Un effet différent aurait été décelé au niveau du comportement de la PKA chez le rat et chez la souris, mais des études complémentaires sont nécessaires à la détermination de son action exacte.

II-2-2- Effets induits par la molécule de JMV-180

L'effet du JMV-180 est observé uniquement dans les modèles où la MEK 1 ou la MEKK sont surexprimés. L'ajout des inhibiteurs, quelle que soit la voie, n'induit pas de diminution du signal, contrairement à ce qui avait été observé avec la CCK-8. Le JMV-180 n'induirait donc pas les mêmes voies de signalisation que la CCK-8.

De plus, dans le modèle MEKK, alors que l'activation relevée au niveau des contrôles est diminuée par l'ajout des trois inhibiteurs, les signaux générés par le JMV-180, sont eux, fortement augmentés. Ceci confirme que les voies utilisées suite à l'activation du R-CCK_A par le JMV-180 sont différentes de celles empruntées par la CCK-8.

II-3- Activation du facteur de transcription chimérique ATF-2 par les ligands

Tout comme le facteur précédent, une légère induction est relevée avec le JMV-180. Quel que soit le ligand testé, la CCK-8 ou le JMV-180, aucune induction n'a été relevée en dehors du modèle sur-exprimant la MEKK.

II-3-1- Activation par la CCK-8

L'activation d'ATF-2 est connue (Cf. figures 9 et 10) comme provenant de sa phosphorylation par les voies SAPK et p38^{MAPK}. Les études sur c-Jun, nous permettent de présager que seule la voie p38^{MAPK} et le facteur MAPKAP-K2 seraient impliqués chez la souris. Chez le rat, par contre les deux voies SAPK et p38^{MAPK} ainsi que le facteur MAPKAP-K2 seraient impliquées. Le rôle du facteur MAPKAP-K2 et de la voie p38^{MAPK} sur la phosphorylation d'ATF-2 sont confirmés respectivement par le SB 203580 et le SB 202190 dans le modèle « souris MEKK ».

ATF-2 serait donc activé par les voies JNK/SAPK et p38^{MAPK} et le facteur MAPKAP-K2 dans le modèle rat et uniquement par les voies JNK/SAPK et p38^{MAPK} dans le modèle souris.

II-3-2- Activation par la molécule de JMV-180

Seul un effet significatif du JMV-180 a pu être relevé sur le modèle du récepteur de souris sur-exprimant la MEKK. Cette réponse est inhibée à 50% par le PD 98059, et à 100% par les inhibiteurs SB 203580 et SB 202190. Il apparaîtrait que la voie de transduction induite par la liaison du JMV-180 sur le récepteur de souris serait majoritairement la voie p38^{MAPK}.

Chez le rat en dehors de l'ajout d'inhibiteurs, aucun effet n'est observé, ce qui laisse présager que les récepteurs de rat et de souris se comporteraient de façon différente suite à leur activation par le JMV-180, et confirmerait le comportement antagoniste du JMV-180 sur les sites de basse affinité du $RCCK_A$ de rat.

II-4- Activation du facteur de transcription chimérique ELK-1 par les ligands

Aucune réponse n'a été observée suite à l'activation du R- CCK_A par le JMV-180.

Les réponses induites par la CCK-8, supérieures chez le rat que chez la souris, peuvent être expliquées par l'activation de la voie SAPK uniquement chez le rat.

Cette étude nous permet par ailleurs de confirmer la non-activation de la voie $p42^{MAPK}$ - $p44^{MAPK}$ par la CCK-8. En effet, la sur-expression de MEK 1, kinase phosphorylant $p42^{MAPK}$ - $p44^{MAPK}$, n'induit aucune augmentation du signal, que ce soit chez le rat ou chez la souris. Seul un effet du PD 98059 est relevé chez le rat. Celui-ci proviendrait de l'inhibition de la MEK qui serait alors incapable de renforcer la voie SAPK, voie phosphorylant ELK-1.

Par ailleurs, l'activation de la voie $p38^{MAPK}$ par la CCK-8, est confirmée, autant chez le rat que chez la souris, par l'utilisation de SB 202190 sur les différents modèles cellulaires, et par la sur-expression de la MEKK, qui reproduit les effets de la CCK-8.

L'action de la MEK 1 sur la voie $p38^{MAPK}$, déterminée lors de l'étude de CREB, serait confirmée par l'ajout de PD 98059 sur ce modèle cellulaire. La sur-expression de la PKA induit des signaux similaires chez le rat et la souris. Ils sont, quelle que soit l'espèce, inhibés par les molécules SB 203580 et SB 202190, ce qui pourrait témoigner du rôle activateur de la PKA sur la voie $p38^{MAPK}$. De plus, la diminution du signal de la CCK-8 dans ce modèle par

rapport au modèle témoin pourrait être due à un effet inhibiteur de la PKA sur la SAPK. Ceci demande bien sûr confirmation par des études complémentaires.

