



**HAL**  
open science

## Recherche de partenaires de Lu/BCAM dans le rein chez la souris Lu+/+ et Lu-/-

Jean-Denis Grossepièce

► **To cite this version:**

Jean-Denis Grossepièce. Recherche de partenaires de Lu/BCAM dans le rein chez la souris Lu+/+ et Lu-/- . Sciences du Vivant [q-bio]. 2011. dumas-01101699

**HAL Id: dumas-01101699**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01101699>**

Submitted on 9 Jan 2015

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

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

# Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
RESUME.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	10
INTRODUCTION GENERALE.....	12
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
I ) ANTIGENES DU SYSTEME LUTHERAN.....	14
I.1 )LE PHENOTYPAGE.....	14
I.1.1 )LES ANTI Lu.....	15
I.1.2 )IMPORTANCE CLINIQUE.....	15
I.2 )LE GENOTYPAGE.....	16
II ) STRUCTURE DE LA GLYCOPROTEINE Lu/BCAM.....	17
II.1 )Lu/BCAM HUMAINE.....	17
II.2 )Lu/BCAM MURINE.....	19
III ) EXPRESSION DE Lu/BCAM .....	20
III.1 )CHEZ L’HOMME.....	20
III.1.1 )CELLULES ERYTHROÏDES.....	20
III.1.2 )TISSUS NON ERYTHROÏDES.....	21
III.2 )Lu/BCAM DANS DIVERS TISSUS MURINS.....	22
IV ) Lu/BCAM RECEPTEUR DE LAMININE 511-521.....	23
IV.1 )LES LAMININES.....	23
IV.1.1 )LEUR STRUCTURE.....	24
IV.1.2 )LA CHAINE ALPHA 5.....	26
IV.1.3 )LES SITES D’INTERACTIONS DE LA CHAINE ALPHA 5 AVEC SES RECEPTEURS.....	28
IV.1.3.1 )Les sites d'interactions sur le domaine G au niveau COOH-Terminal.....	28
IV.1.3.2 )Les sites d’interactions au niveau NH2-Terminal.....	29
IV.1.3.3 )Les sites d'interactions sur le domaine IVa.....	31
IV.2 )INTERACTION Lu/BCAM–LAMININE ALPHA 5.....	31
IV.2.1 )Lu/BCAM RECEPTEUR DES LAMININES 511/521 DANS LES CELLULES ERYTHROÏDES.....	31
IV.2.2 )Lu CO-RECEPTEUR DES LAMININES 511/521 DANS LES TISSUS NON- ERYTHROÏDES.....	33
IV.2.3 )FORTE AFFINITE ENTRE Lu/BCAM ET LAMININE 511-521.....	33
IV.2.4 )LOCALISATION DU DOMAINE DE LIAISON AUX LAMININES 511/521 SUR Lu/BCAM.....	35
IV.2.5 )RÔLE DE L’INTERACTION Lu/BCAM ALPHA 5 SUR LES GLOBULES ROUGES HUMAINS ET PATHOLOGIES ASSOCIEES.....	36
IV.2.5.1 )La maladie de Vasquez.....	36
IV.2.5.2 )La drépanocytose.....	36
IV.2.6 )RÔLE DE L’INTERACTION Lu/BCAM ALPHA 5 DANS LES TISSUS NON ERYTHROÏDES CHEZ LA SOURIS.....	38
V ) LE GLOMERULE.....	40
V.1 )LA BARRIERE DE FILTRATION GLOMERULAIRE : BARRIERE HEMATO- URINAIRE.....	40
V.2 )LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES GLOMERULAIRES.....	41
V.2.1 )LES CELLULES ENDOTHELIALES.....	41

V.2.2 )LES PODOCYTES.....	42
V.2.3 )LES CELLULES MESANGIALES.....	43
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>44</b>
I ) GENOTYPAGE DES SOURIS DE LA LIGNEE K 99.6.....	46
I.1 )Echantillons utilisés.....	46
I.1.1 )Extraction d'ADN de queue de souris.....	46
I.1.1.1 )PCR-RFLP.....	47
I.1.1.2 )PCR Allèle Spécifique.....	49
II ) PROTEINES GLOMERULAIRES .....	50
II.1 )Echantillons utilisés.....	50
II.1.1 )Iselements des glomérules .....	51
II.1.2 )Coloration Immuno-Histo-Fluorescence des glomérules : contrôle du phénotype Lu .....	51
II.1.3 )Extraction des protéines dans les glomérules.....	52
II.1.4 )Dosage des protéines glomérulaires.....	52
II.1.5 )Co-précipitation des protéines.....	54
II.1.6 )Electrophorèse des protéines.....	56
II.1.7 )Spectrométrie de masse.....	57
II.1.8 )Western Blot.....	57
III ) PREPARATION D'UN NOUVEL «APPÂT» Lu/BCAM PAR CLONAGE.....	57
III.1 )Préparation de la matrice.....	59
III.1.1 )PCR de l'insert (partie intra-cytoplasmique).....	60
III.2 )Préparation de l'insert (partie intracytoplasmique de Lu), des plasmides contenant la partie extracellulaire non mutée (N3C) et mutante (DA) pour la ligation.....	61
III.2.1 )Préparation de l'insert.....	61
III.2.2 )Préparation des vecteurs N3C et DA.....	61
III.2.3 )Déphosphorylation des vecteurs N3C et DA.....	62
III.2.4 )La ligation.....	64
III.2.5 )La transformation.....	65
IV ) CONTROLE DU CLONAGE BACTERIEN.....	66
IV.1 )Extraction de plasmides.....	66
IV.2 )Contrôle de la mini-préparation d'ADN : vecteur + insert.....	68
V ) MAXI-PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE.....	69
VI ) LA CULTURE CELLULAIRE.....	70
VII ) LA PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES Lu/BCAM.....	73
VII.1 )Western Blot.....	74
<b>RESULTATS.....</b>	<b>76</b>
I ) LE GENOTYPAGE DES SOURIS PAR PCR-RFLP OU PCR ALLELE SPECIFIQUE.....	76
II ) ISOLEMENTS ET COLORATION PAR IMMUNO-HISTO-FLUORESCENCE DES GLOMERULES.....	77
III ) CO-PRECIPITATION ET ELECTROPHORESES DES EXTRAITS DE PROTEINES GLOMERULAIRES.....	80
III.1 )REVELATION AU NITRATE D'ARGENT DES PROTEINES CO-PRECIPITEES AVEC L'APPÂT Fc-Lu A PARTIR DES EXTRAITS GLOMERULAIRES WT et KO.....	80
III.2 )REVELATION AU NITRATE D'ARGENT DES PROTEINES CO-PRECIPITEES LORS DES CO-P LuDA/extrait WT et KO.....	82
III.3 )REVELATION DES MÊMES ELUATS EN CONDITIONS REDUITES.....	83
IV ) ANALYSE DES GELS DE CO-P Fc-Lu/extrait WT PAR SPECTROMETRIE DE MASSE .....	85
V ) ESSAIS D'EXTRACTION ET DE CO-PRECIPITATION DE LA LAMININE.....	85

VI ) ANALYSES PAR WESTERN BLOT.....	87
VI.1 )ANALYSE PAR WESTERN BLOT DES CO-P Fc-Lu.....	87
VI.2 )ANALYSE A L'AIDE DE PLUSIEURS ANTICORPS ANTI ALPHA 5 LAMININE..	88
VI.3 )CONTRÔLE DES ANTICORPS ANTI LAMININE ALPHA 5.....	89
VI.4 )ANALYSE DES CO-P A L'AIDE DE L'ANTICORPS ANTI ALPHA 5 LAMININE L85 PURIFIE.....	90
VII ) PREPARATION D'UN NOUVEL APPÂT LuIC.....	91
VII.1 )CLONAGE.....	91
VII.1.1 )PREPARATION DE L'INSERT.....	91
VII.1.2 )PREPARATION DES VECTEURS.....	92
VII.2 )EXPRESSION DANS DES CELLULES COS 7.....	96
VII.3 )PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES DE Lu/BCAM.....	97
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>99</b>
I ) CO-PRECIPITATION DES EXTRAITS GLOMERULAIRES.....	100
II ) ANALYSE DES BANDES DU GEL DE CO-P PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	101
III ) ANALYSE PAR WESTERN BLOT.....	102
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>105</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>113</b>
I ) COÛT EXPERIMENTAL.....	113
II ) LES PRODUITS UTILISES.....	115
III ) MANIPULATION DE SOURIS.....	115

**CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS  
PARIS**

Mémoire

Présenté en vue d'obtention

**DU DIPLOME D'INGENIEUR CNAM**

*Spécialité : Sciences et techniques du vivant*

Option : **Génie Biologique**

par

**Jean-Denis GROSSEPIECE**

**Recherche de partenaires de Lu/BCAM dans le rein chez la souris Lu<sup>+/+</sup> et Lu<sup>-/-</sup>**

Soutenu le jeudi 24 novembre 2011

JURY,

Président : M. Philippe POCHART, Professeur des Universités au CNAM

Membres : M. Olivier HENNEBERT, Maître de conférences au CNAM

Mme Anne FILIPE, Maître de conférences Paris Diderot, Maître de Stage

Mr Olivier BERTRAND, Docteur de recherche à l'unité INSERM U665

Mme Jeannette LUONG, Docteur en Pharmacie, chef de projet au Guerbet

Stage réalisé au sein de l'unité INSERM U665, à l'Institut National de la Transfusion Sanguine

## REMERCIEMENTS

Je remercie Yves COLIN, directeur de cette belle Unité INSERM U665, de m'avoir permis de réaliser mon stage d'ingénieur au sein de son laboratoire.

Je remercie ensuite l'Ingénieur de Recherche Cécile RAHUEL et le Maître de Conférence Universitaire Anne FILIPE d'avoir été mes maîtres de stage et de m'avoir donné l'opportunité de profiter de leur grande expérience. Je leur adresse sincèrement ma reconnaissance pour toute leur disponibilité, leurs critiques pertinentes, leurs précieux conseils techniques, leur gentillesse. Merci à nouveau pour leur aide dans la rédaction et la correction de ce mémoire. De mon côté, ce fut un vrai bonheur de partager cette expérience avec eux.

Je voudrais remercier l'Ingénieur d'INTS Camilo VILELA LAMEGO que j'ai connu au CNAM Paris, et qui m'a permis d'entrer en contact avec le directeur Yves COLIN.

Je remercie également tous ceux qui m'ont apporté leur aide de manière ponctuelle, Docteur Wassim EL NEMER, Docteur Emmanuel COLLEC, le secrétariat,...

Un grand merci à l'ensemble de l'unité INSERM et INTS à la fois pour l'accueil très chaleureux des stagiaires, et l'offre de très bonne condition de stage.

## RESUME

Les glycoprotéines (gps) Luthéran (Lu) et BCAM (Basal Cell Adhesion Molecule) sont des molécules d'adhérence récepteurs des laminines 511/521. Ces deux (gps) isoformes Lu/BCAM sont codées par un gène unique LU. Elles appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et ne diffèrent que par la taille de leur domaine cytoplasmique. L'isoforme Lu comprend 40 acides aminés supplémentaires par rapport à l'isoforme Lu(v13), parmi lesquels on note la présence de plusieurs sites de phosphorylation. Les protéines Lu /BCAM humaines sont exprimées dans les globules rouges et dans de nombreux tissus (le cœur, la peau, l'intestin, le rein...) notamment sur les cellules épithéliales, endothéliales et musculaires lisses, et également au niveau des endothéliums vasculaires. Chez la souris, la protéine Lu est également exprimée dans de nombreux tissus (cœur, poumon, rein, intestin, muscle...), mais elle est totalement absente au niveau des globules rouges. L'équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage a réalisé l'inactivation du gène chez la souris. Les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> se développent normalement, mais présentent des anomalies structurales de la membrane basale en particulier dans le rein et l'intestin. Lu pourrait participer au maintien de l'intégrité de la lame basale glomérulaire et des lames basales entourant les cellules musculaires lisses intestinales.

Mon projet vise à rechercher à partir d'extraits glomérulaires Lu/BCAM<sup>+/+</sup> et Lu/BCAM<sup>-/-</sup>, des partenaires Lu/BCAM potentiellement impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière de filtration (partenaire transmembranaire, composant du cytosquelette, protéine participant à une signalisation intracellulaire...). J'ai participé à la mise au point des techniques de co-précipitation afin ensuite d'identifier des candidats potentiels par spectrométrie de masse (plate forme Jacques Monod, Université Paris Diderot).

La technique a été testée dans un premier temps en tentant de co-précipité un partenaire connu de Lu/BCAM, la laminine. Les résultats obtenus ne sont pas probants. Des mises au point technique sont poursuivies.

**Mots clés :** Luthéran (Lu) - BCAM (Basal Cell Adhesion Molecule) - Laminines 511/521 = la chaîne  $\alpha 5$  laminine – Molécule d'adhérence – Co-précipitation (CO-P)

## ABSTRACT

The glycoproteins (gps) Lutheran (Lu) and BCAM (Basal Cell Adhesion Molecule), are adhesion molecules and receptors to laminin 511/521. Both isoforms are encoded by a single gene **LU**. They belong to the Superfamily of Immunoglobulins (SFIg) and the two isoforms differ only by the size of their cytoplasmic domain. The Lu isoform has 40 additional amino acids compared to Lu(v13) isoform, among which we note the presence of several phosphorylation sites. Lutheran human glycoproteins are expressed in red blood cells, in vascular endothelial and in many tissues as heart, skin, intestine, kidney... namely on epithelial, endothelial and smooth muscle cells. In mice, the Lu protein is expressed in many tissues (heart, lung, kidney, intestine, muscle ...), but it is totally absent on red blood cells. The team with which I did my internship did the inactivation of the gene in mice. Lu/BCAM<sup>-/-</sup> mice develop normally but show structural abnormalities of the basement membrane in particularly kidney and intestine. Lu participates in maintaining the integrity of the glomerular basement membrane and basal lamina surrounding the intestinal smooth muscle cells. Lu/BCAM is thus essential to the cohesion of the kidney tissue and intestinal muscle.

My project concerns the research of the Lu/BCAM partners potentially involved in maintaining the integrity of the filtration barrier (transmembrane partners, components cytoskeleton, proteins involved in intracellular signaling ...). I participated to the development of the technical co-precipitating, and then the protocol identification of potential candidates by mass spectrometry. (Platform Jacques Monod, University Paris Diderot).

The technique was first tested trying to co-precipitate a known partner protein of the Lu/BCAM, the  $\alpha 5$  laminin chain. The results are not successful. The technique development is in progress.

**Keywords** : Lutheran (Lu) - BCAM (Basal Cell Adhesion Molecule) - 511/521 laminin =  $\alpha 5$  chain laminin - Adhesion molecule – Co-precipitation (CO-P)

## LISTE DES ABREVIATIONS

a.a	Acides aminés
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
Arg	Arginine
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
AS	Allèle Spécifique
BET	Bromure d'éthydiuim
BCA	Acide bicinchonique
BCAM	Basal Cell Adhesion Molecule
C	Constant
CO-P	Co-précipitation
CD	Classe de Différenciation
CG	Circle Grow
CK II	Caséine Kinase II
Cyt	Cytoplasme
D	Domaine
DA	Mutant : Acide aspartique en alaine
DMEM	Milieu essentiel minimum modifié Dubelcco + sérum (sérum de veau foetal)
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène-Diamine-Tétra Acétique
E.H.S	Engelbreth-Holm-Swarm
Er	Erythrocyte
Fc	Fragment constant des IgG1 humaines
gp	glycoprotéine
GBM	Membrane basale glomérulaire
GR	Globule Rouge
GSK 3 $\beta$	Glycogène Synthétase Kinase 3 $\beta$
H	Hétérozygote
HbS	Hémoglobine S
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
His	Histidine
IC	Intra-cytoplasmique
ICS	Institut Clinique de la Souris

IHC	Immuno-Histo-Chimie
IHF	Immuno-Histo-fluorescence
Ig-like	Immunoglobulin-like
IP	Inhibiteur de protéase
kb	kilobase
kDa	kilo dalton
KO	Mutant inactif par inactivation d'un gène
LL	Dileucine
Lu	Luthéran ou Lu/BCAM
MEL	Cellule Erythroleucémique Murine
MHNN	Maladie Hémolytique du Nouveau Né
PA	Protéine A sepharose (témoin de bruit de fond)
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK A	Protéine Kinase A
Prot.	Protéine
PV	Polyglobulie primitive de Vasquez
RLFP	Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction
SAB	Sérum Albumine Bovin
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFIg	Superfamille des Immunoglobulines
SH3	Sarc Homology 3
SM	Spectrométrie de Masse
Sol	Soluble
SS	Hémoglobine S (Drépanocytaire)
Surnag.	Surnageant
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAE	Tris Acétate EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris EDTA
TM	Transmembranaire
V	Variable
WB	Western blot
WT	Sauvage

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

<b>Tableau 1</b> : Les fréquences phénotypes Lu dans la population caucasienne.....	P15
<b>Figure 1</b> : Les glycoprotéines Lu et Lu(v13).....	P16
<b>Figure 2</b> : Epissage alternatif de l'intron 13.....	P17
<b>Figure 3</b> : Structure des glycoprotéines de Lu/BCAM.....	P18
<b>Figure 4</b> : Séquence aminés du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine Luthéran humaine...P19	
<b>Figure 5</b> : Analyse «Western-blot» de l'expression de Lu dans les tissus d'un souris souriceau.....	P22
<b>Figure 6</b> : La membrane basale.....	P23
<b>Figure 7</b> : Modèle schématique de la chaîne $\alpha 1$ de laminine.....	P25
<b>Figure 8</b> : Structures des chaînes $\alpha 1/5$ laminines sauvages et chimériques.....	P27
<b>Figure 9</b> : Les sites d'interaction de la chaîne $\alpha 5$ laminine avec ses récepteurs.....	P30
<b>Figure 10</b> : Une liaison spécifique avec une forte affinité entre la laminine 10/11 et Lu/BCAM chez l'homme, la souris.....	P34
<b>Figure 11</b> : Adhérence des GRs drépanocytaires à l'endothélium vasculaire sous stimulation adrénérgique.....	P37
<b>Figure 12</b> : Etude histologique du rein et de l'intestin chez les souris Lu/BCAM <sup>+/+</sup> et Lu/BCAM <sup>-/-</sup> .....	P39
<b>Figure 13</b> : Structure d'un corpuscule rénal A et de la membrane de filtration glomérulaire B.....	P40
<b>Figure 14</b> : La jonction hémato-urinaire du corpuscule rénal.....	P41
<b>Figure 15</b> : Plan de travail.....	P45
<b>Figure 16</b> : Génotypage des souris de la lignée K 99.6.....	P47
<b>Figure 17</b> : Préparation des échantillons et co-précipitation avec l'appât Fc-Lu à partir des extraits protéiques de la lignée K 99.6 WT et KO.....	P50
<b>Tableau 2</b> : Gamme d'étalonnage.....	P53
<b>Figure 18</b> : Co-précipitation de protéines avec l'appât Fc-Lu à partir des échantillons de la lignée K 99.6 WT et KO.....	P54
<b>Figure 19</b> : Préparation d'un l'appât Fc-Lu/BCAM par clonage.....	P58
<b>Tableau 3</b> : Préparation 10ng, 20ng, 50ng quantité d'ADN matrice.....	P60
<b>Figure 20</b> : Mini-préparation de plasmides.....	P67
<b>Figure 21</b> : Préparation de protéines Lu recombinantes.....	P71
<b>Figure 22</b> : Génotypage des souris par PCR-RFLP.....	P76
<b>Figure 23</b> : L a PCR Allèle Spécifique .....	P77

<b>Figure 24</b> : Mise en évidence des cellules exprimant Lu/BCAM dans les glomérules WT au microscope confocal 60X.....	P78 à 79
<b>Figure 25</b> : Mise en évidence des cellules n'exprimant pas Lu dans les glomérules KO au microscope confocal 60X en présence de l'anti-L55 et $\beta$ 1L.....	P81
<b>Figure 26</b> : CO-P Fc-Lu/ Extrait WT.....	P81
<b>Figure 27</b> : CO-P FcLu/Extrait KO.....	P81
<b>Figure 28</b> : CO-P FcLuDA/Extrait WT.....	P82
<b>Figure 29</b> : CO-P Fc-Lu-DA/Extrait KO.....	P83
<b>Figure 30</b> : CO-P Fc-Lu/Extrait WT en conditions réduites.....	P84
<b>Figure 31</b> : CO-P Fc-Lu/Extrait KO en conditions réduites.....	P84
<b>Figure 32</b> : CO-P WT Fc-Lu et Fc-LuN/IC après extraction glomérulaire en détergent BRIJ 97...	P86
<b>Figure 33</b> : Western blot des CO-P Fc-Lu et Fc-LuDA à la fois extrait WT et KO avec Ac L85 au 1/5 000 en conditions non réduites.....	P87
<b>Figure 34</b> : Les western blots des extraits de cellules bEnd.3 en tampon BRIJ 97 en conditions non réduites A et réduites B révélés.....	P89
<b>Figure 35</b> : Mise en évidence l'expression du gp Lu/BCAM par Ac 602 au 1/3 000.....	P90
<b>Figure 36</b> : L'utilisation de l'Ac L85 P52 au 1/2 500, 1/5 000, 1/10 000 en conditions non réduites et réduites.....	P91
<b>Figure 37</b> : Contrôle de la taille et la PCR des trois préparations A, B et C.....	P92
<b>Figure 38</b> : Contrôle des vecteurs N <sub>3</sub> C et DA avant (N N, N DA)et après (N, DA) digestion par l'enzyme «Esp3I».....	P93
<b>Figure 39</b> : Contrôle des vecteurs N <sub>3</sub> C et DA avant (N N, N DA)et après (N, DA) digestion par l'enzyme «Esp3I».....	P94
<b>Figure 40</b> : Identification des clones de bactéries transformées (E, K, F) par électrophorèse sur gel d'agarose 2%.....	P96
<b>Figure 41</b> : Électrophorèse des surnageants des cellules COS 7 transfectées par des plasmides N <sub>3</sub> C et DA, coloration par le nitrate d'argent.....	P98
<b>Figure 42</b> : Contrôle des surnageants des cellules COS 7 transfectées, après purification sur colonne.....	P98

## INTRODUCTION GENERALE

La fonction de la glycoprotéine Luthéran commence à être bien caractérisée en tant que molécule d'adhérence, récepteur de laminine sur les globules rouges. Mais pour mieux caractériser la fonction de Lu dans les tissus, l'équipe INSERM U665 a généré en 2003 un modèle de souris dans lequel le gène Lu a été inactivé. Contrairement à l'homme, les globules rouges et les réticulocytes des souris sauvages (Lu/BCAM<sup>+/+</sup>) n'expriment pas les glycoprotéines Luthéran (Rahuel et al. 2008). Les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles, ne présentent pas d'anomalies macroscopiques au niveau des tissus ou des paramètres physiologiques. Les analyses microscopiques ont mis en évidence des anomalies structurales des membranes basales contenant la laminine 521, dans le rein et dans l'intestin, tissus dans lesquels la protéine Lu est normalement fortement exprimée. L'absence de Lu dans le rein et l'intestin conduit à un épaississement de la membrane basale qui perturbe la structure des couches musculaires intestinales et de la membrane basale glomérulaire (GBM) dans le rein, sans répercussion fonctionnelle en conditions physiologiques normales (Colin et al. 2008). L'absence d'anomalie fonctionnelle rénale (pas de protéinurie) chez les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> indique que la désorganisation partielle de la GBM ne modifie pas sa capacité de filtration du plasma en conditions normales. Mais il est possible que ces anomalies structurales affectent la capacité de filtration de la GBM en condition de pression anormale prolongée (condition pathologique ou de stress) et puissent conduire à une pathologie rénale.

Nous avons traité les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> et Lu/BCAM<sup>+/+</sup> à l'angiotensine II inducteur d'hypertension artérielle en collaboration avec P.L. Tharaux, hôpital Lariboisière. Après traitement, les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> présentent une albuminurie excessivement plus importante que les souris Lu/BCAM<sup>+/+</sup>. Ce défaut de perméabilité rénale s'accompagne, en microscopie électronique, d'une modification de la structure des capillaires glomérulaires (au niveau de la GBM et dans une moindre mesure au niveau des cellules endothéliales et podocytaires), en absence de Lu/BCAM. Ces résultats suggèrent que Lu/BCAM pourrait intervenir dans la modulation de la perméabilité des capillaires. Dans le glomérule le sang arrive par les capillaires et passe trois barrières de filtration successives : l'endothélium, la GBM et la barrière podocytaire. Lu/BCAM est exprimé à la fois sur les cellules endothéliales et podocytaires qui entourent la GBM. L'analyse en Immuno-Histo-

Fluorescence et en western blot de l'expression de différents marqueurs podocytaires et endothéliaux impliqués dans les jonctions inter-cellulaires et dans l'interaction avec la GBM, ne montre pas de différence significative dans les glomérules Lu/BCAM<sup>-/-</sup> en comparaison des glomérules Lu/BCAM<sup>+/+</sup>.