Il apparaît donc, au vu des études menées, que la voie $p38^{\text{MAPK}}$, est la voie majeure induite suite à l'activation du R-CCK_A par la CCK-8. Une autre voie, la voie SAPK, serait induite, mais dans des proportions moindre, chez le rat uniquement. Il a été mis en évidence un éventuel rôle potentialisateur de MEK 1, sur les voies SAPK et $p38^{\text{MAPK}}$. Un profil similaire aurait été observé pour la $p38^{\text{MAPK}}$ vis à vis de la SAPK.

II-5- Activation des facteurs de transcription chimériques CREB et c-Jun par l'occupation de différents types de récepteurs à la cholécystokinine de type A

II-5-1- CREB

Des signaux ayant des profils ressemblant, bien que les inductions provoquées aient des amplitudes différentes, ont été relevés avec le récepteur de rat et le récepteur mutant S1. Ce dernier correspond au récepteur de souris dans lequel la troisième boucle intracellulaire a été remplacée par celle du rat. Il semblerait donc, que l'induction de la voie $p38^{\text{MAPK}}$ conduisant à la phosphorylation du facteur de transcription CREB, soit due à la troisième boucle intracellulaire du récepteur, car c'est la seule partie commune existant entre le R-CCK_A de rat et le mutant S1. Les signaux relevés sur le R-CCK_A de souris et le mutant T15, présentant la partie COOH-terminale de la troisième boucle intracellulaire du récepteur de rat, ont eux aussi de profils semblables. Le mutant T15 est un récepteur de souris, présentant la partie COOH-terminale de la troisième boucle intracellulaire du récepteur de rat. La similarité

R-CCK_A de souris – mutant T15 indiquerait, que c'est la partie NH₂-terminale de la troisième boucle intracellulaire qui induirait la voie d'activation p38^{MAPK}.

II-5-2- c-Jun

Les signaux relevés lors de l'étude de c-Jun ne présentent pas du tout la similarité R-CCK_A de rat – mutant S1 et R-CCK_A de souris – mutant T15 observée avec CREB. En effet, les mutants S1 et T15 ont tous deux des profils similaires avec le rat, avec cependant des valeurs d'induction générées par la CCK-8 fortement diminuées par rapport à ce dernier. Ceci nous laisserait penser que la troisième boucle intracellulaire du récepteur ne serait pas la seule responsable de l'induction de la SAPK, que nous avons déterminée comme étant seule capable, par elle-même, de phosphoryler c-Jun. Cette induction serait également induite par d'autres régions du récepteur. Aussi, le profil étant partiellement retrouvé chez les mutants, et notamment au niveau des modèles sur-exprimant la MEKK, ceci présagerait que l'induction de la voie SAPK serait due à la partie COOH-terminale de la troisième boucle intracellulaire, seule partie commune aux récepteurs de rat, S1 et T15.

Les différentes études ont donc permis de révéler que :

- ✓ p38^{MAPK} serait impliquée dans l'activation des quatre facteurs étudiés aussi bien avec le R-CCK_A de souris qu'avec le R-CCK_A de rat,
- ✓ la MAPKAP K-2 ne serait pas impliquée dans l'activation de c-Jun,

- ✓ la SAPK/JNK serait impliquée, dans l'activation de c-Jun uniquement après l'occupation du R-CCK_A de rat,
- ✓ la voie p42^{MAPK}-p44^{MAPK} ne serait pas impliquée dans la transduction du signal généré par la fixation de la CCK-8 sur le R-CCK_A,
- ✓ un éventuel rôle potentialisateur de MEK 1 sur les voies SAPK/JNK et p38^{MAPK} aurait été mis en évidence,
- ✓ la p38^{MAPK} favoriserait l'activation de la SAPK.
- ✓ La partie COOH-terminale du R-CCK_A serait responsable de l'activation de la voie p38^{MAPK}, et la partie NH₂-terminale du R-CCK_A serait, elle, responsable de l'activation de la voie SAPK/JNK.

Facteur de transcription	Espèce	Voie de transduction				
		P42 -P44 ^{MAPK}	JNK / SAPK	P38 ^{MAPK}	MAPKAP-K2	PKA
CREB	Rat	-	-	+	+	-
	Souris	-	-	+	+	+
c-Jun	Rat	-	+	+	-	+
	Souris	-	-	+	-	+
ATF-2	Rat	-	+	+	-	-
	Souris	-	-	+	+	-
Elk-1	Rat	-	+	+	+	+
	Souris	-	-	+	+	+

Tableau IV : Tableau récapitulatif des diverses conclusions émises suite à l'étude de la phosphorylation des facteurs de transcription chimériques par les différentes voies de transduction du signal. Un signe - indique une non - activation, et un signe + une activation. Les ellipses soulignent un comportement identique ou différent majeur entre les voies de phosphorylation induites par les R-CCK_A de rat ou de souris.

CONCLUSION

CONCLUSION

La technique de transfection transitoire de facteurs de transcription chimériques, nous a permis d'avancer dans la compréhension du comportement différentiel entre le rat et la souris, initialement décelé par l'utilisation de la molécule de JMV-180.

Notre étude a permis, d'une part de mettre en évidence un comportement différent entre les récepteurs à la cholécystokinine de type A de rat et de souris vis à vis de leur propre agoniste naturel, la CCK-8. Celle-ci résiderait dans la voie de transduction du signal JNK/SAPK, qui ne semblerait pas être impliquée chez la souris, contrairement au rat. L'utilisation de mutants montrerait que cette différence de comportement pourrait provenir de la partie NH₂-terminale de la troisième boucle intracellulaire du récepteur (cf. figures 23 et 24).

D'autre part, les expériences menées par la stratégie gène « reporter », permettraient d'avancer la non-implication de la voie p42-p44^{MAPK}, et l'activation de la voie p38^{MAPK} de façon équivalente chez le rat et chez la souris, lors de l'activation du R-CCK_A par la CCK-8.

Toutefois, ces études demandent confirmations. Celles-ci peuvent être apportées par répétition des expériences déjà réalisées, et par la mesure par western blot des kinases impliquées dans les différentes voies de signalisation induites par la CCK-8 et le JMV-180. Cette technique, contrairement à celle utilisée lors de nos travaux, pourrait utiliser des cellules provenant d'acini pancréatiques de rat ou de souris, et ne nécessiterait donc pas

l'établissement de modèles cellulaires. En effet, les transfections transitoires ne s'opérant que sur 5 à 10% des cellules, la technique de western blot présenterait, par l'utilisation d'un tel établissement de modèle cellulaire, un bruit de fond de 90 à 95%. C'est pourquoi les acini pancréatiques sont utilisés pour les western blot, car chaque acini exprime le R-CCK_A de rat ou de souris, selon le pancréas de l'animal.

Aussi, si ce type d'expériences doit être fait au niveau des cellules HeLa, pour comparer les résultats de notre étude, il conviendrait d'avoir recours à des transfection stables, ou d'effectuer des transfections transitoires par électroporation de façon à augmenter le rendement d'incorporation d'acides nucléiques dans les cellules.

Le R-CCK_A se comporterait ainsi différemment selon l'espèce, mais aussi, selon le contexte cellulaire et les ligands qui s'y fixent.

Aussi, n'oublions pas que ce récepteur est impliqué dans le contrôle de la satiété. Ce dernier, phénomène ô combien important de nos jours, permettrait l'amélioration des conditions de vie de nombreuses personnes. Il favoriserait par exemple, la diminution du nombre de cas d'obésité et une baisse de la survenue de maladies cardiovasculaires chez des personnes à risque, par un contrôle de l'alimentation.

Ainsi la connaissance précise de la signalisation intracellulaire du R-CCK_A et le développement de nouvelles molécules agonistes de la CCK pourraient être la cible de nouvelles voies thérapeutiques du contrôle de la satiété.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1- Treisman R.

Régulation of transcription by MAP kinase cascades.

Curr. Opin. Cell. Biol., 1996, 8, p205-215.

2- Galas M. C., Lignon M. F., Rodriguez M., Mendre C., Fulcrand P., Laur J., Martinez J.

Structure-activity relationship studies on cholecystokinin : analogues with partial agonist activity.

Am. J. Physiol, 1988, 254 : G176-G182.

3- Matozaki T., Martinez J., Williams J. A..

A new CCK analogue differentiates two functionally distinct CCK receptor in rat and mouse pancreatic acini.

Am. J. Physiol. , 1989, 257 (Gastrointest. Liver Physiol. 20): G594-G600.

4- Gigoux V., Escrieut C., Silvente-Poirot S., Maigret B., Gouilleux L., Fehrentz J.-A., Gully D., Moroder L., Vaysse N., Fourmy D.

Met-195 of the Cholecystokinin-A receptor interacts with the sulfated tyrosine of Cholecystokinin and is crucial for receptor transition to high affinity state.

J. Biol. Chem., 1998, 273, p14380-14386.

5- Wank S. A.

Cholecystokinin receptors

Am. J. Physiol., 1995, 32, G628-G646.

6- De Weerth A., Pisegna J. R., Huppi K., Wank S. A.

Molecular cloning, functional expression and chromosomal localisation of the human cholecystokinin type A receptor.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 194, p811-818.

7 - Wank S. A., Harkins R., Jensen R. T., Sapina H., De Weerth A., Slattery T.

Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, p3125-3129.

8- Liddle R.-A.

Cholecystokinin cells.

Annu. Rev. Physiol., 1997, 59 : p221-242.