**Afin de caractériser des partenaires de Lu/BCAM dans le glomérule, j'ai réalisé des co-précipitations à partir d'extraits glomérulaires Lu/BCAM<sup>-/-</sup> et Lu/BCAM<sup>+/+</sup>, avec le Fc-Lu comme appât contenant la partie extracellulaire de Lu/BCAM fusionné à un fragment Fc. Nous avons tenté d'analyser par la spectrométrie de masse d'éventuels partenaires de Lu/BCAM.**

Le mémoire s'articule comme suit :

- Une **étude bibliographique** ayant pour objet de présenter les données nécessaires à la compréhension du travail, de son contexte et de ses enjeux. La première partie est consacrée à la présentation de Lu/BCAM humain et murin le récepteur de la chaîne  $\alpha 5$  laminine. La deuxième partie traite du rôle de Lu/BCAM, sa fonction dans divers tissus humains et murins.
- Une seconde partie de "**matériel et méthodes**" utilisés au cours du travail expérimental.
- Les «**résultats et discussion**» qui exposent et discutent les résultats obtenus sur la caractérisation des partenaires de Lu/BCAM.
- Et pour finir, **conclusions et perspectives**.

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### I) ANTIGENES DU SYSTEME LUTHERAN

#### I.1 ) LE PHENOTYPAGE

Callender et son équipe ont identifié pour la première fois un anticorps anti-Lu<sup>a</sup>, réagissant avec 8% d'échantillons de sang de donneurs, dans le sérum d'un sujet polytransfusé (Callender et al. 1945). L'anticorps antithétique anti-Lu<sup>b</sup>, présent chez 99% de la population, fut découvert en 1956 (Chanarin et Cutbush 1956). Les antigènes Lu<sup>a</sup> et Lu<sup>b</sup> définissent quatre phénotypes dans la population caucasienne : Lu (a+b-), Lu (a+b+), Lu (a-b+) et Lu (a-b-) de fréquence respective 0.15%; 7.5%; 92.4% et très rare (**Tableau 1**). Les globules rouges de phénotype Lu (a-b-) (Lu null) sont dépourvus de tous les antigènes du système Luthéran à leur surface. Trois mécanismes sont impliqués dans l'absence des antigènes du système Luthéran :

Phénotype Lu (a-b-) de type récessif : caractérisé par l'absence totale de tout antigène Luthéran sur les hématies. Ces sujets peuvent former un allo-anticorps, anti-Lu<sup>a</sup>Lu<sup>b</sup> appelé anti-Lu<sup>3</sup> d'après la nomenclature internationale. Dans ce cas les individus Lu (a-b-) sont homozygotes pour une mutation qui inactive le locus Lu pour l'allèle Lu amorphe (Myhre et al. 1975).

Phénotype autosomal dominant Lu (a-b-) : caractérisé par un faible taux d'antigènes Lu sur les hématies. Ces sujets ne peuvent pas former d'anticorps anti-Lu<sup>a</sup>Lu<sup>b</sup> (anti-Lu<sup>3</sup>). Ce phénotype est secondaire à un gène dominant, In(Lu), qui inhibe l'expression des antigènes Luthéran. Ce gène affecte également l'expression d'autres protéines à la surface des hématies telles les protéines CD44 et MER2, les antigènes P1, i, Inb, Wj (Telen 1995).

Phénotype Lu (a-b-) : secondaire à un gène ayant un mode de transmission lié au chromosome X. L'allèle XS<sup>2</sup> atténue l'expression des gènes Lu mais n'affecte pas l'expression du CD44 (Mulley et al 1988).

Anticorps		Phénotype	Fréquence (%)
Anti-Lu <sup>a</sup>	Anti-Lu <sup>b</sup>		
+	-	<b>Lu (a+b-)</b>	<b>0.1</b>
+	+	<b>Lu (a+b+)</b>	<b>7.5</b>
-	+	<b>Lu (a-b+)</b>	<b>92.4</b>
-	-	<b>Lu (a-b-)</b>	<b>Très rare</b>

**Tableau 1 : Les fréquences phénotypes Lu dans la population caucasienne**  
(D'après Issit et Anstee 1998)

### ***1.1.1 ) LES ANTI Lu***

Les anticorps du système Luthéran peuvent être des hétéroanticorps ou alloanticorps.

Anti-Lu<sup>a</sup> : l'antigène Lu<sup>a</sup> étant rare et peu immunogène, les anti-Lu<sup>a</sup> sont rares. Le plus souvent, ce sont des IgM, plus rarement des IgG ou des mélanges IgM-IgG.

Anti-Lu<sup>b</sup> : anticorps extrêmement rares, puisque la fréquence de l'antigène correspondant est de 99,8%. Il s'agit en général d'alloanticorps de type IgG, ou IgM-IgG.

### ***1.1.2 ) IMPORTANCE CLINIQUE***

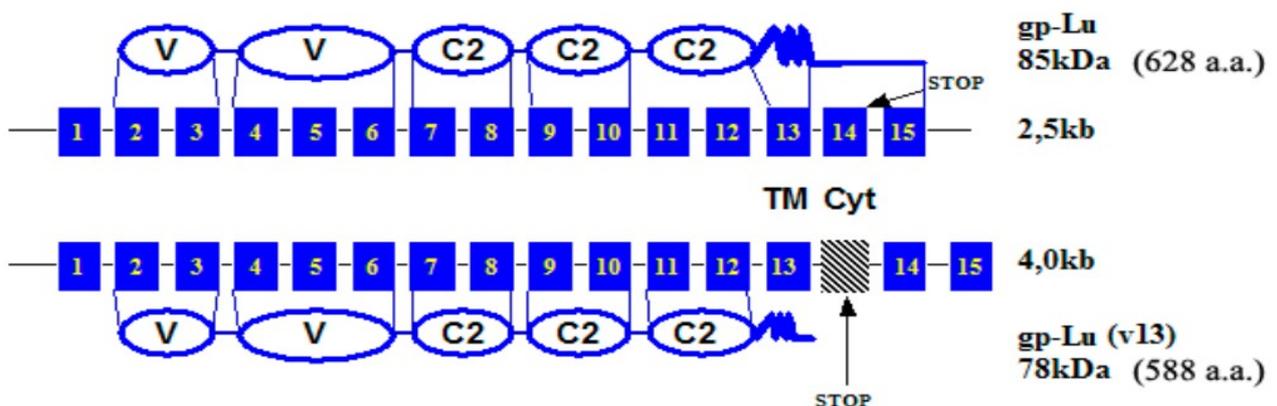
Les anticorps anti-Luthéran ont un titre faible et ne provoquent généralement que des incidents transfusionnels ou néonataux mineurs. Ils ne sont impliqués dans aucun cas grave de Maladie Hémolytique du Nouveau-né (MHNN), qui est dûe à la destruction des hématies de l'enfant par les anticorps présents chez la mère. Avec les anti-Lu<sup>b</sup>, les GRs de nouveaux nés de phénotype Lu (a-b+) réagissent plus faiblement comparé aux GRs d'adultes. Les GRs de nouveaux nés de phénotype Lu (a+b+) réagissent aussi très faiblement. Plusieurs cas peu sévères de MHNN, dont aucune n'a nécessité de transfusion, ont été décrits. Les anticorps anti-Luthéran peuvent être naturels irréguliers (IgM, anti-Lu<sup>a</sup>), c'est-à-dire être présent en dehors de tout contexte transfusionnel ou de grossesse, ou immuns (IgG, IgA). Les autres anticorps anti-Luthéran sont le plus souvent des IgG.

Les anti-Lu<sup>b</sup>, qui sont généralement exceptionnels, sont rarement impliqués dans des incompatibilités materno-fœtales. Ces dernières sont toujours bénignes (Kissmeyer-Nielsen 1960).

## I.2 ) LE GENOTYPAGE

La caractérisation structurale du gène LU a permis de déterminer les bases moléculaires du polymorphisme Lu<sup>a</sup> et Lu<sup>b</sup>. L'analyse des séquences nucléotides de l'allèle Lu<sup>a</sup>, et la comparaison avec la séquence de l'allèle Lu<sup>b</sup>, ont mis en évidence la transition A229G dans l'exon 3 entraînant une substitution His77Arg (El Nemer et al. 1997). Cette transition crée un site de restriction Acil spécifique de l'allèle Lu<sup>b</sup>, ce qui permet de génotyper les allèles Lu<sup>a</sup> et Lu<sup>b</sup>.

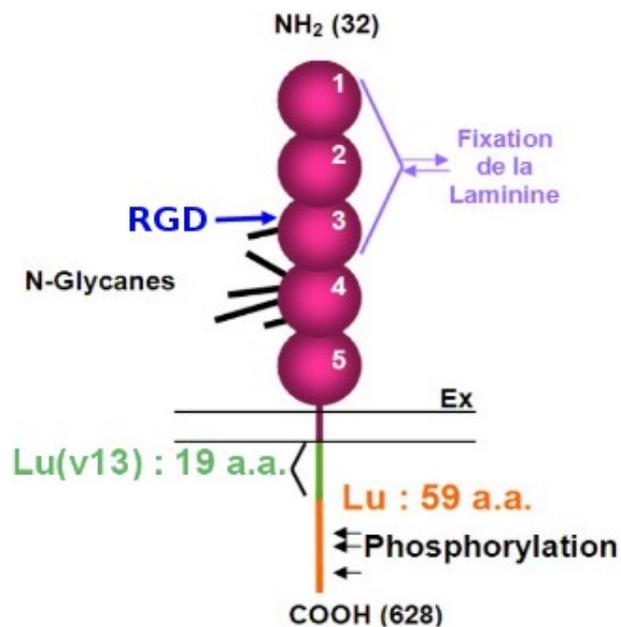
Très rapidement, il a été reconnu que l'activité des antigènes Luthéran disparaît après traitement par de nombreuses protéases et réactifs qui rompent les ponts disulfures. Mais les protéines exprimant les antigènes Luthéran n'ont été identifiées qu'en 1997 par Parsons et son équipe en utilisant un anticorps monoclonal Lu<sup>b</sup> (Moab; BRIC108) dans des immunoblots sur les composants de la membrane des globules rouges. Ils ont ainsi identifié deux glycoprotéines, respectivement de taille 85kDa et 78kDa de Lu<sup>b</sup> (Parsons et al. 1987). Elles sont générées par l'**épissage alternatif du gène LU** qui est localisé sur le chromosome 19q13.2-13.3 (Rahuel et al. 1996). Le gène LU a une taille de 12,5kb et est constitué de 15 exons dont la taille varie entre 71 et 498pb (Figure 1). L'intron 13 (978pb) subit un épissage alternatif qui est à l'origine de deux transcrits isoformes de 2,5 et 4,0kb codant respectivement les deux isoformes : Lu (628 acides aminés) et Lu(v13) (588 acides aminés). La présence de l'intron 13 dans le transcrite de 4,0kb fait apparaître un codon stop à la position 589 et génère l'isoforme courte Lu(v13) (Figure 2). Cette dernière est dépourvue des 40 derniers acides aminés (a.a) du domaine intra-cytoplasmique présents dans la glycoprotéine Lu (El Nemer et al. 1997).



**Figure 1 : Les glycoprotéines Lu et Lu(v13)**

Le gène LU est représenté par 15 exons. Pour chaque gp Lu, on retrouve les domaines : Variables (V), Constant (C2), Transmembranaire (TM) et Cytoplasmique (Cyt) pour Lu uniquement (D'après INSERM U665 2000)

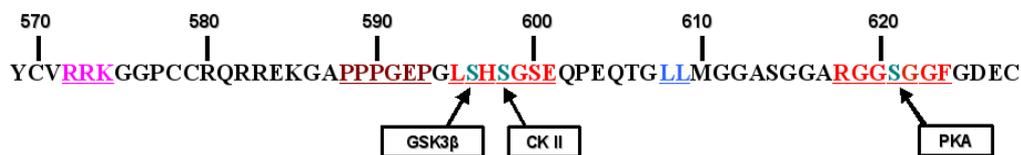




**Figure 3 : Structure des glycoprotéines de Lu/BCAM**  
(D'après INSERM U665 2000)

La glycoprotéine Lu/BCAM est transmembranaire et possède cinq domaines globulaires extracellulaires «Ig-like» (518 a.a.), deux domaines variables «V» (D1 et D2) du côté NH<sub>2</sub>, trois domaines constants «C2» (D3 à D5) (Campell et al. 1994; Parsons et al. 1995), une région transmembranaire de 19 a.a, et une partie cytoplasmique de 59 a.a. L'exon 1 code le peptide signal, les exons 2-12 codent les cinq domaines D1 à D5 «Ig-like» (deux exons par domaine, excepté le domaine D2 qui est codé par les exons 4-6). L'exon 13 code la région transmembranaire (Figure 1) et les exons 14 et 15 codent pour la partie cytoplasmique (Xu et al. 2001). La partie extracellulaire des gps Lu comprend aussi 5 sites potentiels de **N-glycosylation** (un site dans le domaine 3, et 4 sites dans le domaine 4) sur des asparagines respectivement en position 290, 346, 352, 388, et 408. Un motif **RGD** de liaison aux intégrines est présent dans le domaine 3. Le domaine transmembranaire (la partie hydrophobe) est de 20 a.a. Enfin le domaine cytoplasmique de 59 a.a (Figure 3), est composé de plusieurs sites différents (Parsons et al. 1995). Tout d'abord le site de liaison au cytosquelette (**RRK**) motif nécessaire pour une interaction directe avec la spectrine (Kroviarski et al. 2004). Ensuite un site potentiel de liaison aux domaines **SH3** (**PPPGEP**) suggérant le rôle possible de la glycoprotéine Lu dans une voie de signalisation intracellulaire (Parsons et al. 1995). Puis la glycoprotéine Lu possède 3 sites de phosphorylation par la Glycogène Synthétase Kinase 3β (**GSK 3β**), la Caséine Kinase II (**CK II**) et la Protéine Kinase A (**PK A**) respectivement en position des sérines **S596**, **S598**, **S621** (Figure 4). Ces sites de phosphorylation pourraient moduler l'affinité de la glycoprotéine pour ses ligands extracellulaires, son interaction

avec le cytosquelette, et être impliqués dans des processus de signalisation intracellulaire (Gauthier et al. 2005). Enfin le motif **dileucine (LL)** en position **L608, L609** est impliqué dans l'expression basolatérale de la glycoprotéine Lu dans les cellules épithéliales polarisées (El Nemer et al.1999).



**Figure 4 : Séquence des acides aminés du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine Lu/BCAM humaine**  
 (D'après Gauthier et al. 2005)

L'isoforme **Lu(v13)** a été identifiée comme marqueur tumoral de surface surexprimé dans certains cancers épithéliaux de l'ovaire et du côlon humain. En 1994, Campbell et son équipe ont montré que cette protéine avait une structure SFIg très proche de MUC18, un marqueur tumoral de mélanome humain impliqué dans les processus de métastase et de progression tumorale. Ces 2 glycoprotéines présentent 31% a.a identiques répartis sur l'ensemble de la protéine. Le clonage de Lu(v13) a été réalisé à partir d'un anticorps monoclonal G253 à l'aide d'une banque d'ADNc de la lignée cellulaire de carcinome de côlon HT29. L'analyse de sa séquence protéique de Lu(v13) déduite du clonage de l'ADNc, met en lumière une glycoprotéine transmembranaire de 588 a.a. La structure des glycoprotéines Lu(v13) est identique à celle de Lu sauf dans le domaine cytoplasmique plus court pour Lu(v13) (19 a.a) qui possède 40 a.a en moins du côté C terminal par rapport à Lu (Figure 3). Ainsi Lu(v13) conserve dans sa partie extracellulaire les 5 domaines «Ig-like» avec 5 sites potentiels de **N-glycosylation**, le motif **RGD**, et le site de liaison au cytosquelette (Campbell et al. 1994). Par contre elle a perdu le site potentiel de liaison aux domaines **SH3** et les sites de phosphorylation dans sa partie intra-cytoplasmique (Rahuel et al. 1996).

## II.2 ) Lu/BCAM MURINE

En 1999, le laboratoire a cloné le gène LU murin, qui présente une structure homologue à celle du gène LU humain composée de 15 exons et 14 introns. Onze des 15 exons murins ont une taille identique à celle de leurs homologues humains respectifs. L'exon 3 possède 3pb de moins par rapport à son homologue humain (Rahuel et al. 1999). Les exons 1, 9 et 15 présentent respectivement 21, 3 et 31pb supplémentaires par rapport à leurs homologues humains. En outre, la

taille des introns murins 2, 8 et 10 est supérieure à celle de ceux humains, conférant une plus grande taille au gène LU murin (17kb) par rapport à son homologue humain (12,5kb). Malgré la différence de taille pour 4 exons et 3 introns, la structure du gène LU est bien conservée entre la souris et l'homme. La glycoprotéine Lu murine présente 72.5% identité avec la glycoprotéine Lu humaine (El Nemer et al. 1997; Parsons et al. 1997). L'ADNc code pour une protéine transmembranaire de 622 a.a incluant un peptide signal. Le peptide signal de la protéine murine est de 25 a.a (6 a.a en moins par rapport à la glycoprotéine Lu humaine). Les 10 résidus cystéine indispensables pour la structure des 5 domaines «Ig-like» de la glycoprotéine Lu humaine sont conservés dans la glycoprotéine Lu murin, 2 domaines variables «V» et 3 domaines constants «C2» (Parsons et al. 2001). Le domaine extracellulaire de la glycoprotéine Lu murine possède 4 sites potentiels de **N-glycosylation** avec l'asparagine en position 314, 323, 370, 377 au lieu de 5 sites pour la glycoprotéine Lu humaine. Le motif **RGD** de liaison aux intégrines est conservé dans Lu/BCAM murin, mais se trouve dans le troisième domaine constant alors qu'il se trouve dans le premier domaine constant chez l'humain. La protéine murine possède 3 sites de phosphorylation pour la **Protéine Kinase C** et la **CK II** et **GSK 3β**. Par contre, le site potentiel de liaison aux domaines SH<sub>3</sub> (**PPPGEF**) de la glycoprotéine humaine n'est pas conservé chez la souris (**PPAREP**), (Parsons et al. 1995).

### **III ) EXPRESSION DE Lu/BCAM**

#### **III.1 ) CHEZ L'HOMME**

##### **III.1.1 ) CELLULES ERYTHROÏDES**

L'étude de l'expression des antigènes Lu à la surface des progéniteurs érythroïdes du sang périphérique, réalisée en cytométrie de flux, montre que ces derniers sont exprimés sur les GRs matures, mais également sur les érythroblastes à un stade tardif de la différenciation érythroïde (Daniels et Green 2000; Metral et al. 2009). Par contre l'antigène Lu n'est pas exprimé dans les leucocytes, ni dans les lignées cellulaires hématopoïétiques telles que K562, HEL,... L'expression de Luthéran dans le sang périphérique est restreinte aux GRs (Judson et al. 1988). Les glycoprotéines Luthéran sont des protéines peu abondantes dans la membrane de GRs. Elles ne joueraient probablement pas un rôle structural important, mais seraient plutôt impliquées dans des processus de transduction de signal.

### **III.1.2 ) TISSUS NON ERYTHROÏDES**

Les études d'Immuno-Histo-Chimie (IHC) utilisant des anticorps spécifiques de Lu/BCAM révèlent une immuno-réactivité dans plusieurs tissus au cours du développement. Toutefois, leurs épitopes étant situés dans le domaine extracellulaire, ces anticorps ne peuvent pas différencier Lu de Lu(v13) (Rettig et al. 1984, Parsons et al. 1995).

Dans les tissus fœtaux humains testés, les transcrits codant les gps Lu et Lu(v13) (le rein, le foie le cerveau, et le poumon) sont surexprimés par rapport aux transcrits des tissus adultes, ce qui suggère une régulation de l'expression du gène LU durant le développement (Rahuel et al. 1996). Il a été montré que l'expression de Lu/BCAM est régulée durant le développement du foie humain (et probablement du placenta), l'un des sites majeurs de l'hématopoïèse fœtale chez l'homme. En effet, des études d'Immuno-Histo-Chimie révèlent que les antigènes Lu sont fortement exprimés dans le premier trimestre des hépatocytes fœtaux, moins fortement exprimés dans le second trimestre, alors que les hépatocytes adultes ne présentent aucune, ou une très faible expression des antigènes Lu (Parsons et al. 1995).

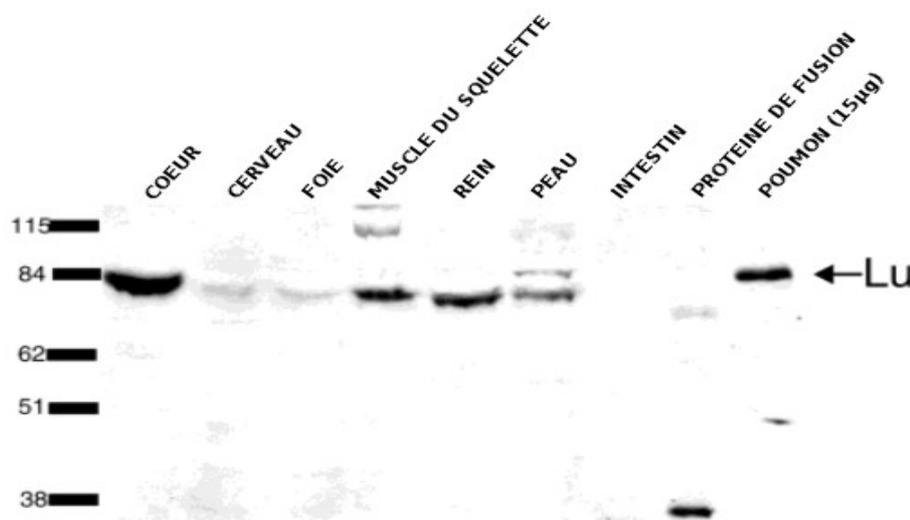
Dans les tissus adultes normaux humains, le transcrit Lu à 2,5kb est exprimé dans le colon, le petit intestin, l'ovaire, le testicule, la prostate, le thymus, la rate, le pancréas, le rein, le muscle squelettique, le foie, le poumon, le placenta, le cerveau, le cœur et la moelle osseuse (Rahuel et al 1999). Le transcrit Lu(v13) à 4,0kb est très faiblement exprimé, voir absent dans ces mêmes tissus sauf dans l'ovaire, la prostate, le rein, le foie et la moelle osseuse. Les deux transcrits sont absents des lymphocytes (Rahuel et al. 1996). D'autres équipes ont montré que la gp Lu/BCAM est très faiblement exprimée dans l'épiderme normal, alors qu'elle est fortement exprimée dans les follicules des cheveux (Drewniok et al. 2004). Récemment, son expression a été montrée dans les gencives et les glandes salivaires (Willberg et al. 2007). Lu/BCAM a une expression prédominante dans les couches basales des épithélia, et plus particulièrement au pôle basale et latérale des cellules épithéliales polarisées, grâce à son motif dileucine. L'isoforme courte Lu(v13) dépourvue de ce motif, montre au contraire une expression dépolarisée dans ces cellules (El Nemer et al. 1999). Lu/BCAM est également exprimée dans les cellules trophoblastiques du placenta, autour des glandes muqueuses, les cellules du muscle lisse et squelettique, les cellules tubulaires des testicules, les acini du pancréas, dans les alvéoles et tubes bronchiaux du poumon, et les cellules endothéliales du système vasculaire.

Lu/BCAM est également surexprimé dans certains cancers du sein, du poumon, du colon, de l'ovaire (Campbell et al. 1994) et dans les mélanomes, ainsi que dans des processus inflammatoires,

comme la dermatite aiguë de contact. (Shrön et al. 2000). L'expression de Lu/BCAM est régulée au cours du développement du foie humain avec disparition de son expression dans les hépatocytes adultes. Toutefois, son expression peut réapparaître dans les hépatocytes adultes lors des cancers du foie. Dans les carcinomes hépatiques, les laminines 511 et 521 sont secrétées par les hépatocytes et sont déposées dans les lames basales hépatiques sous-jacentes aux vaisseaux sanguins et aux voies biliaires. Il en résulte alors une adhérence ectopique des hépatocytes à la laminine médiée par Lu/BCAM (Kikkawa et al. 2008).