9- Williams J. A., Blevins G. T. Jr

Cholecystokinin and regulation of pancreatic acinar cell function.

Physiol. Rev., 1993, 73, p701-723.

10- Martinez J., Galas M. C., Lignon M. F., Rodriguez M., Fulcrand P.

Boc-tyr(SO₃H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-2-PhenylethylEster-JMV-180 : Unique CCK analogue with different actions on high- and low-affinity CCK receptors.

Cholecystokinin Antagonists in Gastroenterology, Adler,G & Beglinger G., Eds. Springer Verlag, 1991, p 80 - 90.

11- Stark H. A., Sharp C. M., Sutliff E. N., Martinez J., Jensen R. T., Gardner J. D.

CCK-JMV-180 : a peptide that distinguishes high affinity cholecystokinin receptors from low affinity cholecystokinin receptors.

Biochem. Biophys. Acta, 1989, 1010, p145-150

12- Rivard N., Rydzewska G., Lods J. S., Martinez J., Morisset J.

Pancreas growth, tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD activation involve high affinity CCK receptor occupation.

Am. J. Physiol., 1994, 266, G62-G70.

13- Rowley W. H., Sato S., Huang S. C, Collado-Escobar D. M., Beaven M. A., Wang L.

H., Martinez J., Gardner J. D., Jensen R. T.

Cholecystokinin-induced formation of inositol phosphates in pancreatic acini.

Am. J. Physiol., 1990, 259, G655-G665.

14- Matozaki T., Göke B., Tsunoda Y., Rodriguez M., Martinez J., Williams J. A.

Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of actions on calcium mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini.

J. Biol. Chem., 1990, 265, p6247-6254.

15- Sato S., Stark H. A., Martinez J., Beaven M. A., Jensen R. T., Gardner J. D.

Receptor occupation, calcium mobilisation, and amylase release in pancreatic acini : effect of CCK-JMV-180.

Am. J. Physiol., 1989, 257, G202-G209.

16- Houpt T. R., Anika S. M., Wolff N. C.

Satiety effects of cholecystokinin and caerulein in rabbits.

Am. J. Physiol., 1978, 235 : R23-R28.

17- Crawley J. N., Corwin R. L.

Biological actions of cholecystokinin.

Peptides, 1994, 15, p731-755.

18- Lignon M. F., Galas M. C., Rodriguez M., Martinez J.

Correlation between phospholipid breakdown, intracellular calcium mobilisation and enzyme secretion in rat pancreatic acini treated with Boc-[Nle28, Nle31]-CCK-7 and JMV-180, two cholecystokinin analogues.

Cell. Sign., 1990, 2 : p339-346.

19- Corp E., Mac Quade S., Moran T. H., Smith G. P.

Characterisation of type a and type B CCK Receptor binding sites in rat vagus nerve.

Brain. Res., 1993, 623, p161-166.

20- Orosco M., Gouch A., Rodriguez M., Martinez J., Jacquot C., Cohen Y.

Comparative activity of two cholecystokinin analogues with partial agonist affinity : effects on food intake and brain monoamines.

Peptides, 1990, 11, pp. p873-877.

21- Withmarsh A. J., Davis R. J.

Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways.

Mol. Med., 1996, 74, p589-607.

22- Brunet A., Roux D., Lenormand P., Dowd S., Keyse S., Pouyssegur J.

Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry

EMBO J., 1999, 18, p664-674

23- Cohen P.

The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells

Trends in cell biol., 1997, 7, p353-361

24- Gutking J. S.

The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades.

J. Biol. Chem., 1998, 273, p18391845

25- Dabrowski A., Van der Kuur J. A., Carter-Su C., Williams J. A.

Cholecystokinin stimulates formation of Shc-Grb2 complex in rat acinar cells through a protein kinase C-dependent mechanism.

J. Biol. Chem., 1996, 271, p27125-27129

26- Blennis J.

Signal transduction via the MAP kinases : Proceed at your own RSK

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, p5889-5892

27- Dabrowski A., Grady T., Logsdon C., Williams J. A.

Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo

J. Biol. Chem., 1996, 271, p5686-5690

28- Deak M., Clifton A. D., Lucoq J. M., Alessi D.R.

Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB.

EMBO J., 1998, 17, p 4426-4441.

29- Montminy M.

Transcriptional regulation by cyclic AMP.

Annu. Rev. Biochem., 1997, 66, p 807-822.

30- Yang S. H., Yates P.R., Withmarsh A. J., Davis R.J, Sharrocks A.D

The Elk-1 ETS domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif.

Mol. Cell. Biol., 1998, p 710-720.

31- Karin M.

The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.

J. Biol. Chem, 1995, 270, p16483-16486

32- Janknecht R., Ernst W. H., Pingout V., Nordheim A.

Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases.

EMBO J., 1993, 12, p5097-5104.

33- Treisman R.

Ternary complex factor : growth factor regulated transcriptional factor.

Current opinion in genetics and development, 1994, 4 : 96-101.

34- Withmarsh A., Shore P., Sharrocks A. D., Davis R.

Integration of MAP Kinase signal transduction pathways at the serum response element.

Science, 1995, 269, 403-407.

35- Yang S. H., Whitmarsh A.J., Davis R. J., Sharrocks A. D.

Differential targeting of MAP kinase to the ETS-domain transcription factor.

EMBO J., 1998, 17, p1740-1749

36- Cruzalegui F. H., Bading H & H.

C-Jun interactions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK I activation.

EMBO J., 1999, 18, p 1335-1344.

37- Richards J. P., Bächinger H. P., Goodman R. H., Brennan R. G.

Analysis of the structural properties of cAMP-responsive Element-binding Protein (CREB) and phosphorylated CREB.

J. Biol. Chem, 1996, 271, p 13716-13723.

38- Janknecht R, Cahill M. A, Nordheim A.

Signal integration at the c-fos promoter.

Carcinogenesis, 1995, 16, n°3, p 443-450

39- Gagne D., Balaguer P., Demirpence E., Chabret C., Trousse F., Nicolas J. C., Pons M.

Stable luciferase transfected cells for studying steroid receptor biological activity.

J. Biolumin. Chemilumin, 1994, 9, p 201-209.

40- Nicolas J. C.

Applications of low-light imaging to life sciences

J. Biolumin. Chemilumin, 1994, 9, p 139-144

41- Gagne D., Pons M., Balaguer P., Nicolas J. C.

Bioluminescence et création de modèles cellulaires chimériques.

J. Biolumin. Chemilumin, 1992, 186, p 528-540.

ANNEXES

ANNEXE I**MILIEUX UTILISES POUR LA TRANSFORMATION****➤ MILIEU LB (LURIA BERTANI)**

Eau désionisée : 950 mL

Bactotryptone : 10 g

Bacto-yeast extract : 5 g

NaCl : 10g

Cette solution est ajustée à pH 7, par addition de NaOH 5N.

De l'ampicilline peut être ajoutée au milieu LB stérilisé par autoclavage, à raison de 1mL/mg, après refroidissement du milieu.

➤ MILIEU LB-AGAR

Milieu LB : 1 L

Agar : 15 g

Ce milieu est stérilisé par autoclavage

L'ampicilline est ajoutée au milieu après refroidissement partiel. L'ensemble est alors coulé, en boîtes de pétri.

ANNEXE II

**SOLUTIONS UTILISEES POUR
L'EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE**

➤ **SOLUTION S1**

Tris/HCl : 50 mM

EDTA : 10 mM

RNAse A : 100 µg/mL

pH 8

➤ **SOLUTION S2**

NaOH : 100 mM

1%SDS

➤ **SOLUTION S3**

KAc : 2.8M

pH 5.1

➤ SOLUTION N2

Tris : 100 mM

Ethanol : 15%

KCl : 900 mM

Ajusté avec H_3PO_4 à pH 6.3

➤ SOLUTION N3

Tris : 100 mM

Ethanol : 15%

KCl : 1150 mM

Ajusté avec H_3PO_4 à pH 6.3

➤ SOLUTION N5

Tris : 100 mM

Ethanol : 15%

KCl : 1000 mM

Ajusté avec H_3PO_4 à pH 8.5

ANNEXE III

**SOLUTIONS ET MILIEUX UTILISES POUR LA
TRANSFECTION ET LA DETECTION DE
L'ACTIVITE LUCIFERASE**

➤ MILIEU DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Composants		Concentration (mg/L)
Sels inorganiques	CaCl ₂ (anhydre)	200.00
	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.10
	KCl	400.00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	200.00
	NaCl	6400.00
	NaHCO ₃	3700.00
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125.00
	Autres composants	Glucose
Rouge de phénol.		15.00
Pyruvate de sodium		110.00
Acides Aminés	L-Arginine.HCl	84.00
	L-Cystéine	48.00
	Glycine	30.00
	L-Histidine.HCl.H ₂ O	42.00
	L-Isoleucine	104.80
	L-Leucine	104.80
	L-Lysine.HCl	146.20
	L-Méthionine	30.00
	L-Phénylalanine	66.00
	L-Sérine	42.00
	L-Thréonine	95.20
	L-Tryptophane	16.00
	L-Tyrosine	72.00
	L-Valine	93.60

A partir de cette composition, sont élaborés différentes conditions de culture utilisant le même milieu, mais à différentes concentrations de sérum de veau fœtal (10%, 0.3%, et 0%)

➤ **MILIEU DMEM-10% Sérum de Veau Fœtal (SVF)**

Milieu DMEM : 500 mL

Sérum de veau Fœtal décomplémenté : 10%, soit 50 mL

Glutamine (Gibco 25030-024) : 0.5%, soit 2.5 mL

Pénicilline (10000 U.I./mL) - Streptomycine (10000 µg/mL) (Gibco 15140-024) : 0.5%, soit 2.5 mL.