### III.2 ) Lu/BCAM DANS DIVERS TISSUS MURINS

Une analyse par «Western blot» a été effectuée sur des tissus murins en utilisant un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine extracellulaire de la glycoprotéine Lu murine. L'expression de la glycoprotéine Lu est détectée dans la plupart des tissus obtenus à partir de **souriceau**. La glycoprotéine Lu est fortement exprimée dans le cœur, le poumon, le muscle squelettique, le rein et faiblement détectée dans le cerveau, le foie (Figure 5); mais elle absente dans l'intestin de **souriceau** (Rahuel et al. 1999; Moulson et al. 2001). En 2008, Rahuel et son équipe prouvent les glycoprotéines Lu/BCAM ne sont pas exprimées sur les globules rouges chez la souris.



**Figure 5 : Analyse par «Western-blot» de l'expression de Lu dans les tissus d'un souriceau, 50µg de protéines totales par tissu Ac Lu au 1/2 000 (D'après Moulson et al. 2001).**

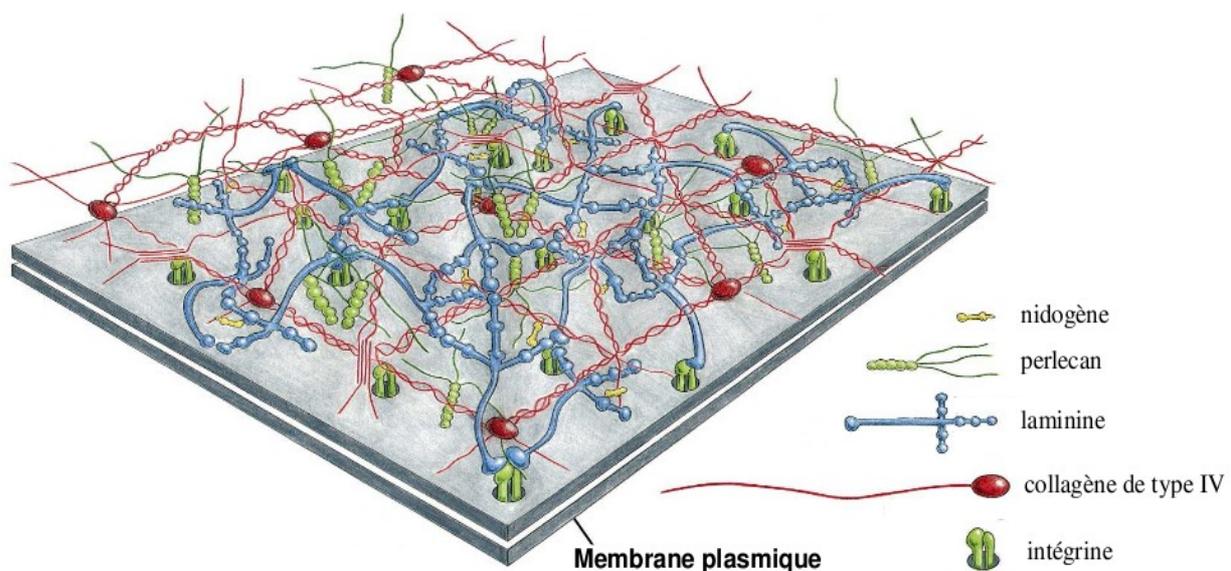
## IV ) Lu/BCAM RECEPTEUR DE LAMININE 511-521

### IV.1 ) LES LAMININES

Les laminines sont une famille de macromolécules multifonctionnelles (Figure 6), composants majeurs des membranes basales (Aumailley et Smyth 1998). Les membranes basales ont une structure mince en feuillet attendant à de nombreux types cellulaires, comme l'épithélium, l'endothélium, le muscle, la graisse et des nerfs périphériques. Les membranes basales sont des structures tridimensionnelles dues des interactions complexes entre différents composants principalement : les laminines, le collagène IV, le perlecan et le nidogène (Timpl et Brown 1996).

En plus de leur rôle dans le regroupement et l'intégrité architecturale de la membrane basale, les laminines interagissent avec les cellules et influencent la prolifération, la différenciation, l'adhérence et la migration. Ces processus sont activés dans les états normaux et pathologiques (Tzu et Marinkovich 2008).

Les profils d'expression des isoformes des laminines sont régulés de manière temporelle et spatiale au cours du développement. La **chaîne  $\alpha 5$** , présente dans les **laminines 10 (511 ou  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ )**, **11 (521 ou  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ )**, et **15 (523 ou  $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ )**, est largement exprimée partout chez l'adulte au niveau des épithéliums, le muscle lisse, le muscle squelettique, les tissus neuromusculaire et vasculaires. On la trouve aussi en quantités importantes au cours de l'embryogenèse (Colognato et Yurchenco 2000).



**Figure 6 : La membrane basale**  
(D'après Colognato et Yurchenco 2000)

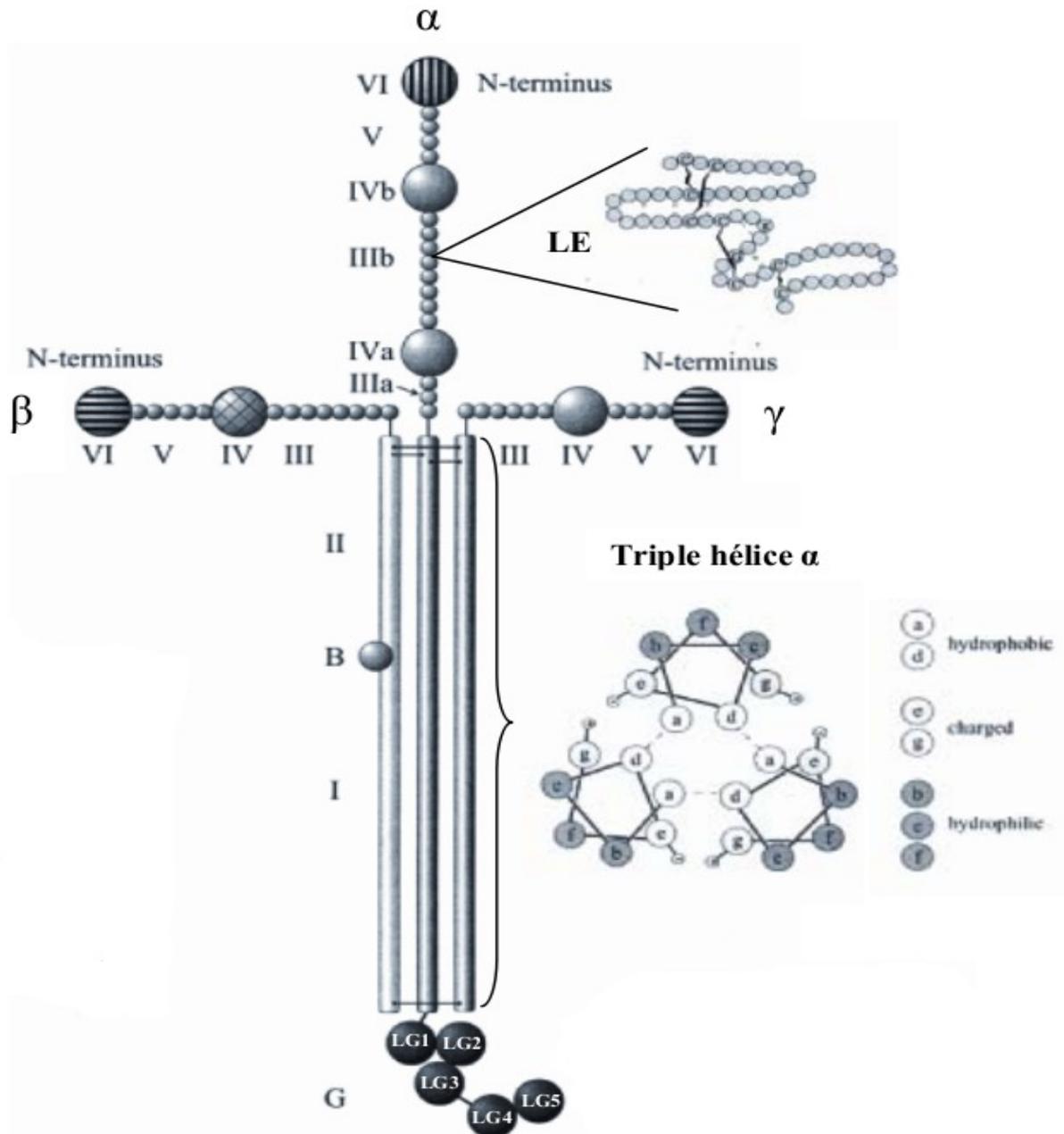
#### **IV.1.1 ) LEUR STRUCTURE**

Les laminines sont des molécules de haut poids moléculaire (entre 500 et 1000kDa) et présentent une structure de base en forme de croix avec 3 bras courts et un bras long. Les bras courts sont formés par les parties NH<sub>2</sub>-terminales des 3 chaînes, les parties COOH-terminales étant associées en triple hélices et formant le bras long, qui se termine par une structure globulaire nommée domaine G portée par la chaîne  $\alpha$ . Une nouvelle nomenclature a été récemment adoptée. Les différentes isoformes de laminines se sont vu attribuer un numéro à trois chiffres reflétant leur composition en chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Aumailley et al. 2005). Le nombre de chaînes connues à ce jour est de cinq pour  $\alpha$ , trois pour  $\beta$  et trois pour  $\gamma$  (Miner et Yurchenco 2004). Le nombre d'isoforme de laminines connues à l'heure actuelle est de 16 chez la souris et l'homme (Aumailley et al. 2005). Les chaînes distinctes sont maintenues ensemble sous forme de triple hélice  $\alpha$  par des ponts disulfures (Miner et Yurchenco 2004b). L'assemblage des laminines dans la membrane basale nécessite la polymérisation des bras courts et l'attachement cellulaire par un domaine G (Mckee et al. 2007). La plus grande chaîne est la chaîne  $\alpha$ , qui contient le bras long sur l'extrémité COOH-terminale et un bras court à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale. La [figure 7](#) montre la structure de la laminine 1 ( $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ), qui est très proche de celle de la laminine 511/521.

**Le domaine G** constitue la partie COOH-terminale de la chaîne  $\alpha$ . Il se subdivise en 5 sous-domaines LG1 à LG5. Ils comportent un tiers des acides aminés (900 résidus) composant la chaîne  $\alpha$ . Ces 5 sous-domaines ont une structure globulaire très compactée en feuillet  $\beta$  de 14 brins antiparallèles disposés en 2 couches (Tunggal et al. 2000). Ils ne sont pas interrompus par d'autres régions à l'exception des sous-domaines LG3 et LG4 séparés par une région «espaceuse» (Timpl et al. 2000). Ces 5 sous-domaines LG1 à LG5 sont impliqués dans les interactions avec des récepteurs cellulaires, tels que les intégrines et les  $\alpha$ -dystroglycans. L'extrémité N terminale du bras court est également capable de se lier aux intégrines, bien qu'il soit davantage associé à la polymérisation de la molécule (Patarroyo et al. 2002).

**Les domaines I et II** représentent la plus grande portion de la protéine et correspondent à la région de connexion des 3 chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , associées en triple hélice. Chaque hélice  $\alpha$  comprend 600 a.a disposés en répétition d'heptamères (abcdefg)<sub>n</sub> où a et d sont des acides aminés hydrophobes, e et g des acides aminés chargés et c et f de résidus hydrophiles. Les hélices sont reliées entre elles par des ponts disulfures qui assurent au trimère une grande stabilité. La chaîne  $\beta$  présente la particularité de posséder un domaine B qui sépare les domaines I et II. Ce domaine supplémentaire est relativement petit (35 a.a) et riche en glycines et en cystéines (Aumailley et

Smyth 1998).



**Figure 7 : Modèle schématique de la chaîne  $\alpha 1$  de laminine**  
(Tunggal et al. 2000)

**Les domaines III et V** sont localisés au niveau des bras courts et présentent des séries de 3 à 8 modules nommés LE (EGF like), de type EGF mais comprenant 2 résidus cystéines supplémentaires.

**Les domaines IV** sont des domaines globulaires qui séparent les domaines III et V. La chaîne  $\alpha$  en contient 2 : IVa et IVb.

**Les domaines VI** constituent les domaines terminaux des bras courts des laminines. Il s'agit de domaines globulaires possédant un motif WWQS très conservé entre les espèces et suivi d'une séquence riche en cystéine. Ces domaines sont indispensables à l'assemblage des laminines en réseau (d'où leur seconde dénomination en domaines LN). La perte de ce domaine empêche en effet l'intégration de la molécule au sein de la lame basale (Tunggal et al. 2000).

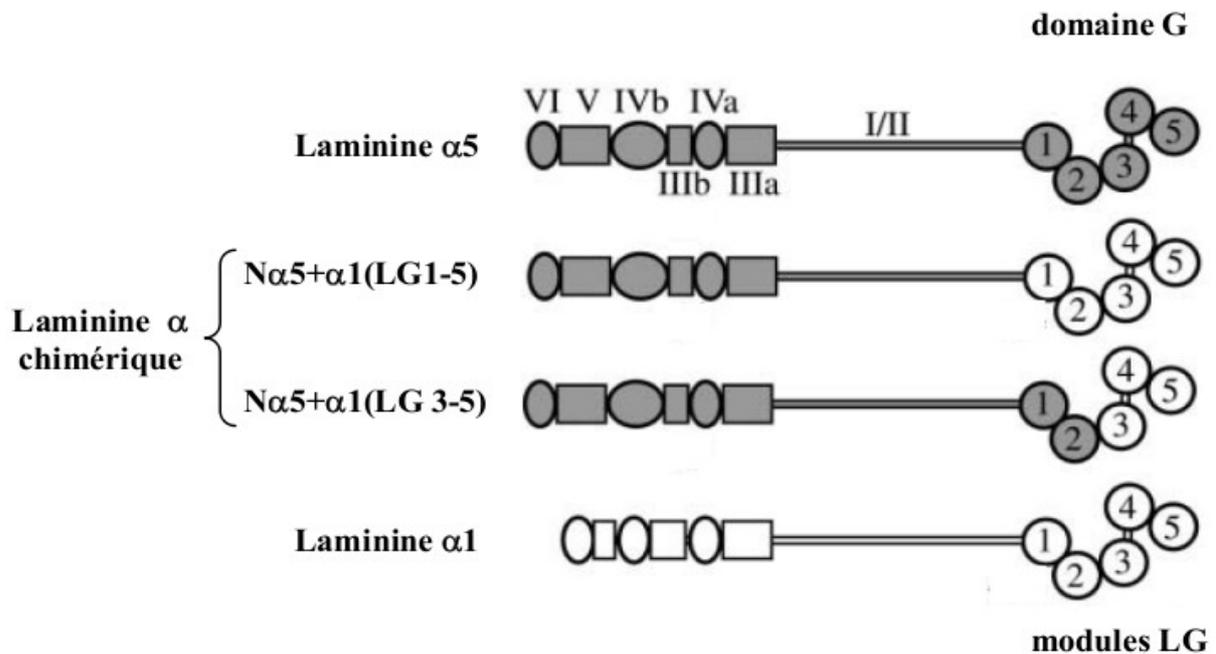
La chaîne  $\alpha 5$  laminine représente la chaîne  $\alpha$  laminine la plus **ubiquitaire**. On la retrouve exprimée dans de nombreux tissus lors du développement embryonnaire et dans les tissus adultes humains et murins au niveau des lames basales. Elle présente 4 isoformes de laminines : la laminine 10 (521 ou  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ), 11 (521 ou  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ), 15 (523 ou  $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ ), 16 (522 ou  $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ ) (Aumailley et al. 2005; Tzu et Marinkovich 2008). La chaîne  $\alpha 5$  laminine murine est fortement exprimée au cours du développement et chez l'adulte dans de nombreux tissus incluant le rein, les poumons, le muscle squelettique, la peau et l'intestin (Miner et al. 1995; Miner 2008).

#### ***IV.1.2) LA CHAÎNE ALPHA 5***

La fonction de la chaîne  $\alpha 5$  laminine a été mise évidence par Miner et ces collaborateurs par inactivation du gène Lama5 chez la souris. Cette invalidation du gène Lama5 engendre une létalité fœtale des souris homozygotes mutantes à partir du 13,5 - 16,5 jours de développement embryonnaire. Les embryons mutants présentent de nombreuses anomalies : absence de fermeture du tube neural (exencéphalie), absence de séparation digitale (syndactylie), défauts sévères de placentation très probablement responsables de la létalité, yeux absents ou atrophiés. Ils ont aussi observé des problèmes de morphogenèse au niveau des poumons, des reins et de l'intestin. Ces anomalies au niveau de ces organes ne provoquent pas la mort des embryons, mais leur addition aux défauts de placentation contribue certainement à une mort plus précoce des embryons sévèrement atteints. La chaîne  $\alpha 5$  laminine est donc essentielle au développement fœtal (Miner et al. 1998).

Afin de déterminer les domaines de la chaîne  $\alpha 5$  nécessaires au développement des souris transgéniques exprimant une protéine chimère entre les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$  ont été créées. Les principaux sites d'interaction des chaînes  $\alpha$  avec les récepteurs membranaires se situant au niveau des sous-domaines (LG) de la région COOH-terminale, deux chaînes  $\alpha$  laminines chimériques ont été réalisées en remplaçant totalement ou partiellement des sous-domaines LG de la chaîne  $\alpha 5$  laminine (Figure 9) par ceux de la chaîne  $\alpha 1$  laminine (Figure 7). Les souris transgéniques exprimant l'une ou l'autre de ces protéines chimères ont été croisées avec les souris Lama5<sup>-/-</sup> (Figure 8). Les souris ( $\alpha 5^{-/-}$ ; N $\alpha 5$ + $\alpha 1$ (LG1-5)) en résultant, où tous les sous-domaines G ont été inter-changés, ne sont pas viables, présentent les mêmes défauts phénotypiques que les souris

lama5<sup>-/-</sup>, mais avec une incidence moindre. Les embryons lama5<sup>-/-</sup> sont de taille réduite, alors que les embryons (α5<sup>-/-</sup>; Nα5+α1(LG1-5)) ont une taille normale. Les souris (α5<sup>-/-</sup>; Nα5+α1(LG3-5)), qui conservent donc les sous-domaines LG1 et LG2 de la chaîne α5, naissent sans phénotype visible mais meurent au bout de quelques mois d'une insuffisance rénale. Ainsi, les sous-domaines LG1 et LG2 de la chaîne α5 laminine sont indispensables au développement et ceux de la chaîne α1 laminine ne peuvent pas les compenser, ce qui indique une grande spécificité fonctionnelle propre à chaque chaîne α laminine (Kikkawa et al. 2003).



**Figure 8 : Structures des chaînes α1/5 laminines sauvages et chimériques**  
(D'après Kikkawa et al. 2003)

Dans 20% des cas, les embryons déficients pour la chaîne α5 laminine présentent une absence d'un ou des deux reins, parfois associée à une absence des uretères. Pour le reste, les embryons ont des reins de taille réduite qui présentent des défauts de glomérulogénèse. Leurs glomérules se développent à un stade plus tardif où l'on devrait normalement assister à un remodelage de la composition de la lame basale glomérulaire, avec une perte d'expression de la chaîne α1 laminine remplacée par la chaîne α5 laminine. Or, la lame basale glomérulaire se désagrège induisant une exclusion des cellules endothéliales et mésangiales vers l'extérieur du glomérule et une désorganisation des podocytes. Outre son rôle de filtre, la lame basale glomérulaire par la présence de la chaîne α5 laminine, est donc nécessaire à la glomérulogénèse et notamment à l'arrangement et à la différenciation des podocytes (Miner et Li 2000).

### **IV.1.3 ) LES SITES D'INTERACTIONS DE LA CHAÎNE ALPHA 5 AVEC SES RECEPTEURS**

Les laminines agissent sur les cellules par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Ils sont généralement répertoriés en 2 classes :

► Les récepteurs de types **intégrines** sont une grande famille d'hétérodimères composés d'une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  qui déclenchent des cascades de signalisation lors de la liaison avec le ligand. Ils contribuent principalement au maintien de la migration cellulaire et de la cohésion tissulaire (Humphries 2000).

► Les récepteurs de types non-intégrines qui se lient aux chaînes  $\alpha 5$  laminines sont de trois sortes. Deux de ces classes sont des protéoglycanes à héparane sulfate : le **dystroglycane**, composé d'une chaîne  $\alpha$  extracellulaire associée à une chaîne  $\beta$  transmembranaire, les **syndecanes** et le troisième est **Lu/BCAM** (Suzuki et al. 2005).

#### **IV.1.3.1 ) Les sites d'interactions sur le domaine G au niveau COOH-Terminal**

Le domaine G de la chaîne  $\alpha 5$  laminine composé de cinq modules G homologues (LG1-5), est impliqué dans diverses fonctions biologiques. Des expériences utilisent des protéines recombinantes et des peptides synthétiques recouvrant le domaine G de la chaîne  $\alpha 5$  laminine. Elles ont montré que les domaines LG de la chaîne  $\alpha 5$  laminine présentent une capacité d'adhérence différente, dont la répartition sur le domaine G varie suivant le type cellulaire.

Le domaine G de la chaîne  $\alpha 5$  laminine a été produit dans des cellules de mammifères transfectées en modules simples de sous-domaines LG (LG1, LG2, LG3, LG4, LG5) et deux fragments recombinants,  $\alpha 5$ LG1-3 et  $\alpha 5$ LG4-5.

#### **-Avec Lu/BCAM**

Dans une étude, l'équipe de Kikkawa prépare une protéine recombinante soluble contenant le domaine extracellulaire de Lu (Sol-Lu). Sol-Lu s'associe à la laminine 10/11 et reconnaît spécifiquement la chaîne  $\alpha 5$  laminine sur coupe de tissus. Pour identifier le site de liaison de Lu sur la chaîne  $\alpha 5$  laminine in vivo, des souris  $\text{lama5}^{-/-}$  et transgéniques pour une chaîne  $\alpha 5$  laminine modifiée avec des sous-domaines LG de substitutions dérivés de la chaîne  $\alpha 1$  laminine ont été utilisées. La protéine recombinante Sol-Lu ne se fixe pas sur le tissu musculaire squelettique, qui exprime une chaîne  $\alpha 5$  laminine sans sous-domaines LG4-5. Par contre Sol-Lu se fixe au tissu musculaire exprimant une chaîne  $\alpha$  chimère  $\text{Na5}+\alpha 1(\text{LG4-5})$ , mais pas à celui  $\text{Na5}+\alpha 1(\text{LG3-5})$ . L'explication est la suivante, le **Lu/BCAM** s'associe au sous-domaine LG3 de la chaîne  $\alpha 5$  laminine. Mais les sous-domaines LG4 et LG5 sont nécessaires pour donner à la laminine une

conformation adéquate nécessaire à cette liaison (Kikkawa et al. 2002). L'interaction de la glycoprotéine Lu/BCAM avec la chaîne  $\alpha 5$  laminine est médiée par les charges négatives des domaines extracellulaires D2, D3 contenant de résidus d'acide glutamique et aspartique (Mankeno et al. 2007; Burton et Brady 2008).

#### **-Avec les intégrines**

L'adhérence des cellules épithéliales aux fragments  $\alpha 5$ LG1-3 est d'une part totalement inhibée par l'anticorps bloquant dirigé contre la sous-unité  $\beta 1$  d'intégrine et d'autre part partiellement inhibée par un anticorps anti- $\alpha 3$  ou anti- $\alpha 6$  intégrine. En revanche, aucun anticorps anti-intégrine n'inhibe la liaison des cellules aux fragments  $\alpha 5$ LG4-5. Ceci est la preuve que les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  se lient sur le fragment  $\alpha 5$ LG1-3 du domaine G de la chaîne  $\alpha 5$  laminine (Kikkawa et al. 2000; Yu et Talts 2003).

#### **-Avec les protéoglycanes**

L' $\alpha$ -dystroglycane se lie au niveau du segment LG4-5 de la chaîne  $\alpha 5$  laminine. Car l' $\alpha$ -dystroglycane purifié ne se fixe pas sur le  $\alpha 5$ LG1-3, ni sur LG4 et LG5 seuls. Mais surtout l'interaction de l' $\alpha$ -dystroglycane nécessite la conformation du tandem LG4-LG5 (Ido et al. 2004).