➤ **MILIEU DMEM-0.3% Sérum de Veau Fœtal (SVF)**

Milieu DMEM : 500 mL

Sérum de veau Fœtal décomplémenté : 0.3%, soit 1.50 mL

Glutamine : 0.5%, soit 2.5 mL

Pénicilline - Streptomycine : 0.5%, soit 2.5 mL

➤ **MILIEU DMEM-0% Sérum de Veau Fœtal (SVF)**

Milieu DMEM : 500 mL

Glutamine : 0.5%, soit 2.5 mL

Pénicilline-Streptomycine : 0.5%, soit 2.5 mL

➤ **TAMPON HBS 2X**

NaCl : 280 mM

KCl : 10 mM

NaH₂PO₄·2H₂O : 1.5 mM

Dextrose : 12 mM

HEPES : 50 mM

Le pH doit être très précisément ajusté à pH 7.05.

Cette solution est stérilisée par filtration.

➤ **CaCl₂, 2M**

Au moment de la transfection, une solution de CaCl₂, 0.25M est préparée extemporanément à partir d'eau distillée stérile et de la solution 2M.

➤ **TAMPON DE LYSE 5X, Proméga**

Le tampon de lyse 1X utilisé est préparé à partir de cette solution, par dilution au cinquième.

➤ **TAMPON DETECTION 2X :**

KH_2PO_4 80 mM

$\text{K}_2\text{HPO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$ 80 mM

$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 2.1 mM

MgSO_4 5.4 mM

EDTA, $2\text{H}_2\text{O}$ 0.2mM

➤ **TAMPON DE LUMINESCENCE :**

Tampon de détection 2X : 10 mL

1 aliquot de 0.5 mL d'ATP (10^{-2}M)

1 aliquot de 0.5 mL de CoA (10^{-2}M)

2 aliquot de 1.06 mL de luciférine (10^{-2}M)

H_2O qsp 20 mL

Ajuster à pH 7.6

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

PLAN	14
INTRODUCTION	19
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	22
<i>CHAPITRE I : CHOLECYSTOKININE ET RECEPTEUR A LA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A</i>	<i>23</i>
I- LE RÉCEPTEUR À LA CHOLECYSTOKININE DE TYPE A : UN DES RÉCEPTEURS À LA CHOLÉCYSTOKININE	23
I-1- Deux types de récepteurs à la cholécystokinine	23
I-2- Structure primaire du récepteur	24
I-3- Gène codant pour le RCCK _A	27
II- DEUX LIGANDS DU RÉCEPTEUR À LA CHOLÉCYSTOKININE	28
II-1- La Cholécystokinine	28
II-1-1- Historique	28
II-1-2- Nature	28
II-1-3- Structure	30
II-1-4- Lieu de synthèse	31
II-1-5- Effets biologiques induits suite à l'activation du récepteur à la cholécystokinine de type A	32
II-1-5-1- Au niveau du tractus digestif	32
II-1-5-2- Au niveau du système nerveux	33

II-2- La molécule de JMV-180	35
II-2-1- Structure	35
II-2-2- Comportement différent chez le rat et la souris	36
<i>CHAPITRE II : TRANSDUCTION DU SIGNAL</i>	38
I- COUPLAGE DU RÉCEPTEUR ET GÉNÉRATION DE SECONDS MESSAGERS	38
I-1- Couplage du R-CCK _A avec la protéine G	38
I-2- Couplage de la protéine G avec la phospholipase C	39
II- ACTIVATION DES DIFFÉRENTES VOIES « MAP KINASE »	41
II-1- Voie P42 ^{MAPK} - P44 ^{MAPK}	42
II-2- Voie JNK/SAPK	45
II-3- Voie P38 ^{MAPK}	47
III- FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DU GÈNE C-FOS	49
III-1- Elk-1	49
III-2- c-Jun	51
III-3- ATF-2	52
III-4- CREB	52
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	54
I- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	55
I-1 Système gène « reporter »	55
I-2- Transformation bactérienne	58
I-2-1- Principe	58
I-2-2- Protocole de transformation bactérienne	58
<i>I-2-2-1- Mise en présence des bactéries avec l'ADN à incorporer, et choc thermique</i>	58

1-2-2-2- <i>Ensemencement des bactéries transformées sur du milieu LB-Agar avec antibiotique</i>	59
1-2-2-3- <i>Amplification de plasmides</i>	59
1-2-2-3- <i>Purification et extraction de l'ADN plasmidique</i>	60
1-2-2-3-1- <i>Obtention du culot bactérien</i>	60
1-2-2-3-2- <i>Obtention du précipité d'ADN</i>	60
1-2-2-3-3- <i>Lavage et solubilisation de l'ADN</i>	61
1-2-2-3-4- <i>Détermination du titre de la solution d'ADN</i>	61
1-2-3- <i>Vérification de la pureté des ADN plasmidiques obtenus</i>	61
1-2-3-1- <i>Préparation d'un gel d'agarose à 0,8%</i>	61
1-2-3-2- <i>Préparation des dépôts d'ADN</i>	62
1-2-3-3- <i>Dépôt d'ADN</i>	62
II- DETERMINATION DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE INDUITE PAR LES LIGANDS DANS DIFFÉRENTS MODÈLES CELLULAIRES ETABLIS	63
II-1- <i>Culture cellulaire</i>	63
II-1-1- <i>Nature des cellules HeLa, et milieu requis pour leur culture</i>	63
II-1-2- <i>Repiquage des cellules</i>	63
II-2- <i>Transfection</i>	64
II-2-1- <i>Principe</i>	64
II-2-2- <i>Méthodes d'introduction d'ADN plasmidique</i>	66
II-2-2-1- <i>Méthodes chimiques</i>	66
II-2-2-1-1- <i>Transfection au D.E.A.E dextran</i>	66
II-2-2-1-2- <i>Transfection au phosphate de calcium</i>	67
II-2-2-1-3- <i>Transfection par molécules polycationiques</i>	67
II-2-2-2- <i>Méthodes physiques</i>	68
II-2-2-2-1- <i>Transfection par Micro Injection directe</i>	68
II-2-2-2-2- <i>Transfection par électroporation</i>	68
II-2-2-2-3- <i>Transfection par libération de particules biologiques</i>	68
II-2-2-2-4- <i>Transfection par fusion de protoplaste</i>	69
II-2-3- <i>Facteurs influençant l'efficacité des transfections</i>	69

II-2-4- Protocole de transfection des cellules HeLa au phosphate de calcium	70
II-2-4-1- <i>Ensemencement des cellules en boîtes de Pétri pour la transfection</i>	71
II-2-4-2- <i>Préparation des précipités</i>	71
II-2-4-3- <i>Mise en boîtes de 24 puits des cellules transfectées</i>	72
II-2-4-4- <i>Remplacement du milieu à 10% de sérum, par du milieu DMEM à 0.3% de SVF</i>	72
II-2-4-5- <i>Ajout des ligands</i>	74
II-3- Mesure de l'activité luciférase	74
II-3-1- Principe	74
II-3-2- Protocole expérimental	75
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	76
I- RESULTATS	78
I-1- Activation du facteur de transcription chimérique CREB	79
I-2- Activation du facteur de transcription chimérique c-Jun	81
I-3- Activation du facteur de transcription chimérique ATF-2	82
I-4- Activation du facteur de transcription chimérique Elk-1	84
II- DISCUSSION	87
II-1- Activation du facteur de transcription chimérique CREB	87
II-2- Activation du facteur de transcription chimérique c-Jun	88
II-2-1- CCK-8	89
II-2-2- JMV-180	90
II-3- Activation du facteur de transcription chimérique ATF-2	91
II-3-1- CCK-8	91
II-3-2- JMV-180	91

II-4- Activation du facteur de transcription chimérique ELK-1	92
II-5- Activation des facteurs de transcription chimériques CREB et c-Jun par l'occupation de différents types de récepteurs à la cholécystokinine de type A	93
II-5-1- CREB	93
II-5-2- c-Jun	94
<u>CONCLUSION</u>	<u>96</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>99</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>108</u>
<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>116</u>
<u>FIGURES ET TABLEAUX</u>	<u>122</u>

FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 :** Représentation schématique des différences en acides aminés entre les structures primaires du R-CCK_A de rat et de souris. page 26
- Figure 2 :** Structure du gène codant pour le récepteur à la cholécystokinine de type A page 27
- Figure 3 :** Processus de maturation de la CCK page 29
- Figure 4 :** Représentation tridimensionnelle de la CCK-8 dans sa conformation de plus basse énergie. page 31
- Figure 5 :** Libération d'amylase consécutive à l'occupation des sites des haute, puis de basse affinité, des récepteurs à la cholécystokinine de type A de rat et de souris. page 33
- Figure 6 :** Représentation tridimensionnelle de la molécule de JMV-180, déterminée par superposition avec la conformation de plus basse énergie de la CCK-8. page 36