#### **-Avec les syndécanes**

Le module LG4 recombinant de la chaîne  $\alpha 5$  laminine du domaine G interagit avec un récepteur de surface cellulaire contenant de l'héparane sulfate et de l'héparine, non identifié jusqu'à ce jour (Nielsen et al. 2000). L'héparine est analogue à l'héparane sulfate. Il inhibe la liaison des cellules à des peptides du segment  $\alpha 5$ LG4-5. Makino et son équipe ont suggéré que les syndécanes peuvent se lier au module  $\alpha 5$ LG4 (Makino et al. 2002; Suzuki et al. 2005).

#### **IV.1.3.2 ) Les sites d'interactions au niveau $NH_2$ -Terminal**

La construction d'un module  $\alpha 5$ VI recombinant a permis de démontrer un site d'adhésion cellulaire sur le domaine VI de la chaîne  $\alpha 5$  laminine. L'héparine est capable d'inhiber un grand nombre de liaison cellulaire au domaine VI, traduisant un grand potentiel de liaison de syndécanes à ce niveau. Les anticorps anti-intégrine  $\alpha 3$  ou  $\beta 1$  inhibent très fortement la liaison des cellules au domaine  $\alpha 5$ VI. Or, les anticorps anti-intégrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  ou  $\alpha 6$  inhibent partiellement cette liaison. Cela démontre que les intégrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$  peuvent d'associer avec le domaine VI  $NH_2$ -terminal de la chaîne  $\alpha 5$  laminine (Nielsen et Yamada 2001).

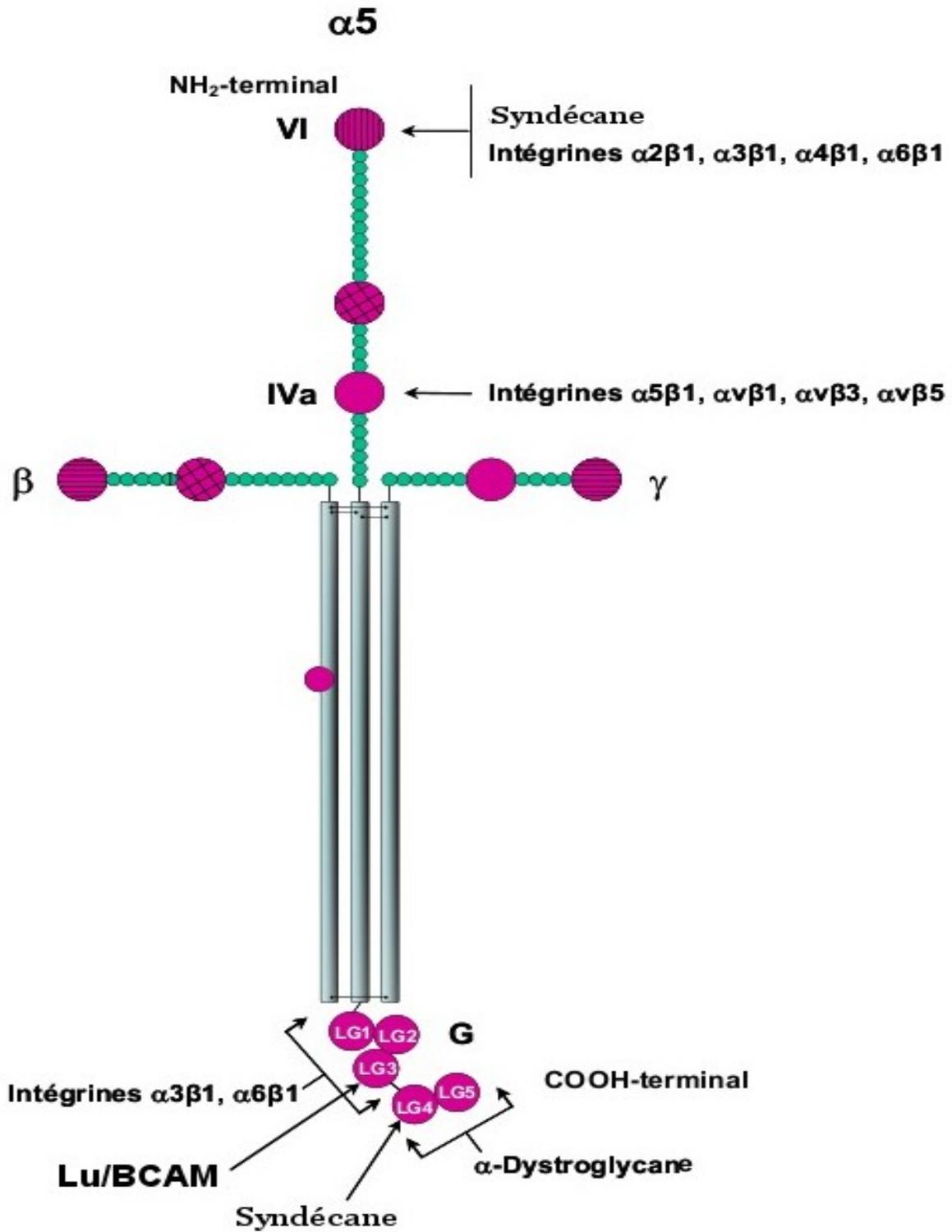


Figure 9 : Les sites d'interaction de la chaîne  $\alpha 5$  laminine avec ses récepteurs  
(D'après Tunggal et al. 2000; Suzuki et al. 2005)

### **IV.1.3.3 ) Les sites d'interactions sur le domaine IVa**

Le domaine IVa de la chaîne  $\alpha 5$  laminine contient 2 séquences RGD qui notamment contribuent à l'adhésion de différents types cellulaires. L'utilisation des anticorps anti-intégrines  $\beta 1$  montrent une inhibition complète; alors les anticorps anti-intégrines  $\alpha \nu \beta 5$ ,  $\alpha \nu$  ou  $\alpha 5$  inhibent partiellement la liaison de certains types de cellules à un domaine  $\alpha 5$ IVa recombinant. Les anticorps anti-intégrines  $\alpha 3$  ou  $\alpha 6$  n'ont pas d'effet. De plus, un peptide bloquant les sites RGD inhibe totalement ces liaisons démontrant que l'adhésion cellulaire au domaine IVa de la chaîne  $\alpha 5$  laminine se fait par les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha \nu \beta 5$  et potentiellement par  $\alpha \nu \beta 1$   $\alpha \nu \beta 3$  sur les 2 séquences RGD (Sasaki et Timpl 2001).

## **IV.2 ) INTERACTION Lu/BCAM–LAMININE ALPHA 5**

### **IV.2.1 ) Lu/BCAM RECEPTEUR DES LAMININES 511/521 DANS LES CELLULES ERYTHROÏDES**

Lu/BCAM est le récepteur de la chaîne  $\alpha 5$  des laminines 511/521 sur les progéniteurs érythroïdes, les GRs matures et drépanocytaires (El Nemer et al. 1998). En 1995, Gee et Platt ont montré que la laminine se lie à une protéine de 80kDa présente à la surface des GRs normaux et drépanocytaires, et ont observé une liaison augmentée de la laminine avec cette même protéine sur les GRs drépanocytaires. Ils conclurent alors que le CD44, récepteur de l'acide hyaluronique (Aruffo et al. 1990), dont la taille est de 80kDa, est le récepteur de la laminine à la surface des GRs, bien que les GRs normaux et drépanocytaires expriment des quantités équivalentes de CD44 à leur surface (Gee et Platt 1995). Udani et son équipe ont également montré que la laminine se fixe aux GRs, par l'intermédiaire de Lu/BCAM. En effet, en incubant de la laminine soluble avec des GRs de phénotype Lu (a-b+), ou dépourvus des antigènes Lu (a-b-), ils ont observé une corrélation entre la liaison de la laminine aux GRs et la présence des antigènes Lu à leur surface (Udani et al. 1998). En accord avec les résultats de notre laboratoire, ils ont aussi montré que la laminine est le seul ligand des antigènes Lu érythrocytaires, puisque les GRs de phénotype Lu positif n'adhèrent ni à la fibronectine, ni à la vitronectine, ni à la transferrine, ni au fibrinogène (ou à la fibrine) en conditions d'adhérence statique. Seuls les antigènes Lu sont nécessaires à la liaison à la laminine.

Par ailleurs, des expériences utilisant la cytométrie en flux pour quantifier le taux de liaison de laminine soluble aux GRs exprimant Lu/BCAM, ont montré que le taux de liaison de la laminine à la surface des GRs normaux et drépanocytaire est corrélé aux taux d'expression des antigènes Lu à leur surface. Il y a plus de laminine soluble qui se fixe aux GRs drépanocytaires qu'aux GRs

normaux. L'effet totalement inhibiteur de la protéine chimérique soluble Lu/BCAM sur la capacité de fixation de la laminine aux GRs normaux et drépanocytaires, démontre la spécificité de l'interaction, et l'implication de Lu/BCAM. Ils ont aussi montré l'absence d'autre récepteur érythrocytaire de la laminine (El Nemer et al. 1998).

Des tests d'adhérence en flux ont montré que les GRs drépanocytaires se lient aux laminines immobilisées, et résistent mieux aux forces de cisaillement (forces qui s'exercent tangentiellement à la surface de la membrane) que les GRs normaux. En 1998, il est montré que les antigènes Lu sont surexprimés à la surface des GRs drépanocytaires par rapport aux GRs normaux (El Nemer et al. 1998). En 1999, Zen et son équipe ont montré que les GRs drépanocytaires ont en moyenne 67 % de molécules Lu/BCAM en plus à leur surface que les GRs normaux (Zen et al. 1999).

C'est en utilisant des expériences d'adhérence statique sur substrats spécifiques que Lee et son équipe ont réussi à montrer que les antigènes Lu fixent la chaîne  $\alpha 5$  des laminines 511 et 521. Par ce biais, ils ont également montré que les GRs drépanocytaires fixent les laminines placentaires humaines, mélange des cinq chaînes  $\alpha$ , trois chaînes  $\beta$  et deux chaînes  $\gamma$ , mais ne fixent pas les laminines 111 de la tumeur Engelbreth-Holm-Swarm (E.H.S) chez la souris, ni la laminine 211 humaine, éliminant ainsi l'interaction avec les chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\gamma 1$  (Lee et al. 1998). Enfin, ils ont montré que l'anticorps monoclonal 4C7, dirigé contre la chaîne  $\alpha 5$  de la laminine, réduit de manière significative l'adhérence des GRs drépanocytaires à la laminine. Ainsi ils concluent que la chaîne  $\alpha 5$  contient le site de fixation sur lequel se fixent les GRs drépanocytaires.

C'est en 2001 que l'équipe de Parsons confirme ce résultat chez la souris, en montrant qu'une construction Fc-Lu/BCAM murine soluble, ou des cellules érythroleucémiques murines (MEL) exprimant Lu/BCAM, adhèrent uniquement aux laminines 511/521 et non aux laminines 111 et 211 (Parsons et al. 2001).

Par ailleurs, El Nemer et son équipe ont également montré que des cellules érythroleucémiques humaines K562 non adhérentes, surexprimant les deux isoformes, longue Lu/BCAM et courte Lu(v13), acquièrent des propriétés d'adhérence à la laminine, et lient de façon équivalente les laminines 511/521 immobilisées en conditions statiques (El Nemer et al. 1998).

#### **IV.2.2 ) Lu CO-RECEPTEUR DES LAMININES 511/521 DANS LES TISSUS NON-ERYTHROÏDES**

Lu/BCAM n'est pas spécifique des GRs, et il est également exprimé à la surface des cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins, et les cellules épithéliales de nombreux tissus comme le rein, la peau, l'ovaire, le colon, la prostate, l'intestin et la glande thyroïde (Parsons et al. 1995; Rahuel et al. 1999).

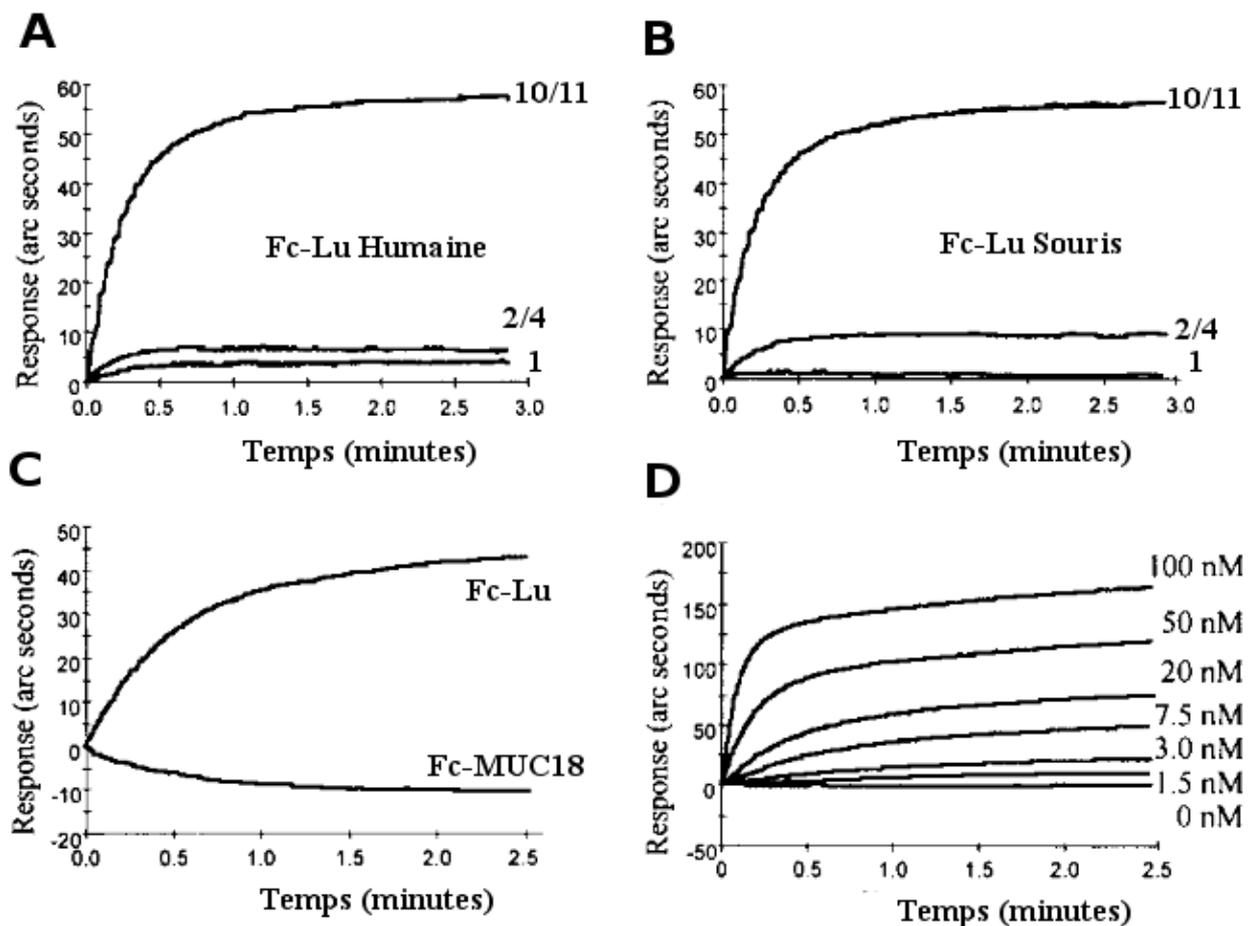
Lu/BCAM est localisé au pôle basal des cellules épithéliales et sur les cellules musculaires, en contact avec les membranes basales dans lesquelles la chaîne  $\alpha 5$  des laminines est exprimée. Chez la souris, l'inactivation du gène de la chaîne  $\alpha 5$  de la laminine conduit à une forte diminution de Lu/BCAM au pôle basal des cellules épithéliales de rein, et des cellules du muscle lisse adjacentes aux membranes basales exprimant cette chaîne. Par ailleurs, des souris transgéniques surexprimant la chaîne  $\alpha 5$  présentent une augmentation de l'expression de Lu/BCAM dans ces mêmes cellules adjacentes aux membranes basales exprimant la chaîne  $\alpha 5$  (Moulson et al. 2001). La chaîne  $\alpha 5$  semble favoriser la concentration de Lu/BCAM au pôle basale des cellules épithéliales et musculaires adjacentes aux membranes basales exprimant la chaîne  $\alpha 5$  de la laminine.

La chaîne  $\alpha 5$  de la laminine possède d'autres ligands comme les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$  (Kikkawa et al. 2000; Sasaki et Timpl 2001). Chez la souris, l'adhérence des cellules mésangiales glomérulaires à la chaîne  $\alpha 5$  laminine est médiée à la fois par Lu/BCAM et l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  (Kikkawa et al. 2003), alors que dans des cellules endothéliales humaines, l'adhérence à la laminine 511 nécessite, au contraire, la coopération de Lu/BCAM et des intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  (Nicolas et al. 2003). Une analyse détaillée de l'organisation moléculaire de la membrane basale des îlots pancréatiques chez l'homme montre que Lu/BCAM contribue significativement au maintien des îlots pancréatiques humains sur leur membrane basale. En effet, des études d'Immuno-Histo-Chimie ont montré que Lu/BCAM permet l'adhérence des cellules  $\beta$  (produisent et libèrent de manière endocrine l'insuline) à la laminine 511, unique isoforme présente dans la membrane basale endocrine chez l'homme. Cette adhérence peut être bloquée, de manière compétitive, par une forme soluble de Lu/BCAM ainsi que par deux anticorps dirigés, soit contre les chaînes  $\alpha 3$ , ou  $\beta 1$  des intégrines (Virtanen et al. 2008).

#### **IV.2.3 ) FORTE AFFINITE ENTRE Lu/BCAM ET LAMININE 511-521**

La première étape consiste à préparer des suspensions de laminine 1, 2, 4, 10 (511) et 11 (521) humaine et de souris, à partir des souris Engelbreth Schwarm Holm (EHS) de cultures de cellules tumorales ou de placenta humain. Chaque suspension contient une proportion faible en

laminine 10 et 11 (concentration finale 24nM) par rapport aux autres laminines. Pour définir l'isoforme de laminine qui s'associe avec la glycoprotéine Lu, les auteurs ont utilisé la technique d'interaction protéine-protéine en temps réel appelée Biacore (mesure de l'affinité entre deux protagonistes). Le protocole de fixation sur support de la glycoprotéine recombinante humaine Fc-Lu a permis de purifier par affinité la laminine 10/11 brute humaine ou de souris avec une forte affinité. En comparaison une association faible est observée pour une même concentration molaire des préparations de laminine (1, 2, ou 4) brute humaine (Figure 10A). Chez la souris, on observe quasiment la même chose, sauf que la laminine 1 n'a aucune liaison avec Fc-Lu (Figure 10B).



**Figure 10 : Une liaison spécifique avec une forte affinité entre la laminine 10/11 et Lu/BCAM chez l'homme, la souris**

**A :** Forte affinité entre Fc-Lu humaine et la laminine 10/11, très faible avec la laminine 2, 4, 1

**B :** Forte affinité entre Fc-Lu Souris et la laminine 10/11, très faible avec la laminine 2, 4 et pas affinité avec la laminine 1.

**C :** Absence d'affinité entre Fc-MUC18 et la laminine 10/11

**D :** Détermination de l'affinité entre Fc-Lu et la laminine 10/11

(D'après Parsons et al. 2001)

Une autre expérience est réalisée en utilisant deux glycoprotéines, Lu et MUC18 exprimées

sous la forme de protéine de fusion Fc. La structure extracellulaire de MUC18 est analogue à Lu/BCAM (Campbell et al. 1994). Résultat, contrairement à la glycoprotéine Fc-Lu la région extracellulaire de la glycoprotéine Fc-MUC18 ne se lie pas à la laminine 10/11 (Figure 10C). Ces deux expériences montrent très clairement que la glycoprotéine Lu/BCAM à la fois chez l'homme et la souris sont des récepteurs membranaires spécifiques des laminines 10/11 (511/521).

La technique de Biacore a permis de déterminer la constante d'équilibre d'association entre le Lu/BCAM et la laminine 10/11 chez l'humain et la souris. Ces constantes d'association sont sensiblement les mêmes :  $K_d = 7,9 \pm 0,47\text{nM}$  (Figure 10D). Par contre, la constante est beaucoup plus faible entre le Fc-Lu humain et la laminine 10/11 de souris ( $K_d = 74,5 \pm 12,2\text{nM}$ ). Cela prouve qu'il y a une forte affinité entre Lu/BCAM et la laminine 10/11 au seins des espèces et non entre les espèces (Parsons et al. 2001).

#### **IV.2.4 ) LOCALISATION DU DOMAINE DE LIAISON AUX LAMININES 511/521 SUR Lu/BCAM**

Le site de liaison de Lu/BCAM sur les laminines 511 et 521 est localisé dans le domaine LG3 de la région globulaire LG1-5 de la chaîne  $\alpha 5$  de la laminine (Figure 9).

La cristallographie, la technologie SAXS (small-angle x-ray scattering / diffusion aux petits angles) ainsi que la mutagénèse dirigée ont permis d'élucider la structure dans laquelle se trouve le site de fixation de Lu/BCAM aux laminines 511/521, situé initialement dans les domaines D1D2D3 (Mankelov et al. 2007). Une fois la protéine Lu/BCAM purifiée, elle a été cristallisée. La modélisation donne avec une haute résolution les domaines D1 et D2 à laquelle les auteurs ont ajouté les données d'un modèle prédit pour le domaine D3 pour l'étude SAXS. L'interaction de Lu/BCAM avec la chaîne  $\alpha 5$  de la laminine est donc située dans une zone de résidus chargés négativement (acides aspartiques), à la base du domaine D2, et en haut du domaine D3. Une même analogie a été retrouvée dans l'interaction entre les domaines LG d'autres laminines avec l'héparine et l' $\alpha$ -dystroglycane. Plus précisément, le site de fixation se situe dans la jonction flexible reliant les domaines «Ig-like» D2 et D3 de Lu/BCAM. La mutagénèse dirigée a permis de spéculer que la charge négative de l'acide aspartique en position D312 (domaine D3), interagit avec une charge positive présente dans le domaine LG3 de la chaîne  $\alpha 5$ , et qu'il est déterminant pour l'interaction entre ces deux molécules. Les auteurs précisent que la flexibilité de cette jonction doit être critique pour maintenir une conformation ouverte de Lu/BCAM et permettre ainsi son interaction à la laminine (Burton et brady 2008).

## **IV.2.5 ) RÔLE DE L'INTERACTION Lu/BCAM ALPHA 5 SUR LES GLOBULES ROUGES HUMAINS ET PATHOLOGIES ASSOCIEES**

### **IV.2.5.1 ) La maladie de Vasquez**

La polyglobulie primitive de Vasquez (PV) est un syndrome myéloprolifératif, c'est à dire une production exagérée de globules rouges, blancs circulants et de plaquettes, en raison d'une prolifération clonale des précurseurs hématopoïétiques. Elle est quasi constamment associée à l'existence d'une mutation V617F du gène codant pour la protéine de transduction du signal JAK2. Cette mutation conduit notamment à l'activation continue de l'érythropoïèse (Kralovics et al. 2005).

Notre équipe a montré que les patients atteints de polyglobulie de Vasquez due à une mutation du gène JAK2, présentent un risque accru de thrombose. Les glycoprotéines Lu/BCAM sont surexprimées et constitutivement phosphorylées sur les globules rouges dans la maladie de Vasquez, ce qui entraîne un renforcement de l'adhérence à la chaîne  $\alpha 5$  à la lame basale endothéliale (Wautier et al. 2007).

### **IV.2.5.2 ) La drépanocytose**

La drépanocytose est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive due à une mutation unique affectant la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine S (HbS). En condition d'hypoxie HbS forme des fibres conférant une rigidité et un aspect en faucille aux GRs. L'anémie hémolytique et la vaso-occlusion sont les deux conséquences majeures de cette maladie. La drépanocytose est caractérisée par la récurrence de crises vaso-occlusives très douloureuses dues à l'obstruction des capillaires sanguins par les cellules circulantes, et l'adhérence anormale des GRs drépanocytaires à l'endothélium vasculaire. Des phénomènes d'agrégation entre GRs et globules blancs pourraient également contribuer à ce processus et précipiter la survenue de ces crises (Higgins et al. 2007).

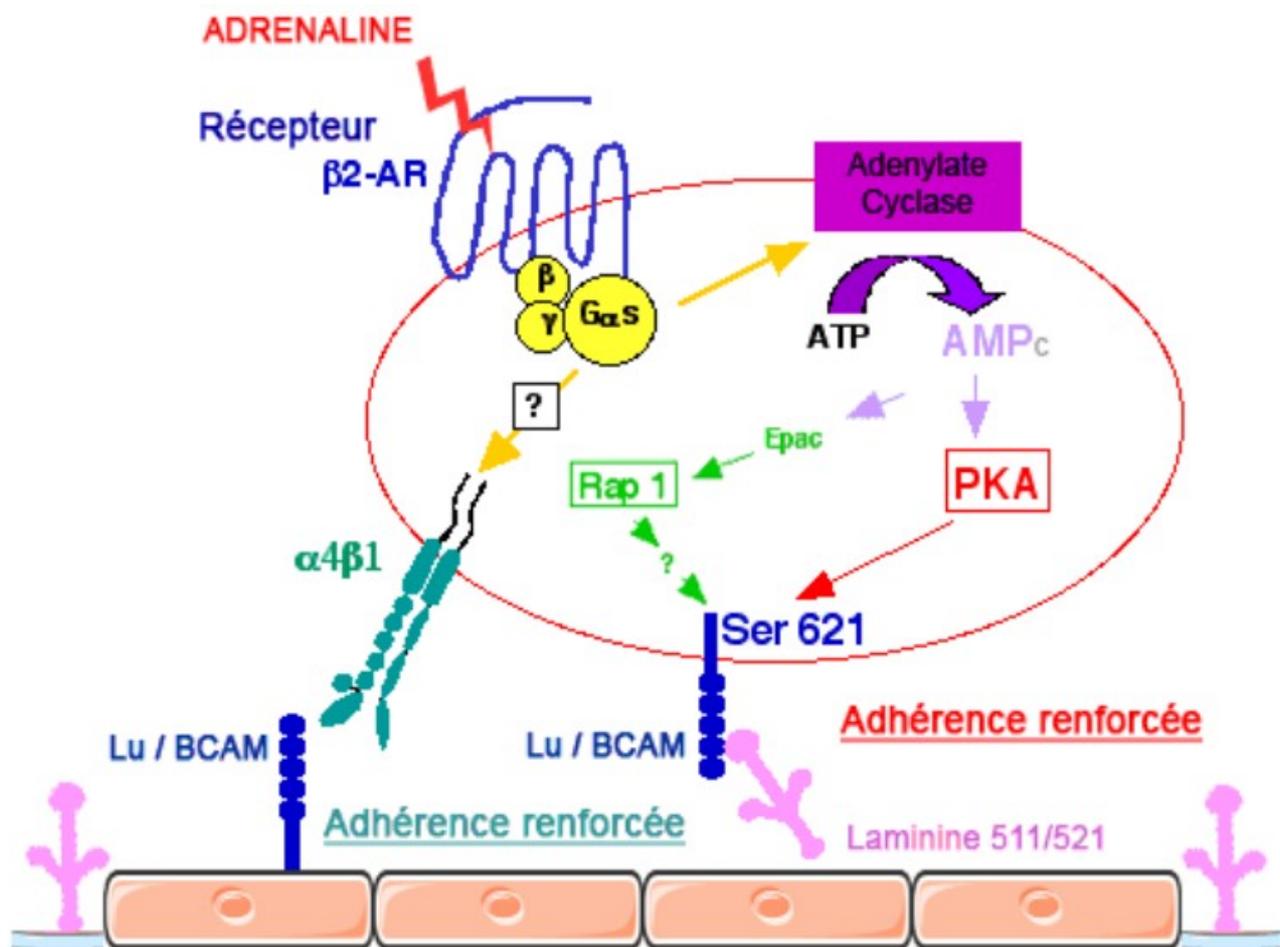
Les gps Lu/BCAM sont exprimées à la surface des globules rouges et des cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Lu/BCAM est un des protagonistes de la pathogénie drépanocytaire, en participant à l'adhérence renforcée des GRs drépanocytaires (GRs SS) à l'endothélium.

Deux types d'interactions ont été mis en évidence :

- L'interaction entre Lu/BCAM exprimée à la surface des cellules endothéliales (Parsons et al. 1995) et l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  réticulocytaire après activation sélective.  $\alpha 4\beta 1$  est l'unique intégrine exprimée à la surface des réticulocytes qui sont des GRs immatures. Ces GRs immatures sont retrouvés en proportion élevée chez les patients drépanocytaires suite à un phénomène récurrent

d'hémolyse. Le mécanisme d'activation de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  conduisant à l'adhérence renforcée des GRs SS à l'endothélium reste inconnu à ce jour (El Nemer et al. 2007).

● L'interaction entre Lu/BCAM présent sur les GRs SS avec la laminine 511/521 présente dans la matrice sub-endothéliale via une stimulation de Lu/BCAM par l'**adrénaline**. L'adrénaline est un médiateur de stress qui stimule le récepteur  $\beta 2$  adrénergique présent sur les GRs SS et active l'adénylate cyclase, ce qui provoque une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Il existe deux voies de stimulation possible. Soit l'AMPc active la PKA qui phosphoryle directement Lu/BCAM au niveau de la sérine S621 (Gauthier et al. 2005). Soit l'AMPc active Epac puis Rap1 (une petite GTPase) dont le processus aboutissant à la stimulation de Lu/BCAM reste inconnu actuellement (Murphy et al. 2005). Dans les deux cas, on aboutit à l'adhérence renforcée de Lu/BCAM à la laminine 511/521 (Figure 11).



**Figure 11 : Adhérence des GRs drépanocytaires à l'endothélium vasculaire sous stimulation adrénérgique**

(D'après Hines et al. 2003; Gauthier et al. 2005)

● Un troisième type d'interaction a été mise en évidence à partir du sang périphérique de patients drépanocytaires, l'interaction de Lu/BCAM et les globules blancs par l'intermédiaire de l'intégrine

$\alpha 4\beta 1$  (Chaar et al. 2010).

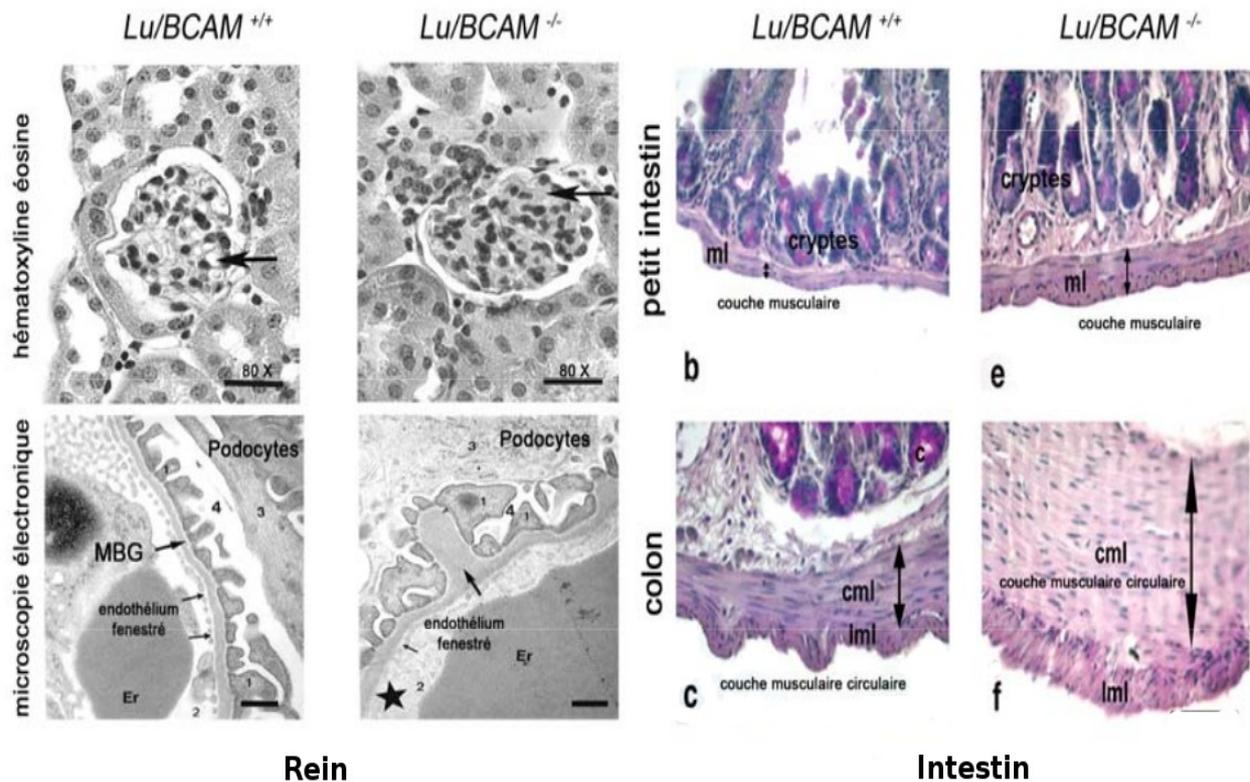
#### **IV.2.6 ) RÔLE DE L'INTERACTION Lu/BCAM ALPHA 5 DANS LES TISSUS NON ERYTHROÏDES CHEZ LA SOURIS**

Nous avons entrepris de caractériser la fonction de Lu/BCAM, en dehors du GR, dans les épithéliums et l'endothélium. En 2002 l'unité INSERM U665 en collaboration avec Institut Clinique de la Souris (ICS) de Strasbourg a généré un modèle murin n'exprimant plus Lu/BCAM. Les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles, mais présentent des anomalies des membranes basales dans le rein et l'intestin (Colin et al. 2008; Rahuel et al. 2008).

Dans l'intestin de souris adulte, l'expression de Lu/BCAM a été retrouvée principalement dans deux régions distinctes : sur les couches externes musculaires lisses à la base des cellules épithéliales, en contact avec la membrane basale, et au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> présentent un épaississement des couches musculaires de l'intestin, en particulier au niveau **les cellules musculaires lisses intestinales, qui expriment majoritairement la laminine 521** (Figure 12). L'analyse ultra-structurale par microscopie électronique révèle une grande désorganisation des myofilaments, de la membrane basale associée à une perte de contact entre les cellules musculaires. Les souris invalidées pour Lu/BCAM ont un transit tout à fait normal, ce qui atteste qu'il n'y pas de défaut de motricité intestinale impliqué dans la progression du bol alimentaire. L'absence de Lu/BCAM à la surface basale des cellules épithéliales de l'intestin qui est en contact principalement avec la laminine 511 ne compromet ni l'émergence des différents types cellulaires, de leur différenciation et ni leur fonctionnalité. Ces résultats montrent que Lu/BCAM est un récepteur majeur de la laminine 521, et non 511 dans les cellules de muscles lisses intestinales.

Dans le rein, près de 90% des glomérules Lu/BCAM<sup>-/-</sup> présentent une anomalie caractérisée par une importante réduction de lumière des capillaires. Des analyses en microscope électronique de la barrière de filtration glomérulaire révèlent un épaississement et un bourgeonnement de la lame basale glomérulaire du côté podocytaire en absence de Lu/BCAM (Figure 12). L'épaississement n'affecte pas la filtration glomérulaire, comme l'atteste l'absence de protéinurie lors de l'analyse d'urines des souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> en comparaison des Lu/BCAM<sup>+/+</sup>. L'expression de la chaîne  $\alpha 5$  laminine ne semble pas modifiée, mais elle présente un marquage plus diffus, moins organisé que dans les glomérules de souris sauvages, ce qui pourrait expliquer cet élargissement de la lame basale (Colin et al. 2008; Rahuel et al. 2008). L'invalidation de Lu/BCAM entraîne des altérations rénales beaucoup moins sévères que l'invalidation de son ligand, la chaîne  $\alpha 5$  laminine. Les

embryons *Lama5*<sup>-/-</sup> présentent en effet une dysmorphogénèse, voire une agénèse des reins, associée à une désagrégation de la lame basale (Miner et Li 2000). *Lu/BCAM* ne semble pas impliqué dans le développement rénal mais dans le maintien de l'intégrité de la membrane basale dans le rein et l'intestin (Colin et al. 2008; Rahuel et al. 2008).



**Figure 12 : Etude histologique du rein et de l'intestin chez les souris *Lu/BCAM*<sup>+/+</sup> et *Lu/BCAM*<sup>-/-</sup>**

**Rein** : la coloration à l'hématoxyline-éosine montre une réduction significative de lumière visibles des capillaires chez les souris *Lu/BCAM*<sup>-/-</sup>. La microscopie électronique du glomérule révèle un épaissement significatif de la membrane basale glomérulaire avec des protusions vers l'espace urinaire. Er : Erythrocyte

**Intestin** : le marquage à l'hématoxyline-éosine d'une coupe du petit intestin et du colon met en évidence un épaissement de la couche musculaire chez les souris *Lu/BCAM*<sup>-/-</sup> (Colin et al. 2008)

Cette même équipe a montré que **dans les glomérules, *Lu/BCAM* est localisé sur les cellules podocytaires et endothéliales, en contact avec la membrane basale glomérulaire qui exprime la laminine 521, mais pas dans la matrice mésangiale qui exprime la laminine 511.**

## V) LE GLOMERULE

Le glomérule est le siège de la filtration initiale du sang arrivant des artérioles afférentes. L'artériole afférente pénètre au pôle vasculaire du glomérule et se divise généralement en cinq branches principales qui, elles-mêmes, se divisent en réseaux capillaires autonomes en s'appuyant sur leur propre tissu mésangial. Les réseaux glomérulaires sont ensuite drainés par l'artériole efférente commune. L'ensemble est recouvert ou, plus exactement, intimement relié à la partie urinaire et plus précisément au feuillet interne de la capsule de Bowman (Figure 13A).

La filtration glomérulaire est l'ultrafiltration du sang à travers la paroi des capillaires glomérulaires, processus qui sépare l'eau plasmatique et ses constituants non protéiques, qui entrent dans l'espace urinaire, des cellules sanguines et des protéines, qui restent dans la lumière capillaire (Figure 13B).

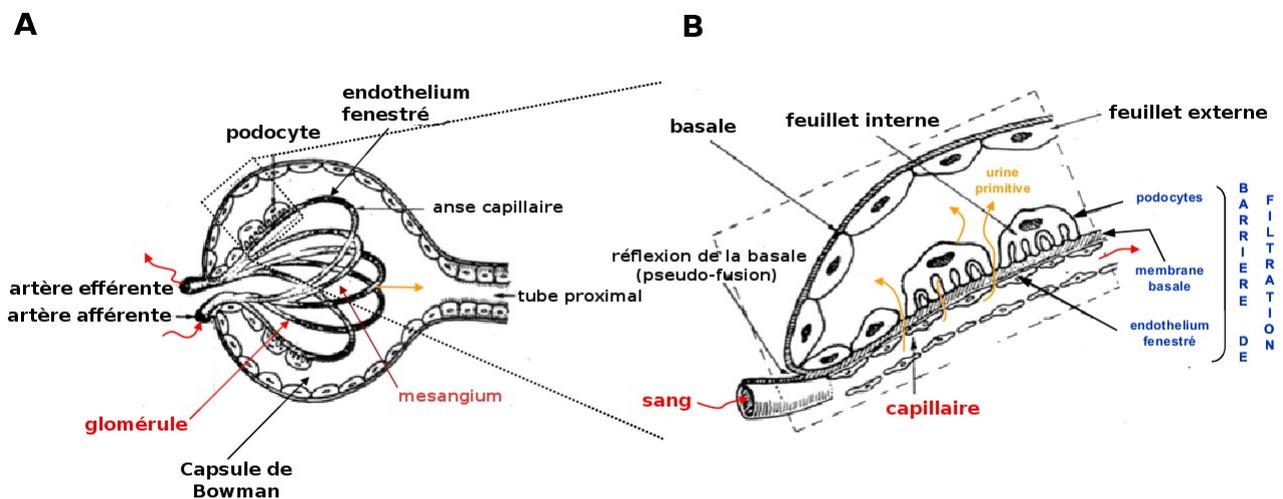


Figure 13 : Structure d'un corpuscule rénal A et de la membrane de filtration glomérulaire B (D'après : <http://www.u-picardie.fr/decouverte/sante/index.ph>)

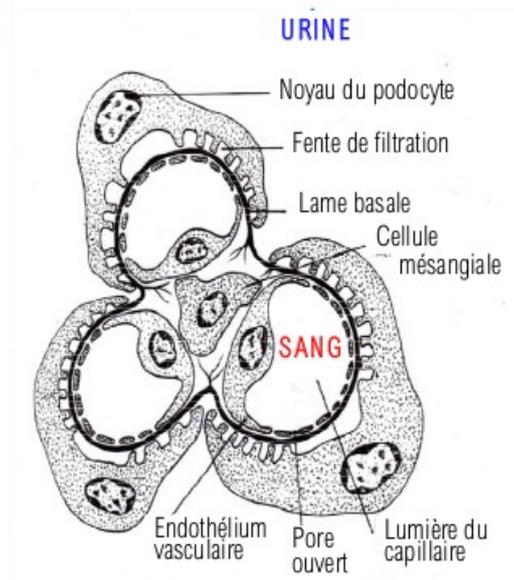
### V.1) LA BARRIÈRE DE FILTRATION GLOMERULAIRE : BARRIÈRE HEMATO-URINAIRE

Ce terme s'applique aux structures qui séparent le sang des capillaires glomérulaires et le liquide contenu dans l'espace de la chambre urinaire. Cette barrière (Figures 13B et 14) est une paroi complexe composée de trois filtres qui assure une filtration spécifique et sélective des molécules en fonction de leur taille et de leur charge:

- L'endothélium capillaire, mince et fenestré.
- La membrane basale glomérulaire (GBM), couche sécrétée par les cellules endothéliales et par les podocytes.

● La couche épithéliale du feuillet interne de la capsule de Bowman. Elle est constituée de cellules très particulières : les podocytes qui présentent de nombreuses ramifications en forme de pied qui recouvrent la membrane basale de manière discontinue, formant des fentes ou pores de filtration.

La membrane basale glomérulaire est constituée de trois couches denses de matériel extracellulaire (lamina densa, interna et rara) situées entre l'endothélium et l'épithélium. Elle contient du collagène type IV, protéoglycanes, laminine et fibronectine (El-Aouni et al. 2006). Les groupes sulfates portés par certaines de ces protéines confèrent une charge anionique à la membrane basale qui contribue à la perméabilité sélective dépendante de la charge des molécules, des microvaisseaux glomérulaires. La GBM empêche également le passage des plus grosses protéines. La barrière de filtration glomérulaire peut être considérée comme une membrane perforée par des pores et recouverte de charges négatives.



**Figure 14 : La jonction hémato-urinaire du corpuscule rénal**  
([homepage.mac.com/danielbalas/.../AppUrinaire\\_261108.pdf](http://homepage.mac.com/danielbalas/.../AppUrinaire_261108.pdf))

## V.2 ) LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES GLOMERULAIRES

Trois types cellulaires sont présents dans le glomérule.

### V.2.1 ) LES CELLULES ENDOTHELIALES

Les cellules endothéliales composent la paroi capillaire glomérulaire. Elles tapissent la lumière du capillaire et se trouvent à l'interface entre les compartiments sanguins et tissulaires (Savage 1994). La partie la plus épaisse de la cellule qui contient le noyau est souvent située à

proximité du mésangium (Figure 14). Ces cellules ont pour fonction de réguler le tonus vasomoteur (King et Brenner 1991), l'hémostase (Gross et Aird 2000) et le trafic des leucocytes (Takano et Brady 1995). Chez le rat, la région fenêtrée de l'endothélium glomérulaire représente environ 54% de la surface capillaire (Bulger et al. 1983).

L'endothélium glomérulaire est hautement perméable à l'eau et aux petits solutés en grande partie à cause de la forte densité en fenestration. L'entrée des macromolécules dans l'espace urinaire est limitée par la taille et la charge sélective de la paroi du capillaire glomérulaire (Chang et al. 1975). Ryan et son équipe ont montré que l'albumine ne traversait pas la couche endothéliale glomérulaire, à moins d'une interruption du flux sanguin. Cependant, l'excrétion des protéines dépasse rarement 2% de la charge potentiellement filtrée, même dans les situations de protéinurie massive, ce qui suggère que la plupart des protéines plasmatiques ne traversent jamais l'endothélium (Ryan et al. 1976).

L'endothélium glomérulaire et ses fenestrations sont recouverts d'un glycocalyx négativement chargé, composé de glycoprotéines et de protéoglycanes sulfatés (Avasthi et Koshy 1988) comme la podocalyxine (Horvat et al. 1986; Kershaw et al. 1995) ou les sialomucines CD34 endoglycanes (Sasseti et al. 2000) : cette couche anionique forme donc un obstacle aux passages des protéines également électro-négatives, comme l'albumine. Ce glycocalyx endothélial constitue la première barrière sélective empêchant le passage des protéines (Rostgaard et Qvortrup 2002).

### **V.2.2 ) LES PODOCYTES**

Il existe deux types de cellules épithéliales dans le glomérule : les cellules de l'épithélium pariétal (feuillet externe) de la capsule de Bowman et celles de l'épithélium viscéral (feuillet interne) appelées podocytes. Les podocytes (Figures 13B et 14), contrairement aux cellules mésangiales ou endothéliales, ne sont pas enfouis dans la membrane basale glomérulaire mais la recouvrent. Ce sont des cellules polarisées qui développent des ramifications en forme de pied attachées à la membrane basale du glomérule alors que le corps cellulaire flotte dans la capsule de Bowman. Ces ramifications recouvrent la membrane basale glomérulaire de manière discontinue, laissant entre elles des pores de filtration. Les podocytes sont impliqués dans différentes fonctions du glomérule. D'une part, ils constituent avec les cellules endothéliales la paroi du filtre glomérulaire et participent à la formation de la membrane basale glomérulaire et potentiellement à sa dégradation. D'autre part, ils jouent un rôle crucial dans la sélectivité dépendante de la taille des

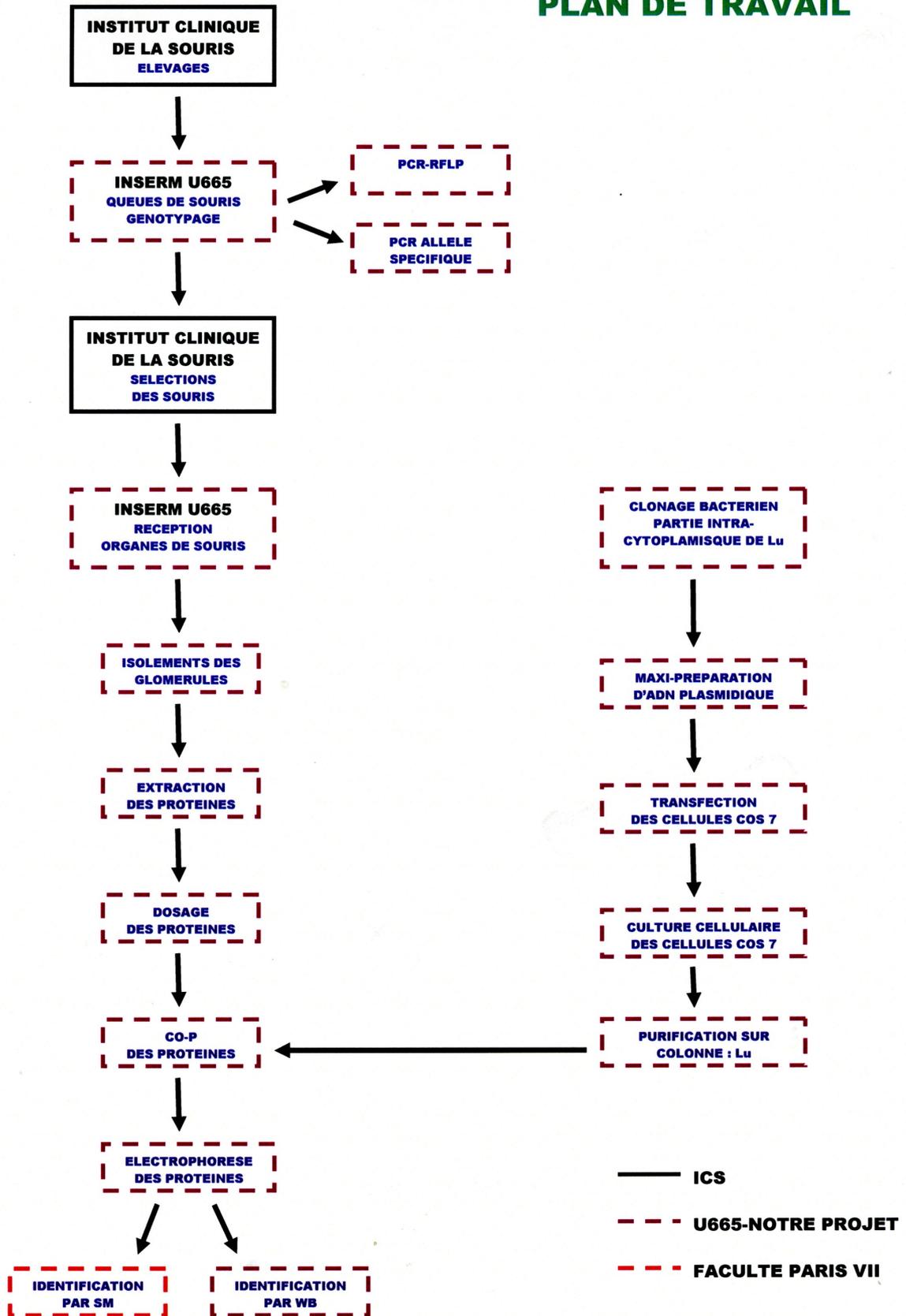
molécules (Mundel et Kriz 1995).