- Figure 7 :** Mode d'action d'un RCPG, impliquant l'activation $G\alpha$ et/ou $G\beta\gamma$. page 39
- Figure 8 :** Exemple d'activation d'un RCPG impliquant l'activation de la voie calmoduline kinase. page 40
- Figure 9 :** Voie d'activation des $p42$ - $p44^{MAPK}$, conduisant à la phosphorylation des familles de facteurs de transcription Elk-1, et CREB. page 44
- Figure 10 :** Voie d'activation Jun Kinase, conduisant à la phosphorylation des familles de facteurs de transcription Elk-1, c-Jun, et ATF-2. page 46
- Figure 11 :** Voie d'activation $p38^{MAPK}$, conduisant à la phosphorylation des familles de facteurs de transcription Elk-1, ATF-2, et CREB. page 48
- Figure 12 :** Structure schématique du facteur de transcription Elk-1 page 50
- Figure 13 :** Structure schématique du facteur de transcription c-Jun page 51
- Figure 14 :** Structure schématique du facteur de transcription ATF-2 page 52
- Figure 15 :** Structure schématique du facteur de transcription CREB page 53
- Figure 16 :** Représentation schématique des constitutions d'ADN utilisées pour la stratégie gène reporter. page 56

- Figure 17 :** Structures comparées des facteurs de transcription naturels et chimériques page 57
- Figure 18 :** Photo d'un gel d'électrophorèse page 62
- Figure 19 :** Activation du facteur de transcription chimérique CREB, par la CCK-8 sur différents modèles cellulaires. page 79
- Figure 20 :** Activation du facteur de transcription chimérique c-Jun, par la CCK-8 et le JMV-180 sur différents modèles cellulaires. page 81
- Figure 21 :** Activation du facteur de transcription chimérique ATF-2, par la CCK-8 et le JMV-180 sur différents modèles cellulaires. page 83
- Figure 22 :** Activation du facteur de transcription chimérique Elk-1, par la CCK-8 sur différents modèles cellulaires. page 84
- Figure 23 :** Activation du facteur de transcription chimérique CREB, par la fixation de la CCK-8 sur différents types de R-CCK_A. page 86
- Figure 24 :** Activation du facteur de transcription chimérique c-Jun, par la fixation de la CCK-8 sur différents types de R-CCK_A. page 86

- Tableau I :** Différences en acides aminés entre les structures primaires du R-CCK_A de rat et de souris. page 25
- Tableau II :** Exemple des principales fonctions biologiques exercées par la cholécystokinine au niveau du système digestif. page 34
- Tableau III :** Quantités de plasmide requises par point pour la transfection de chaque plasmide page 70
- Tableau IV :** Tableau récapitulatif des diverses conclusions émises suite à l'étude de la phosphorylation des facteurs de transcription par les différentes voies de transduction du signal. page 95

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*
- d'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 345.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Géraldine IBARZ

Etude de la signalisation intracellulaire du récepteur à la cholécystokinine de type A

126 pages

Thèse de doctorat de pharmacie – Soutenue le 10 Novembre 1999

RESUME

Des études antérieures menées sur la production d'amylase ont montré que le JMV-180, analogue peptidique de la cholécystokinine (CCK-8) (agoniste naturel du R-CCK_A), présente un comportement paradoxal vis à vis du R-CCK_A de rat et de souris. Cet analogue est agoniste sur les sites de haute affinité des R-CCK_A de rat et de souris, alors que sur les sites de basse affinité, il est agoniste sur R-CCK_A de souris et antagoniste sur le R-CCK_A de rat. Afin de retrouver ce comportement différent, plusieurs modèles d'expression ont été établis par transfection des cDNA codant pour les R-CCK_A de rat ou de souris. Aucune différence n'a été relevée pour toutes les réponses biologiques situées près de la membrane (inositols phosphates, seconds messagers), alors que pour les réponses plus lointaines comme l'induction de la transcription des gènes, ces deux récepteurs se comportent de façon différente. Les événements conduisant à l'activation de la transcription de gènes reposent pour une grande part sur des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation de facteurs de transcription.

Cette étude a été abordée en utilisant différents facteurs de transcription dont le domaine protéique cible des réactions de phosphorylation (domaine de transactivation) est fusionné au domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal-4. Dans ces conditions, l'activation d'un facteur de transcription chimérique par phosphorylation peut être visualisée, après sa reconnaissance, à l'aide d'un plasmide « reporter » exprimant la luciférase, et les différentes voies de transduction induites par les deux R-CCK_A peuvent être étudiées.

Il est apparu, au cours de ces travaux que la différence de comportement relevé entre les récepteurs de rat et de souris au niveau de la production d'amylase, pourrait provenir de l'induction uniquement après activation du récepteur de rat, d'une des voies de transduction du signal, nommée JNK / SAPK.

MOTS CLES

Cholécystokinine

JMV-180

Luciférase

Récepteur à la cholécystokinine de type A

Transduction du signal

Voie p42-p44^{MAPK}

Voie SAPK / JNK

Voie p38^{MAPK}

JURY

Président du jury :

Monsieur LAGORCE Jean-François

Directeur de thèse :

Monsieur GAGNE Didier

Juges :

Monsieur le Professeur RABY Claude

Mademoiselle CLEDAT Dominique

Mademoiselle BEYSEN Marie-Laure