### **V.2.3 ) LES CELLULES MESANGIALES**

Les cellules mésangiales sont le troisième type cellulaire du glomérule. Elles représentent environ un tiers des cellules glomérulaires et sont situées entre les capillaires, occupant une position centrale dans le glomérule rénal (Figure 14). Elles sont dispersées au sein de la matrix mésangiale et émettent de nombreux prolongements cytoplasmiques. Les caractéristiques du noyau des cellules mésangiales permettent de les distinguer des autres cellules du corpuscule (noyau plus volumineux, hétérochromatine répartie en liseré à la périphérie du noyau). Pour une part, ces cellules sont dotées de propriétés contractiles car elles contiennent des filaments de myosine et portent des récepteurs à l'angiotensine II. On a d'ailleurs pu montrer que la contraction des filaments des cellules mésangiales était stimulée par l'angiotensine II.

## **MATERIELS ET METHODES**

# PLAN DE TRAVAIL



## ***1) GENOTYPAGE DES SOURIS DE LA LIGNEE K 99.6***

Le génotypage de souris utilise un polymorphisme de restriction entre la lignée 129/Ola KO (Knock-Out : mutant), et C57/B6 WT (Wild-Type : Sauvage). La taille du fragment PCR est de 581bp. Les amorces utilisées sont :

Sens : 5' ccacctcaagtgctcgtgtgtt 3'

Anti sens : 5' tgaggctattctgggctggctat 3'

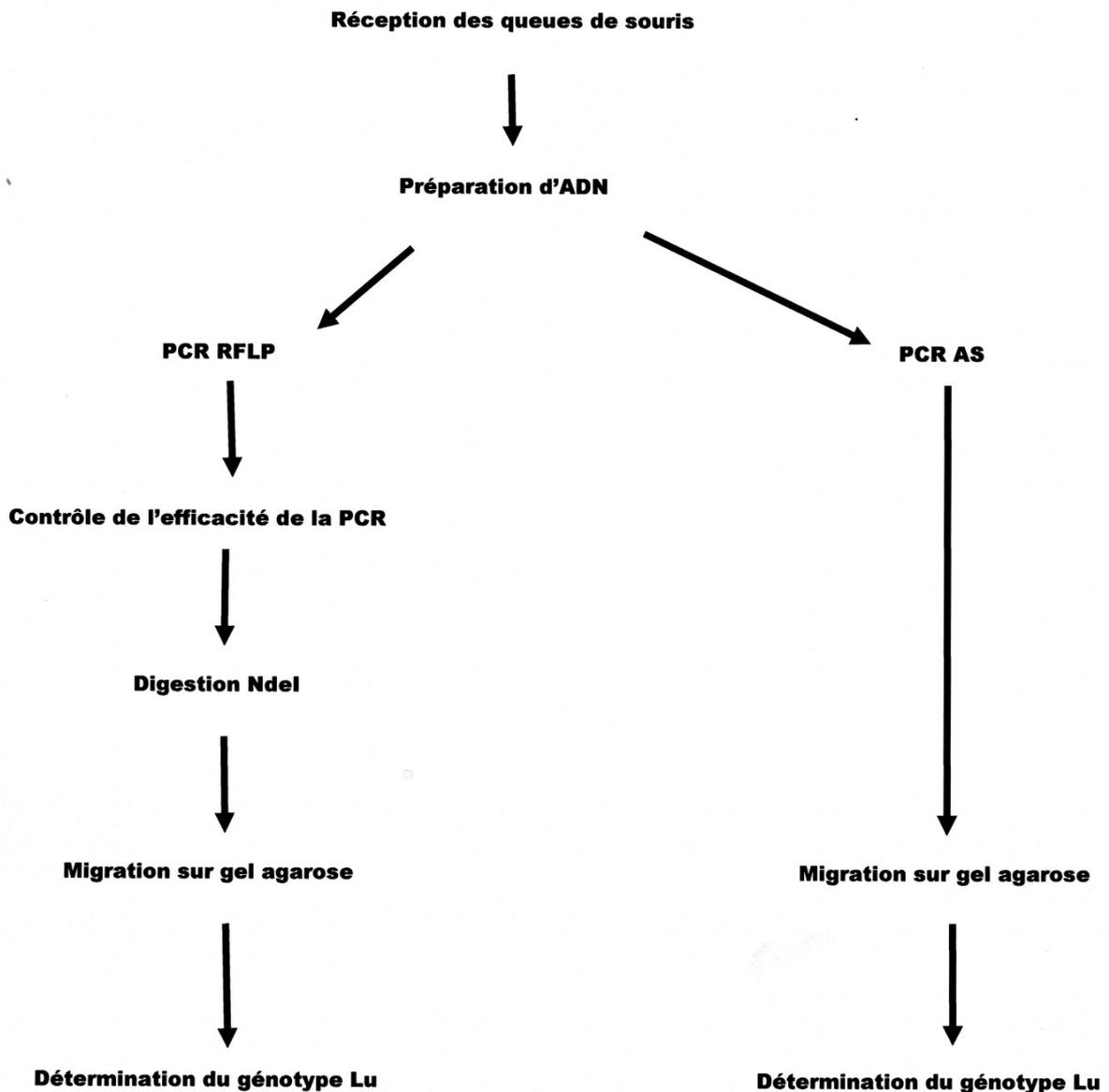
Après digestion NdeI de la PCR, on obtient 2 fragments comigrant de 275 et 300bp pour la présence des allèles sauvages (C57/B6), un fragment non digéré de 575bp pour la présence des allèles KO (129/Ola), et les trois fragments pour les hétérozygotes.

### ***1.1 ) Echantillons utilisés***

Nous recevons de l'Institut Clinique de la Souris (ICS) de Strasbourg des biopsies de queue de souris. Les échantillons sont répertoriés puis conservés à +4°C, avant d'extraire l'ADN.

#### ***1.1.1 ) Extraction d'ADN de queue de souris***

Ajouter à la biopsie 750µl de tampon d'extraction, 40µl de protéinase K (10mg/ml) et agiter au vortex. Incuber toute la nuit à 56°C. Agiter 5 minutes sur l'agitateur Eppendorf. Ajouter 250µl de NaCl saturé 6M et agiter 5 minutes à nouveau sur l'agitateur Eppendorf. Centrifuger à température ambiante à 15 000rpm pendant 10 minutes. Transférer 750µl de surnageant dans un tube Eppendorf contenant 500µl d'isopropanol. Eviter de transférer les lipides flottant en surface ou de toucher le culot de débris cellulaires. Agiter les tubes par renversement. Il y a apparition d'un précipité blanc d'ADN, formant un fil cotonneux dans chaque tube. Centrifuger à température ambiante à 15000rpm pendant 15 minutes. Ôter le surnageant par aspiration. Laver le culot avec 500µl d'éthanol à 70%. Centrifuger à nouveau à température ambiante à 15 000rpm pendant 15 minutes. Retirer tout le surnageant sans toucher le culot. Laisser les tubes retournés sur papier absorbant environ 10 minutes. Resuspendre le culot dans 150µl de tampon TE 1X pH=7,5. Vortexer et laisser 5 minutes bouchon ouvert à 65°C, puis 10 minutes bouchon fermé à 65°C pour resolubiliser l'ADN.



**Figure 16 : Génotypage des souris de la lignée K 99.6**

#### **I.1.1.1) PCR-RFLP**

Première technique : Amplification par réaction en chaîne par polymérase - Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Figure 16).

#### **Condition de la PCR-RFLP**

ADN de queue de souris	1 $\mu$ l
Tampon Tap Pol 10X	5 $\mu$ l



### ***Digestion NdeI***

PCR	12µl
Tampon NdeI	1.5µl
Enzyme NdeI	<u>1.5µl</u>
V <sub>T</sub>	15µl

Bain marie : 1h à 37°C

### ***Electrophorèse sur gel d'agarose 2%***

Même technique.

Détermination du génotype luthéran

### **I.1.1.2 ) PCR Allèle Spécifique**

Deuxième technique ([Figure 16](#)) :

	<b>WT</b>	<b>KO</b>
	<b>PCR AS 1</b>	<b>PCR AS 2</b>
ADN de queue de souris	1µl	1µl
Tampon Tap Pol 10X	5µl	5µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5µl	1.5µl
dNTP 2mM	5µl	5µl
Amorce spécifique WT 50X8035 10p/µl	1µl	/
Amorce spécifique KO 50X8073 10p/µl	/	1µl
Amorce anti-sens 50X8036 10p/µl	1µl	1µl
Taq pol	0.5µl	0.5µl
Eau distillée (QSP 50µl)	35µl	35µl

### ***Electrophorèse sur gel d'agarose 2%***

Même technique. Puis détermination du génotype Lu/BCAM

## II ) PROTEINES GLOMERULAIRES

L'ensemble des étapes de la manipulation (Figure 17)

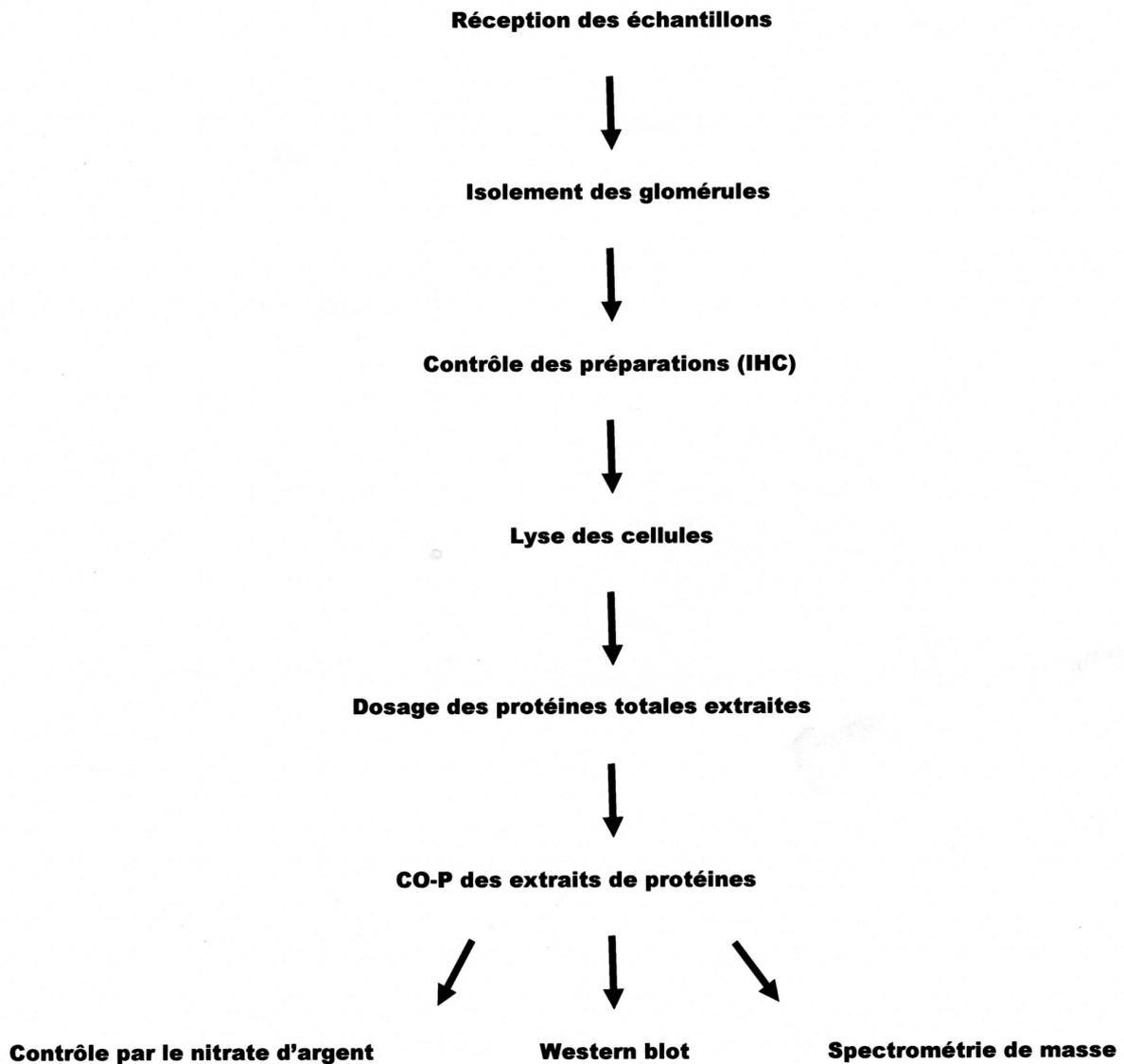


Figure 17 : Préparation des échantillons et co-précipitation avec l'appât Fc-Lu à partir des extraits protéiques de la lignée K 99.6 WT et KO

### II.1 ) Echantillons utilisés

Nous recevons une série d'échantillons de reins de souris (perfusés par des billes Dynbeads 450 - magnétiques) de l'ICS de Strasbourg. Les échantillons arrivent au laboratoire en carboglace (-80°C) et sont conservés à -80°C.

### **II.1.1 ) Isolements des glomérules**

*Principe* : Des billes Dynbeads 450 magnétiques, de diamètre permettant leur circulation dans les capillaires (dont les capillaires glomérulaires), sont injectées en perfusion intracardiaque aux souris. Les glomérules sont ainsi isolés en utilisant un aimant.

Toute la manipulation s'effectue à +4°C (sauf l'étape sur roue), pour inhiber l'activité des protéases. Les six reins sont découpés avec un scalpel, puis écrasés entre 2 feuilles de parafilm avec un pilon. Transférer le broyat dans un tube falcon de 15ml. Ajouter 2ml de solution HBSS 1X par paire de reins. Puis 33µl de collagénase 60X et 20µl de DNase 100X. Mettre sur roue à 37°C pendant 30 minutes. Mettre le tube falcon dans la glace et ajouter 40µl inhibiteur de protéase (IP) 50X, vortexer. Passer le broyat digéré sur un tamis cellulaire de 100µm. Rincer le tamis avec 2ml HBSS + IP 1X. Refiltrer sur un nouveau tamis et rincer avec 2ml HBSS + IP 1X. Centrifuger à +4°C, 1000 rpm pendant 5 minutes. Oter le surnageant et récupérer le culot en rajoutant 1ml HBSS + IP 1X, vortexer. Mettre la suspension en contact avec un aimant et ôter le surnageant. Faire 3 fois le lavage (Takemoto et al. 2002). Resuspendre dans 1ml de tampon RIPA base + IP 1X. Faire 2 lames cytospin (20 à 30µl de suspension de glomérules et 170 à 180µl en tampon RIPA base 1X). Régler l'appareil cytospin à 1 000rpm pendant 3 minutes. Laisser les lames séchées à température ambiante. Conserver les lames à -80°C au moins 24 heures avant le marquage en Immuno-Histo-Fluorescence (IHF). La suspension des glomérules est conservée aussi à -80°C pour l'extraction des protéines glomérulaires.

### **II.1.2 ) Coloration Immuno-Histo-Fluorescence des glomérules : contrôle du phénotype Lu**

Le marquage des glomérules isolés en IHF permet de détecter la présence de Lu/BCAM, grâce à l'anticorps luthéran spécifique couplé à un anticorps secondaire lié à un Alexa fluor 488 (fluorescente verte) qu'on peut facilement visualiser au microscope confocal. On utilise le même principe pour l'antigène β1 laminine : Alexa fluor 568 (fluorescence rouge).

Laisser sécher la lame 5 minutes à température ambiante, entourer le dépôt de glomérules avec le pap pen. Réhydrater avec du PBS 1X 5 à 15 minutes à température ambiante. Incuber avec 30µl de PBS-BSA 1% - sérum 10% pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante. Puis éliminer le surplus sans rincer, ajouter 30µl du premier anticorps (Lu/BCAM et β1 laminine) dilué dans du PBS-BSA 1% et laisser 1 heure à température ambiante en chambre humide. Faire 2 lavages de 5 minutes dans du PBS-triton 0.1% et un lavage 5 minutes dans du PBS. Incuber avec le

deuxième anti-anticorps en PBS-BSA 1% 45 à 60 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Refaire les 3 lavages et laisser sécher la lame. Mettre une goutte de prolong gold sur une lamelle et la déposer sur les glomérules, laisser polymériser toute la nuit dans l'obscurité à température ambiante. La fluorescence est observée sur microscope confocal ZEISS LSM 510 META, équipé d'un objectif X60 à immersion.

### **II.1.3 ) Extraction des protéines dans les glomérules**

Récupérer la suspension de glomérules à -80°C, et la mettre à +4°C dans de la glace. Rajouter du NP40 0.5% en tampon RIPA base 1X et IP 1X. Broyer à l'aide d'un mini-pilon pendant au moins 10 minutes. Mettre sur roue à +4°C pendant 30 minutes. Centrifuger à 1 5000 rpm pendant 5 minutes à +4°C. Prendre le surnageant sans les billes Dynbeads. Aliquoter 10µl pour doser les protéines glomérulaires et conserver le reste à -80°C.

### **II.1.4 ) Dosage des protéines glomérulaires**

On utilise la micro-méthode de PIERCE BCA. L'acide bicinchonique (BCA) réagit avec les complexes formés entre  $\text{Cu}^{2+}$  et les protéines de façon très similaire à la réaction du biuret. En formant de tels complexes, il prend une couleur pourpre typique. C'est une méthode sensible et rapide qui accepte des détergents comme le Triton ou le dodécylsulfate de sodium (SDS).

Préparer une gamme de protéines standard de concentration connue à partir d'une solution stock de 2 mg/ml SAB (Bovine Sérum Albumine). Mesurer l'absorbance pour chaque échantillon à 562 nm ([Tableau 2](#)).

**Tableau 2 : Gamme d'étalonnage**

	<b>Blanc</b>		<b>T 100µg/ml</b>		<b>T 200µg/ml</b>		<b>T 400µg/ml</b>		<b>T 600µg/ml</b>		<b>Echantillon</b>	
Vol. albumine SDS 1X µl			10	10	10	10	10	10	10	10		
Vol. eau Δ µl QSP (6.7µl)	6.7	6.7										
Vol. SDS 3X µl	3.3	3.3									3.3	3.3
Vol. échantillon µl											X	X
Vol. réactif (A+B) µl	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>1H à 37°C dans l'obscurité</b>												
<b>DO</b>												
<b>[C]µg/ml</b>												

### II.1.5 ) Co-précipitation des protéines

Cette technique permet d'entraîner les protéines présentes dans l'extrait glomérulaire, qui interagissent avec la protéine recombinante Lu/BCAM (appât), et permet ainsi la détection d'éventuels partenaires par co-précipitation (Figure 18).

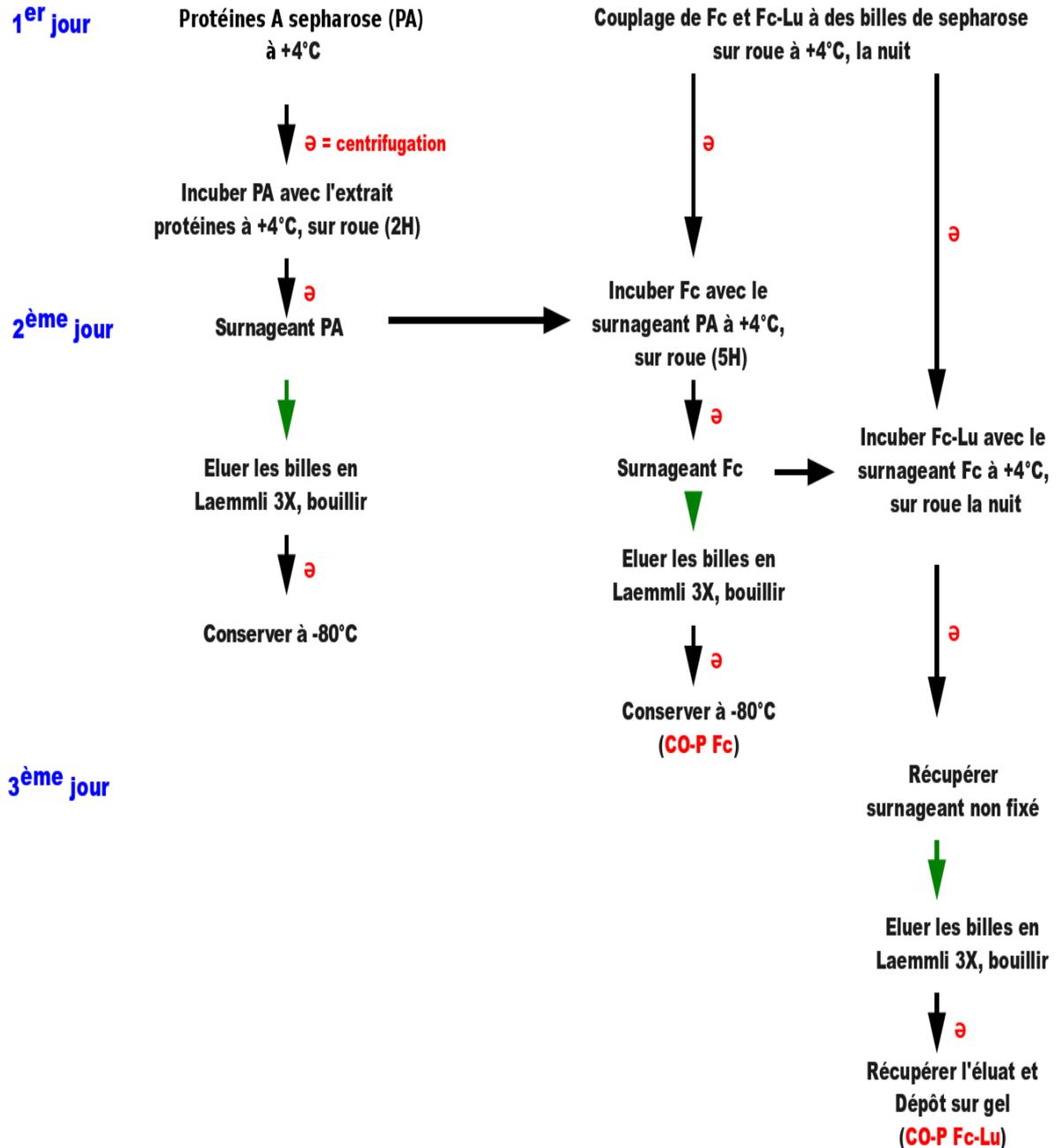


Figure 18 : Co-précipitation de protéines avec l'appât Fc-Lu à partir des échantillons de la lignée K 99.6 WT et KO

## 1<sup>er</sup> Jour

Préparer 3 tubes Eppendorf avec 50µl de billes couplée à la protéines A sepharose en culot

Centrifuger à 1 800rpm les 3 tubes à +4°C, pendant 5 minutes

Ôter le surnageant

3 lavages avec 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X), centrifuger à 1 800rpm +4°C, pendant 5 minutes

● Protéine A sepharose (PA ou témoin de bruit de fond) : 50µl de billes protéines A sepharose + 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X), conserver à +4°C toute la nuit

● PA-Fc : 50µl de billes protéines A sepharose + 5µg fragments IgG1 Fc + qsp 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X)

● PA-Fc-Lu : 50µl de billes protéines A sepharose + 5µg fragments IgG1 Fc-Lu + qsp 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X)

Mettre les PA-Fc et PA-Fc-Lu sur roue à +4°C toute la nuit

## 2<sup>ème</sup> Jour

● Centrifuger PA à 1 800rpm, +4°C, 5 minutes, ôter le surnageant

Rajouter 50 à 200µg d'extrait protéines avec Xµl IP 1X + qsp 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X)

Laisser le tube PA **2h** sur roue à +4°C

● Préparer le tube Eppendorf PA-Fc à l'avance (30 minutes)

Centrifuger à 1 800rpm, +4°C, 5 minutes; ôter le surnageant

3 lavages avec 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X)

Centrifuger à 1 800rpm +4°C, 5 minutes

● Centrifuger le tube Eppendorf PA à 15 000rpm, +4°C, 3 minutes

Transférer le surnageant du tube PA dans le tube PA-Fc

Laisser le tube PA-Fc **5h** sur roue à +4°C

● Elution de PA : 3 lavages avec 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X)

Centrifuger à 1 800rpm +4°C, 5 minutes

1 lavage avec 500µl RIPA base 1X, centrifuger à 1 800rpm +4°C, 5 minutes

1 lavage avec 500µl RIPA base 1X, centrifuger à 5 000rpm +4°C, 5 minutes

Ramener les billes à sec avec un embout long fin, ajouter 30µl leammli 3X

Bouillir 2 à 3 minutes, centrifuger à 15 000rpm, 20°C, 3 minutes

Récupérer 20µl de surnageant et transférer dans un tube contenant 40µl eau distillée

Conserver à -80°C

● Préparer le tube Eppendorf PA-Fc-Lu à l'avance (30 minutes)

Centrifuger à 1 800rpm, +4°C, 5 minutes

Ôter le surnageant

3 lavages avec 500µl (RIPA base, NP40 0.5%, IP 1X)

Centrifuger à 1 800rpm +4°C, 5 minutes

● Centrifuger le tube Eppendorf PA-Fc à 15 000rpm, +4°C, 3 minutes

Transférer le surnageant dans le tube PA-Fc-Lu

Laisser toute la nuit sur roue à +4°C

● Elution de PA-Fc : même technique que PA= Témoin bruit de fond PA

### **3<sup>ème</sup> Jour**

● Centrifuger le tube Eppendorf PA-Fc-Lu à 1 800rpm, +4°C, 5 minutes

Récupérer le surnageant et le mettre à +4°C

● Elution de PA-Fc-Lu : même technique que PA

Dépôt sur gel gradient Tris-Acétate SDS de 3 à 8% (**II.1.8**)

#### **II.1.6 ) Electrophorèse des protéines**

On utilise un gel gradient déjà prêt du commerce : Tris-Acétate SDS de 3 à 8% d'acrylamide.

Tampon Tris-Acétate SDS 1X

T = 150V constant, I = 50mA, Durée ~1h

Révélatifs : bleu de Coomassie (~1µg) et AgNO<sub>3</sub> (~10ng) pour nos contrôles; bleu colloïdal

(~100ng) pour la spectrométrie de masse (SM), et/ou Immuno blot (western blot)

### **II.1.7 ) Spectrométrie de masse**

L'analyse au SM est réalisée à la faculté Paris VII. La SM est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse.

### **II.1.8 ) Western Blot**

#### ***L'électrophorèse***

Gel Tris-Acétate SDS de 3 à 8% d'acrylamide.

Tampon de migration Tris-Acétate SDS 1X, mode non réduit et réduit ( $\beta$ -mercaptoéthanol :  $\beta$ ME ou dithiothréitol : DTT, porter à ébullition), T = 150V constant, I = 50mA, Durée ~1h

#### ***Le transfert***

Membrane de nitrocellulose, Tampon de transfert Tris-Glycine 1X

- Conditions non réduites : T = 30V (maxi) constant, I = 400mA, Durée = 2h
- Conditions réduites : T = 30V (maxi) constant, I = 200mA, Durée = 2h
- Révélation : Coloration au rouge ponceau

Puis Immunoblot :

Saturer la membrane nitrocellulose dans 10ml de tampon TBS 1X + 5% régilait, 30 minutes à 37°C. Mettre le premier anticorps dilué dans 10ml de tampon TBS 1X + 5% régilait pendant 1h à 37°C sous agitation. Laver 3 fois dans 10ml tampon TBS 1X + 0.5% tween 20 à 37°C pendant 10 minutes. Resaturer dans 10ml tampon TBS 1X + 5% régilait, 5 minutes à 37°C. Ajouter le deuxième anticorps couplé à la peroxydase dans 10ml tampon TBS 1X + 5% régilait, 1h à 37°C. Laver 2 fois dans 10ml tampon TBS 1X + 0.5% tween 20, 10 minutes à 37°C. Rincer 3 fois dans 10ml tampon TBS 1X, 10 minutes à 37°C. Incuber la membrane 1 minute dans le réactif ECL (10ml des 2 réactifs : volume à volume). Révélation par chimioluminescence.

## **III ) PREPARATION D'UN NOUVEL «APPÂT» Lu/BCAM PAR CLONAGE**

Ce clonage bactérien consiste à insérer un fragment ADNc (partie intra-cytoplasmique de Lu/BCAM) dans un vecteur contenant déjà la partie extracellulaire de Lu/BCAM, et

transformer des bactéries avec ce vecteur. Une fois inséré dans la bactérie, le plasmide se réplique en même temps que la bactérie. On obtient ainsi un grand nombre de copies, utilisable pour séquencer la construction en contrôle, puis pour produire la glycoprotéine Lu/BCAM ensuite par transfection de cellules de mammifère (Figure 19).



Figure 19 : Préparation d'un l'appât Fc-Lu/BCAM par clonage

### III.1 ) Préparation de la matrice

Obtention du fragment ADNc partie intra-cytoplasmique de Lu/BCAM par PCR

A partir d'une culture bactérienne, préparer plasmide Lu murin (Lum) complet Neo à 0.16µg/µl, un aliquote de 5µg.

● Précipiter l'ADN Lum dans l'éthanol :

Solution ADN Lum : 30µl (1vol)

Solution d'acétate de Na 3M pH5.2 : 3µl (0,1 vol)

Solution d'éthanol 100% (-20°C) : 75µl (2,5 vol)

Mélanger au vortex, laisser ~10 minutes à -80°C

● Dissoudre l'ADN Lum :

Centrifuger 15 000rpm, +4°C, 30 minutes

Allumer le thermostat à 65°C

Éliminer délicatement le surnageant

Ajouter 200µl d'éthanol 70% (-20°C) pour laver le culot

Centrifuger 15 000rpm, +4°C, 30 minutes

Rejeter le surnageant dans un tube Eppendorf délicatement

Laisser sécher 5 minutes tube renversé sur une compresse

Rajouter dans 10µl TE 1X, tapoter pour mélanger

Laisser 2 à 3minutes bouchon ouvert à 65°C

Laisser 10 minutes bouchon fermé à 65°C

Laisser à **température ambiante** pendant au moins **30 minutes**

Mettre à +4°C (ADN matrice à 5µg/10µl)

### III.1.1 ) PCR de l'insert (partie intra-cytoplasmique)

Tableau 3 : Préparation 10ng, 20ng, 50ng quantité d'ADN matrice

	A	B	C	Δ
Quantité ADN matrice (ng)	10	20	50	/
Solution ADN matrice 5μg/10μl diluée au 1/100 (μl)	2	4	10	
Tampon «10X Pfu Ultra Buffer» (μl)	5	5	5	5
Oligo sens «9359» 25pmoles, solution à 100pmol/μl stock au 1/4 (μl)	1	1	1	1
Oligo anti-sens «9364» 25pmoles, solution à 100pmol/μl stock au 1/4 (μl)	1	1	1	1
dNTP 2,5mM (μl)	5	5	5	5
Enzyme Pfu polymérase (μl)	1	1	1	1
Δ qsp 50μl	35	33	27	37

L'enzyme Pfu polymérase n'introduit pas d'erreur en recopiant la matrice, mais elle a un faible rendement.

#### Programmation de la machine PCR

95°C 5 min

3 cycles      96°C 1 min  
                  54°C 1 min  
                  72°C 1 min

3 cycles      96°C 1 min  
                  63°C 1 min  
                  72°C 1 min

30 cycles     96°C 1 min  
                  72°C 1 min 30

1 cycle        72°C 7 min

+4°C

Contrôler la PCR en déposant des aliquots sur gel acrylamide d'agarose 2% (I.I.I.I), précipiter, redissoudre dans 10μl TE 1X un des échantillons (l'échantillon III.I). Garder le reste à -20°C en éthanol.

### **III.2 ) Préparation de l'insert (partie intracytoplasmique de Lu), des plasmides contenant la partie extracellulaire non mutée (N<sub>3</sub>C) et mutante (DA) pour la ligation**

#### **III.2.1 ) Préparation de l'insert**

Digestion de l'insert par l'enzyme Esp3I pendant 9h

ADN	10µl
DTT 20mM	2µl
Tampon «buffer Tango» 10X	4µl
Enzyme «Esp 3I»	3 X 1µl (tous les 3H)
Eau distillée qsp 40µl	24µl

Bain marie 37°C pendant 9h

Arrêt de la digestion en mettant l'échantillon, 20 minutes à 65°C.

● Précipiter dans l'éthanol 100% en mélangeant :

1vol de Solution ADN digérée : 40µl

0,1 vol de Solution d'acétate de Na 3M pH5.2 : 4µl

3 vol de Solution d'éthanol 100% (-20°C): 120µl

Mélanger au vortex, conservation à -20°C pour la suite

#### **III.2.2 ) Préparation des vecteurs N<sub>3</sub>C et DA**

On dispose du pig plus signal Lum N<sub>3</sub>C à 2,7µg/µl et du pig plus signal Lum DA à 2µg/µl.

Prendre des aliquots 5µg pig plus signal par vecteur.

	<b>N<sub>3</sub>C</b>	<b>DA</b>
ADN 5µg	1.9µl	2.5µl
DTT 20mM	5µl	5µl
Tampon «buffer Tango» 10X	10µl	10µl
Enzyme «Esp3I»	3 X 1µl	3 X 1µl
Eau distillée qsp 100µl	83.1µl	82.5µl
Bain marie 37°C pendant 9h		

Arrêt de la digestion en mettant l'échantillon, 20 minutes à 65°C.

Contrôle des digestions des vecteurs sur gel d'agarose 0.8% pour une quantité de 100ng (**I.1.1.1**). Puis précipiter à l'éthanol 100% les 2 vecteurs (2,5 vol d'éthanol 100% : **III.2.1**) et conserver à -20°C.

### **III.2.3 ) Déphosphorylation des vecteurs N<sub>3</sub>C et DA**

● Dissoudre les 2 vecteurs N<sub>3</sub>C et DA :

Allumer le thermostat à 65°C

Centrifuger 15 000rpm, +4°C, 15 minutes

Eliminer délicatement le surnageant

Ajouter 500µl d'éthanol 70% (-20°C)

Centrifuger 15 000rpm, +4°C, 15 minutes

Eliminer délicatement le surnageant

Laisser sécher 5 minutes tube renversé sur une compresse

Rajouter dans 20µl TE 1X, tapoter pour mélanger

Laisser 5 minutes bouchon ouvert à 65°C

Laisser 10 minutes bouchon fermé à 65°C

Laisser à **température ambiante** pendant au moins **1h**, pour avoir une resolubilisation totale (vecteurs de haut poids moléculaire).

● Déphosphorylation des vecteurs :

Pour une quantité de 2,5µg d'ADN

Vecteur N <sub>3</sub> C ou DA	20µl
Tampon «fast AP» 10X	3µl
Enzyme «fast AP»	1µl
Eau distillée qsp 30µl	6µl

Mélanger, puis activer 10 minutes à 37°C, arrêter 5 minutes à 75°C.

### **Purification des vecteurs N<sub>3</sub>C et DA**

● Electrophorèse :

Dépôt des produits de phosphorylation sur gel d'agarose 0.8% en TAE

Utiliser du tampon TAE neuf et une cuve de migration

Echantillon : 30µl ADN + 5µl bleu charge ADN 6X

Marqueur : 5µl de Smart Ladder Eurogentec

Migration : 1h à T = 50V puis T = 100V pour 2h environ

Contrôle sous lampe UV rapidement pour vérifier la migration d'ADN

● Elution-KIT : QIAEX II pour extraction d'ADN de gel d'agarose

Découper la bande d'ADN à l'aide d'un scalpel

Peser, répartir, distribuer 250mg de gel par tube

Prendre les conditions pour une taille de fragment ADN attendu environ 8kb donc dans les conditions «ADN fragment» 4kb»

Soit 3 vol de tampon QX1 + 2 vol eau stérile c'est-à-dire 750µl QX1 et 500µl eau stérile

Vortexer 30 secondes

Ajouter 10µl de QIAEX II (billes), vortexer

Incuber pendant 10 minutes à 50°C, en agitant au vortex toutes les 2 minutes

Le mélange doit avoir une couleur jaune (pH correct)

Centrifuger 1 minute à 25°C à 13 000rpm

Ôter le surnageant, puis rajouter 500µl de tampon QX1, vortexer

Centrifuger 1 minute à 25°C à 13 000rpm

2 lavages successifs avec 500µl de tampon PE

Centrifuger 1 minute à 25°C à 13 000rpm

Ôter les surnageants, laisser le tube sécher renversé 10 à 15 minutes

Les billes doivent être transparentes ou translucides, mais pas blanches (trop séchées)

Ajouter 20µl de TrisCl 10mM pH8.5, bien vortexer

Incuber 5 minutes à 50°C (fragments ADN 4-10kb)

Centrifuger 1 minute à 25°C à 13 000rpm

Récupérer 18µl de surnageant (regrouper les surnageants de N<sub>3</sub>C dans un même tube)

Mettre dans la glace

● Contrôle quantité d'ADN :

Dépôt sur gel d'agarose 0.8% TAE

Tampon TAE 1X

Migration : T = 100V, I = 55mA, durée 40 minutes

Estimation de la quantité ADN du vecteur (pour l'étape de ligation) en le comparant au marqueur.

### **III.2.4 ) La ligation**

● Redissoudre l'insert digéré, purifié dans 10µl TE 1X (**III-1**)

● Ligation :

Prévoir une quantité de 100ng de vecteurs pour 5 à 10ng d'insert (mole/mole)

Mettre le tampon ligase à 37°C pendant 5 minutes (précipite à température ambiante)

Mettre le vecteur à 65°C pendant 5 minutes (déroule le vecteur)

Vecteur N <sub>3</sub> C ou vecteur DA (100ng)	1µl
Insert (11,5 à 22,5ng)	2µl
Tampon ligase 10X	2µl
Enzyme T4 ADN ligase	1µl
Eau distillée qsp 20µl	14µl

Incubation 10 minutes à température ambiante, puis inactivation 10 minutes à 65°C.

Précipiter à l'éthanol 100% (**III.2.2**), permet aussi d'éliminer le tampon toxique pour les bactéries électro-compétentes

Laisser à -20°C pendant au moins **1h**

● Test de **bruit fond** des 2 vecteurs (vecteurs refermés vides sans insert) :

Même protocole que précédemment, mais prévoir une quantité de 50ng de vecteurs

Vecteur N <sub>3</sub> C ou vecteur DA (50ng)	0,5µl
Tampon ligase 10X	2µl
Enzyme T4 ADN ligase	1µl
Eau distillée qsp 20µl	16,5µl

Incubation 10 minutes à température ambiante

Inactivation 10 minutes à 65°C

Précipiter à l'éthanol 100% (**III.2.2**)

Laisser à -20°C pendant au moins **1h**

### **III.2.5 ) La transformation**

● Redissoudre les vecteurs avec et sans insert :

Allumer le thermostat à 65°C

Centrifuger 15 000rpm, +4°C, **30 minutes**

Eliminer délicatement le surnageant

Ajouter 500µl d'éthanol 70% (-20°C)

Centrifuger 15 000rpm, +4°C, **30 minutes**

Eliminer délicatement le surnageant

Laisser sécher 5 minutes tube renversé sur une compresse

Rajouter dans 3µl TE 1X, tapoter pour mélanger

Laisser 5 minutes bouchon ouvert à 65°C

Laisser 5 minutes bouchon fermé à 65°C

Le **volume final** maximal attendu : **1µl**

Laisser à **température ambiante** pendant au moins **1h**

● Transformation :

Mettre le milieu CG (Circle Grow) à 37°C

Mettre les cuves d'électroporation «EUROGENTEC» pour bactéries dans la glace

Récupérer les bactéries compétentes DH5α\_E -80°C pour +4°C

Dans un tube Eppendorf : 1µl vecteurs + 40µl bactéries compétentes à +4°C, mélanger

Ramener rapidement le reste des bactéries compétentes DH5α\_E à -80°C

Régler l'appareil d'électroporation à 1 700V

Transférer les 41µl de bactéries au fond de la cuve à l'aide d'un embout long fin

Essuyer la cuve avec du «sopalin» (pour éviter tout arc électrique) -l'humidité

Mettre la cuve dans l'appareil d'électroporation, faire 2 fois «Pulse Push»

Rajouter tout de suite 1 ml de solution Soc dans la cuve

Noter la Constante de Temps

Transférer toute la suspension de la cuve dans un tube flacon plastique de 15ml

Laisser **1h** à 37°C sous agitation

Prélever 200µl de suspension et étaler sur une boîte de pétri contenant du milieu CG à l'aide de billes

Centrifuger le reste de la suspension à 1 800rpm, 20°C, 3 minutes

Jeter le 2/3 de surnageant (qui doit-être limpide)

Resuspendre le culot par des aspirations/rejets

Déposer la suspension sur une deuxième boîte de pétri, puis étaler, incuber la nuit à 37°C

## **IV ) CONTROLE DU CLONAGE BACTERIEN**

### **IV.1 ) Extraction de plasmides**

● Mise en culture :

Dans un falcon de 50ml, ajouter 30ml de milieu CG + 30µl ampicilline 1000X, mélanger

Répartir 2ml de milieu CG par tube

Introduire une colonie bactérienne isolée de petite taille à l'aide d'un cure-dent

Incuber la nuit à 37°C sous agitation permanente

● Mini-préparation d'ADN plasmidique (Figure 20) :

KIT «WIZARD Plus Mini-préparation DNA purification system»

Allumer l'incubateur à 70°C

Chauffer l'eau distillée à 70°C (taille plasmide attendu  $\geq 10\text{kb}$ )

Transférer les cultures dans un tube Eppendorf de 2ml - stérilement

Laisser un fond de culture dans le tube mère avec le cure-dent

Centrifuger à 15 000rpm, 20°C, 3 minutes

Ôter le surnageant

Resuspendre avec 200µl de solution resuspension cellulaire, vortexer

Ajouter 200µl de solution lyse cellulaire, agiter par retournement 4 fois

Ajouter 200µl de solution de neutralisation

Centrifuger à 15 000rpm, 20°C, 5 minutes, puis récupérer 600µl de surnageant

Installer le boîtier d'aspiration sur une pompe à vide

Fixer une colonne et une seringue dessus

Mettre dans la seringue 1 ml de résine

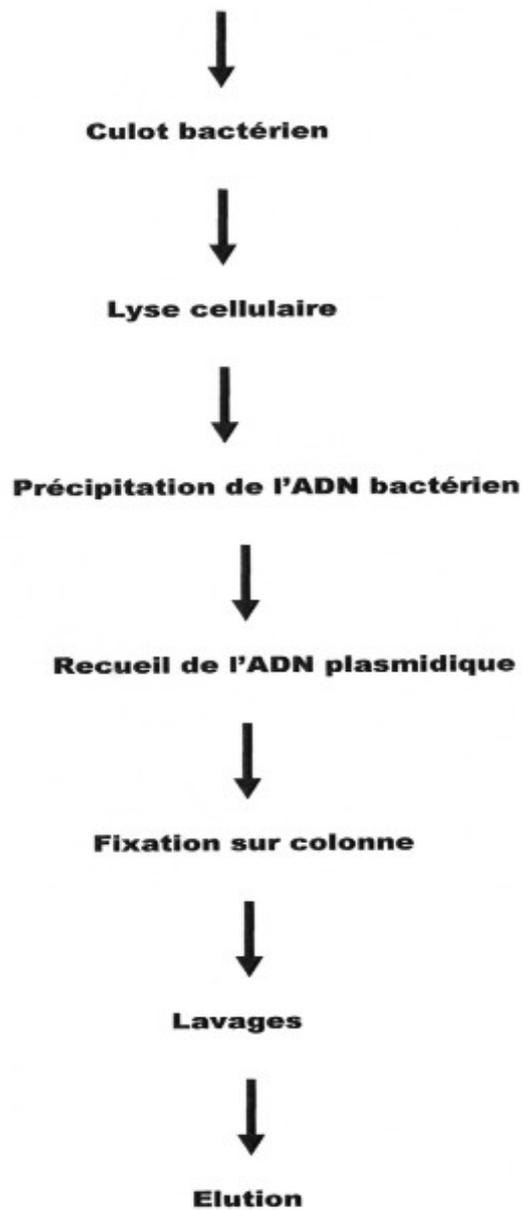
Déposer les 600µl de surnageant

Faire couler la colonne

Ajouter 2ml de solution de lavage de colonne

Faire couler la colonne  
Transférer la colonne dans un tube Eppendorf  
Centrifuger à 10 000rpm, 20°C, 1 minute pour séchage  
Transférer la colonne dans un tube Eppendorf neuf  
Ajouter 50µl eau distillée à 70°C  
Centrifuger à 10 000rpm, 20°C, 2 minutes  
Récupérer l'élution et conserver à +4°C ou à -20°C

**Préparation des plasmides**



**Figure 20 : Mini-préparation de plasmides**

#### ● Quantité d'ADN obtenu

Préparer 100µl de l'échantillon dilué au 1/10 dans du TE 1X

Déterminer la quantité d'ADN obtenu par spectrophotométrie à 260nm

### IV.2 ) Contrôle de la mini-préparation d'ADN : vecteur + insert

#### ● Digestion des plasmides par l'enzyme Esp 3I :

Plasmides (100 à 500ng d'ADN)	4µl
DTT 20mM	0.5µl
Tampon «buffer Tango» 10X	1µl
Enzyme «Esp 3I»	1µl
Eau distillée qsp 10µl	3.5µl
Bain marie 1h à 37°C	

#### ● Contrôle de la taille : vecteur + insert :

Cela permet de confirmer qu'on a les vecteurs à la taille attendue et en quantité, grâce au marqueur.

Dépôt sur gel d'agarose 2% TEB :

Echantillons : 10µl ADN plasmide + 4µl de bleu charge d'ADN

Marqueur : 5µl Smart Ladder Eurogentec

Migration : T = 100V, durée : 45 min

L'électrophorèse permet de repérer les échantillons qui possèdent un insert d'une taille proche de 200bp (**taille attendue 180bp**). Tous les échantillons qui possèdent l'insert sont dosés au spectrophotomètre (absorbance 280nm). Une quantité de 30µg de plasmides est envoyée à la société GATC en Allemagne pour être séquencé. Le séquençage de l'ADN d'un plasmide correspond à la détermination de la séquence nucléotidique du plasmide. A la réception des résultats, on contrôle la séquence obtenue par rapport à la séquence consensus de l'ADNc luthéran. Les clones portant la séquence d'intérêt, correctement sous-clonée, sont sélectionnés, congelés et ré-étalés sur boîte de culture bactérienne pour faire une maxi-préparation d'ADN plasmidique.

## **V ) MAXI-PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE**

### ● Mise en culture (IV.1)

Transférer le tube de 2ml de culture dans 200ml de milieu CG, 200µl de ampicilline 1 000X

Incuber à 37°C sous agitation toute la nuit

### ● Conservation des souches

Dans un cryotube de 2ml, ajouter 500µl de glycérol à 30% et 500µl du milieu de culture

Mélanger et conserver à -80°C

### ● Maxi-préparation : «QIA filter plamisd maxi KIT 25»

Répartir les 200ml de culture dans 4 falcons 50ml

Centrifuger à 5 000rpm, 20°C, 15 minutes

Ôter le surnageant

Ajouter 10ml de «tampon P1» conservé à +4°C, agiter puis vortexer

Ajouter «10ml tampon P2» (lyse cellulaire) et agiter par retournement 4 à 6 fois (surtout ne pas vortexer)

Ajouter «10ml tampon P3» (neutralisation cellulaire) et agiter par retournement 4 à 6 fois (surtout ne pas vortexer)

Transférer dans une seringue et laisser reposer 10 minutes à température ambiante

Préparer la colonne avec son support

Equilibrer la colonne avec 10ml de «tampon QBT» en laissant couler par gravité

Au bout de 10 minutes, déposer le lysat sur la colonne

Laisser couler par gravité

Laver la colonne avec 30 ml de «tampon QC», en laissant couler par gravité

Ajouter 30 ml de «tampon QC» à nouveau

Transférer la colonne dans un tube falcon 50ml neuf

Eluer la colonne avec 15ml de «tampon QF»

Laisser couler par gravité et récupérer l'éluat

Ajouter 0.7 volume d'isopropanol soit 10,5ml et bien mélanger

Centrifuger à 5 000rpm, 20°C, 45 minutes

Ôter le surnageant en le transférant dans un autre tube falcon 50ml vide

Laver le culot en ajoutant environ 5ml d'éthanol à 70°C (-20°C)

Ôter le surnageant (éthanol versé) en le transférant dans un autre tube falcon 50ml vide stérile  
Essuyer le falcon contenant le culot de plasmide au fond avec du papier absorbant sans toucher le culot

Laisser le falcon avec le culot renversé environ 5 minutes

Préparer un tube Eppendorf de 1,5ml

Ajouter 150µl de TE 1X au fond du tube, directement sur le culot

Mélanger par des aspirations/rejets

Transférer dans le tube Eppendorf de 1,5ml

Rincer le tube falcon avec 50µl de TE 1X

Transférer dans le tube Eppendorf de 1,5ml

Laisser le tube Eppendorf sur la paillasse à température ambiante au moins **1h**

Conserver à +4°C

#### ● Quantité d'ADN obtenu

Préparer 100µl de l'échantillon dilué au 1/100 dans du TE 1X

Déterminer la quantité d'ADN obtenu par le spectrophotomètre à 260nm

#### ● Contrôle de la taille : vecteur + insert

(voir IV.2)

## **VI ) LA CULTURE CELLULAIRE**

La culture cellulaire c'est la transfection des cellules COS 7 avec le plasmide permettant la production de la protéine recombinante Lu/BCAM de souris ([Figure 21](#)).

#### ● Préparation du milieu de culture :

Préparer 500ml de milieu culture de DMEM

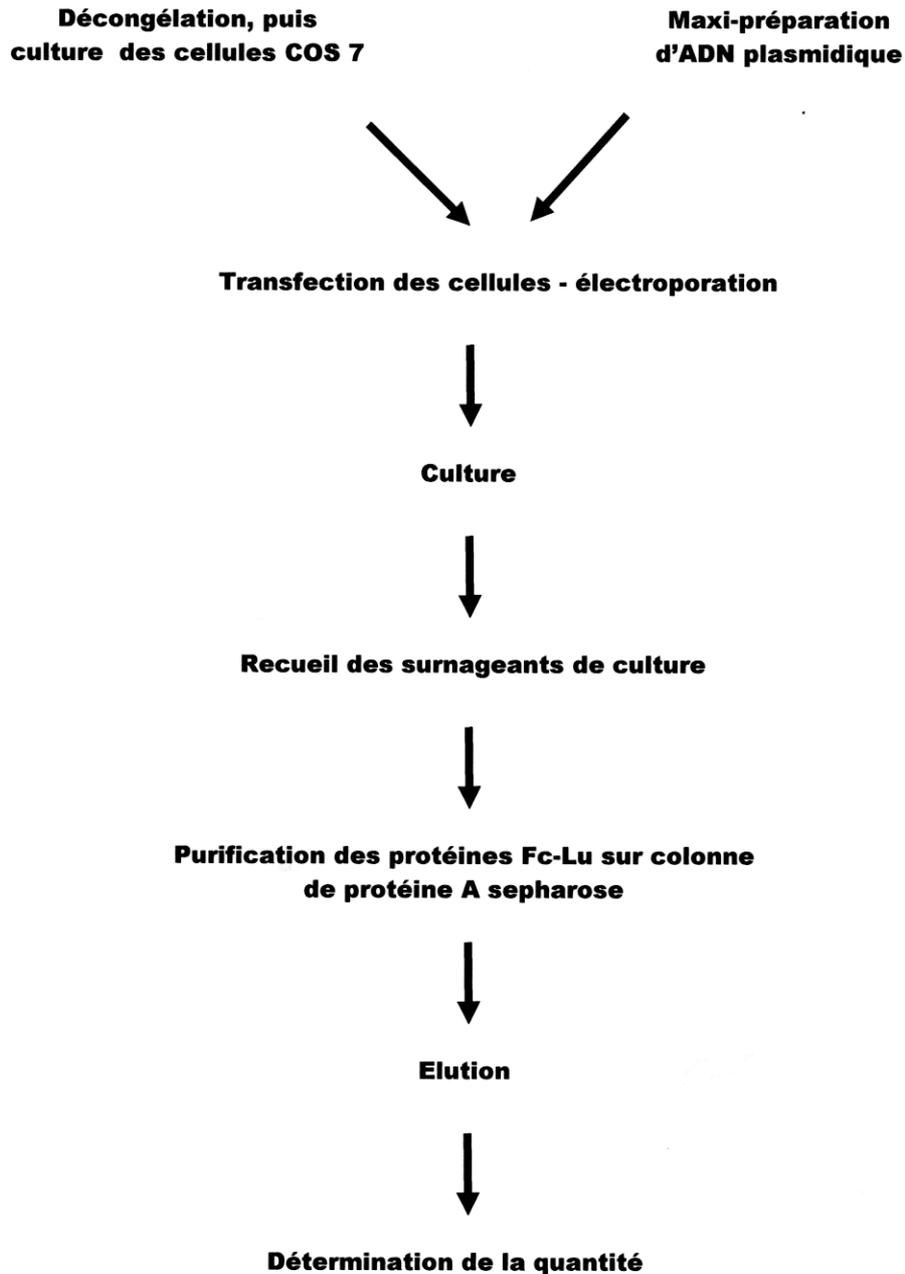
Ôter 50ml dans le flacon de 500ml de milieu DMEM

Ajouter 50ml de sérum veau fœtal (10%final)

Ajouter 5ml antibiotiques et antifongiques 100X

Ajouter 10ml de NaCO<sub>3</sub> à 7.5 %

Mélanger par retournement et mettre à 37°C



**Figure 21 : Préparation de protéines Lu recombinantes**

● Mise en culture des cellules COS 7 :

Prendre une ampoule de cellules COS 7 dans l'azote liquide

Vérifier l'absence de l'azote liquide au niveau du bouchon sous hotte

Décongeler l'ampoule dans le bain marie à 37°C

Vaporiser de l'alcool sur le tube, puis essuyer

Transférer le contenu du tube dans 50ml de milieu DMEM

Centrifuger à 1 500rpm, 20°C, 5 minutes; ôter le surnageant  
Resuspendre le culot avec 900µl de milieu DMEM  
Transférer dans le flacon de culture cellulaire  
Rincer à nouveau avec 900µl de milieu DMEM  
Ajouter 20ml de milieu DMEM dans un flacon de 75cm<sup>2</sup> de culture cellulaire  
Mettre la culture cellulaire à l'étuve à 37°C sous CO<sub>2</sub> à 5 % pendant 2 jours. Puis les cellules en culture sont entretenues tous les 2 ou 3 jours, et amplifiées.

● Production d'une grande quantité de cellules COS 7 : 250 10<sup>6</sup> cellules au total :

Mettre au bain marie à 37°C les milieux : culture cellulaire, Versene, Trypsine EDTA (30min)  
Mettre le flacon de culture en position debout sous la hotte  
Ôter le surnageant de culture  
Ajouter 10ml de PBS 1X (rinçage des cellules)  
Étaler sur les cellules, puis ôter le surnageant  
Ajouter 5ml Versene, puis étaler et mettre à l'étuve à 37°C pendant 10 minutes maximum  
Contrôler la forme des cellules au microscope  
Ôter le Versene  
Ajouter 5ml de Trypsine EDTA (décollement des cellules)  
Mettre à l'étuve à 37°C pendant 15 minutes maximum  
Tapoter sur la boîte cellulaire pour bien décoller et isoler les cellules COS 7  
Ajouter 17ml de milieu de culture (3 fois au moins le volume de Trypsine EDTA pour la neutraliser)  
Homogénéiser les cellules COS 7  
Compter les cellules COS 7 en déposant 20µl sur la cellule de Malassez  
Nombre de cellules COS 7 à remettre en culture : 5 à 10 10<sup>6</sup> cellules/grande boîte  
Mettre dans un flacon de 125cm<sup>2</sup> de culture cellulaire le volume correspondant 5 à 10 10<sup>6</sup> cellules et compléter avec un volume maximum de 50ml de culture cellulaire.  
Mettre le flacon à l'étuve à 37°C sous CO<sub>2</sub> à 5 % pendant 2 à 3 jours  
Multiplier les cellules jusqu'à obtenir 250 10<sup>6</sup> cellules au total

● Transfection des cellules COS 7 avec l'ADN des clones N<sub>3</sub>C et DA :

Rassembler toutes les cellules COS 7 dans un même flacon (voir ci-dessus)

Dénombrer les cellules COS 7 sur la cellule Malassez  
Transférer les cellules dans des falcons de 50ml  
Centrifuger à 1 500rpm, 20°C, 10 minutes; ôter le surnageant  
Faire 2 rinçages avec 900ml de PBS 1X  
Centrifuger à 1 500rpm, 20°C, 10 minutes

Pendant les rinçages faire les manipulations suivantes :

- 1) Régler l'appareil d'électroporation : choc électrique à 960  $\mu$ Farads avec T = 200V
- 2) Pour chaque cuve d'électroporation prévoir :  
10  $10^6$  cellules COS 7 par point de transfection  
10 $\mu$ g d'ADN de plasmides
- 3) Préparer les flacons de culture cellulaire et répartir dans les cuves d'électroporation les quantités d'ADN plasmidique adéquates dans un volume final de 10 $\mu$ l PBS/Hepes

Ôter le surnageant des cellules COS 7 et les reprendre pour avoir un volume de 150 $\mu$ l en PBS/Hepes par transfection. Ajouter le volume déterminé de PBS/Hepes au culot de cellules, bien mélanger

Ajouter 150 $\mu$ l de cellules COS 7 en PBS/Hepes dans chaque cuve d'électroporation

Laisser en contact 10 minutes avec l'ADN plasmidique

Faire le choc électrique (noter les Constantes de Temps)

Laisser reposer 10 minutes

Transférer le contenu de 2 cuves dans 50ml de milieu de culture

Laisser 5 à 6 jours à 37°C à l'étuve avec 5% CO<sub>2</sub>, puis recueillir les surnageants de culture

## **VII ) LA PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES Lu/BCAM**

● Préparation des surnageants (Figure 20) :

Récupérer les surnageants des clones N<sub>3</sub>C et DA dans 2 béchers différents

Vérifier le pH de chaque surnageant (pH~8.2)

Si le pH est trop basique rajouter du tampon Tris 2M pH7.5

Filtrer chaque surnageant à l'aide de «Filter-system» sous vide

Noter les volumes de filtrat des clones N<sub>3</sub>C et DA

Ajouter 1/3 de volume de tampon de fixation (permet la fixation de Lu sur les billes A sepharose) dans chaque filtrat

#### ● Préparation des mini-colonnes :

Laisser les tremper au moins 1H30 dans un peu de solution SDS 20X diluée dans l'eau distillée

Tester l'écoulement des mini-colonnes à l'aide d'eau distillée

Installer les mini-colonnes sur un portoir

Fermer les colonnes avec une pince

Verser 1,5ml de billes A sepharose et laisser tasser la mini-colonne

Ajouter environ 5ml de tampon de fixation pour bien équilibrer les billes en tampon

Transférer les mini-colonnes en chambre froide +4°C

#### ● Purification des protéines recombinantes :

Brancher les mini-colonnes sur les pompes péristaltiques

Activer les pompes (vitesse et sens d'aspiration)

Passer 3 fois les filtrats dans les mini-colonnes

Rincer les mini-colonnes avec du PBS 1X pendant 10 minutes maximum

Eluer rapidement avec du tampon d'élution (pH acide)

Récupérer les éluats dans des tubes Eppendorf (5 gouttes/tube)

Ajouter dans chaque tube 20µl de Tris 2M pH8.1 (pH acide ramener à pH neutre), mélanger

#### ● Détermination des quantités et de la pureté des protéines recombinantes :

On mesure la DO à 280nm de chaque éluat (N<sub>3</sub>C dilué au 1/4 et DA pure;  $\epsilon = 1.109$ )

## VII.1 ) Western Blot

### L'électrophorèse

Préparer un gel acrylamide 8%

Déposer sur le gel 50ng de chaque éluat de protéines recombinantes purifiées, préparés en

tampon réducteur ou non

Migration en tampon Tris glycine SDS (TGS) 1X

T = 200V constant, I = 20mA, Durée ~2h

### **Le transfert**

Récupérer les gels de l'électrophorèse

Membrane de nitrocellulose , Tampon de transfert Tris-Glycine 1X

Conditions non réduites :

T = 30V (maxi) constant

I = 400mA

Durée = 2h

Révélation : Coloration au rouge ponceau

Conditions réduites :

T = 30V (maxi) constant

I = 200mA

Durée = 2h

Puis Immunoblot

Conditions non réduites : Ac 602 au 1/3 000 et Ac L 54 au 1/15 000 sont spécifiques de Lu/BCAM; conditions réduites : Ac 602

**NB : La plupart des réactifs utilisés pour les western blots sont achetés déjà prêts ou très concentrés dans le commerce.**

## RESULTATS

### 1) LE GENOTYPAGE DES SOURIS PAR PCR-RFLP OU PCR ALLELE SPECIFIQUE

Le génotypage de souris utilise un polymorphisme de restriction entre la lignée 129/Ola **KO (Knock-Out : mutant)**, et C57/B6 **WT (Wild-Type : sauvage)**. La taille du fragment PCR est de 581pb. Après digestion NdeI de la PCR, on obtient deux fragments **comigrant** de 275pb et 300pb pour la présence des allèles WT (C57/B6), un fragment non digéré de 575pb pour la présence des allèles KO (129/Ola), et les trois fragments pour les **hétérozygotes (H)**.

Cette technique est effectuée avec quatre témoins pour valider le résultat obtenu. Le témoin eau distillée est négatif, cela prouve qu'il n'y a pas eu d'amplification non spécifique au cours de la PCR. Le témoin positif hétérozygote valide les résultats positifs hétérozygotes obtenus, en vérifiant qu'il n'y pas eu de digestion partielle par l'enzyme NdeI. Même chose pour les témoins positifs WT et KO.

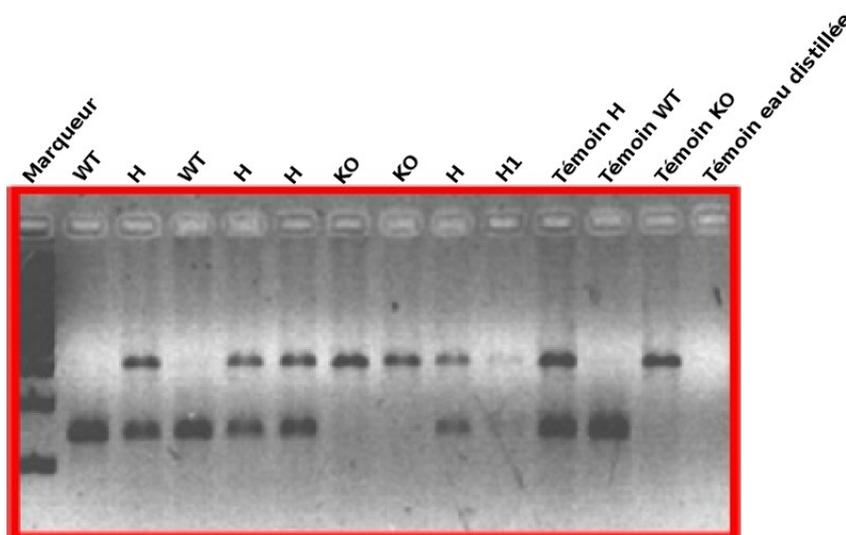


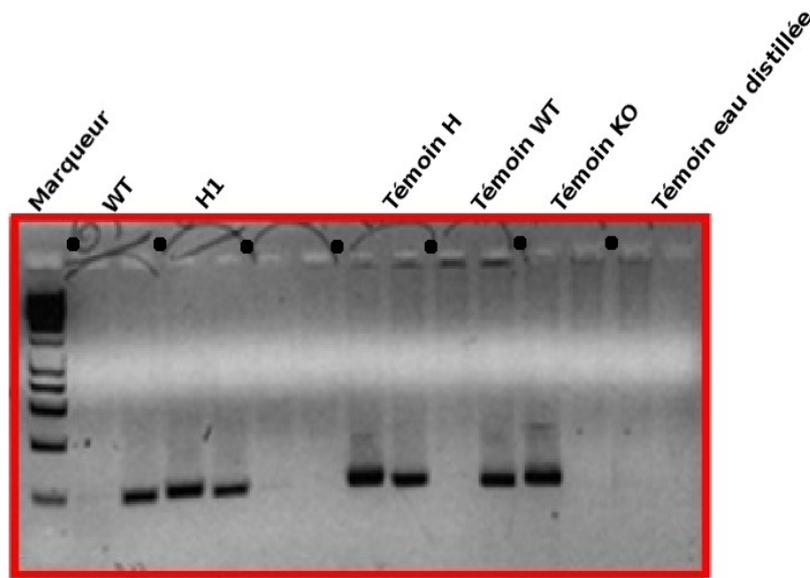
Figure 22 : Génotypage des souris par PCR-RFLP

Tous les échantillons de souris sont correctement génotypés sauf l'échantillon H1 où il y a trop peu d'ADN déposé.

Les résultats douteux obtenus sont à confirmer éventuellement par une deuxième

technique : PCR Allèle Spécifique, comme par exemple l'échantillon H1. La PCR Allèle Spécifique permet aussi de détecter des polymorphismes génétiques. L'interprétation des résultats se fait en lisant les 2 PCRs côte à côte :

- Amplification dans les 2 PCRs : échantillon hétérozygote
- Amplification que dans la PCR WT : échantillon WT
- Amplification que dans la PCR KO : échantillon KO



**Figure 23 : La PCR Allèle Spécifique**

Le résultat obtenu confirme que l'échantillon H1 est une souris hétérozygote.

Les souris sélectionnées sont les souris sauvages (WT) et mutantes (KO) pour la suite du projet. Notre sélection est transmise à l'ICS de Strasbourg. Les souris adultes sont perfusées à l'aide de billes Dynbeads 450 magnétique ([Matériels et méthodes Page 51](#)). Les reins des souris nous parviennent en carboglace.

## **II ) ISOLEMENTS ET COLORATION PAR IMMUNO-HISTO-FLUORESCENCE DES GLOMERULES**

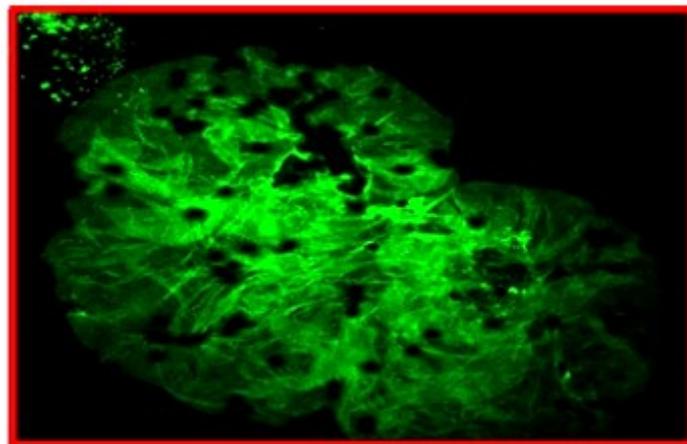
Pour obtenir des rendements suffisants, l'isolement des glomérules s'effectue à partir de six reins de souris. Les reins des souris WT et KO sont manipulés séparément. Les reins sont broyés à l'aide d'un pilon, puis transférés dans un tube falcon avec de la collagénase et

de la DNase à 37°C. Ensuite les glomérules sont filtrés sur un tamis avec une solution de HBSS contenant des inhibiteurs de protéase (IP). Les glomérules sont récupérés à l'aide d'un aimant. Un aliquote est gardé à -80°C pour le dosage des protéines.

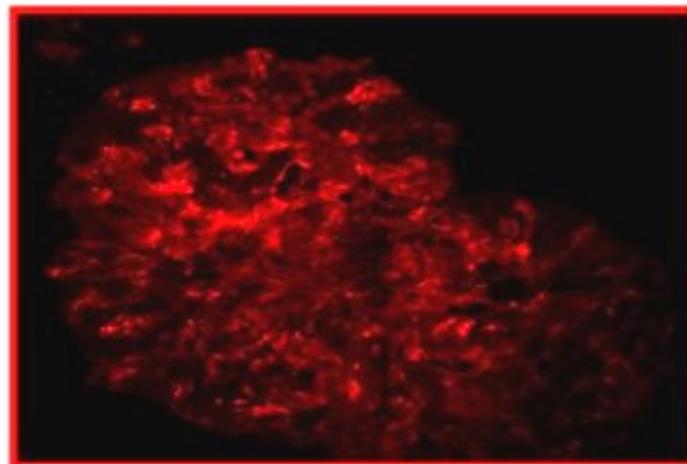
Chaque préparation de glomérules est recontrôlée par coloration Immuno-Histo-Fluorescence (IHF) pour l'expression de l'antigène Lu/BCAM sur les glomérules isolés (contrôle du phénotype Lu/BCAM : [Matériels et méthodes Page 51](#)). En plus de l'anticorps anti-Lu/BCAM, l'anticorps anti- $\beta$ 1 laminine est utilisé comme témoin (contamination de la préparation par des tubules), localisation glomérulaire.

L'anticorps Lu/BCAM spécifique couplé à un anti-anticorps secondaire lié à un Alexa fluor 488 fluorescent émet une fluorescence verte au microscope confocal. Le deuxième anti-anticorps  $\beta$ 1 laminine couplé à un anti-anticorps secondaire lié à un Alexa fluor 568 produit une lumière fluorescente rouge. La  $\beta$ 1 laminine ne colocalise pratiquement pas avec Lu/BCAM dans le glomérule (présence d'une fluorescence jaune en cas de colocalisation : [Figure 24 C](#)).

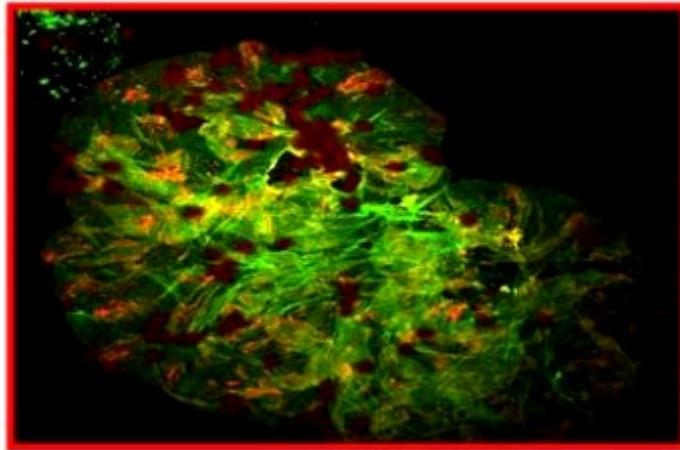
**A**



**B**



C

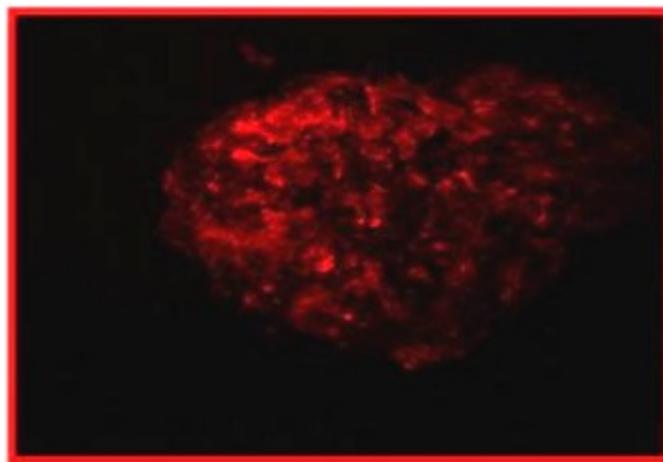


**Figure 24 : Mise en évidence des cellules exprimant Lu/BCAM dans les glomérules WT au microscope confocal 60X**

**A : Fluorescence avec l'anti-L55 (verte), marquage Lu/BCAM**

**B : Fluorescence avec l'anti-β1L (rouge), marquage laminine 10 (α5β1γ1)**

**C : Très faible colocalisation entre Lu/BCAM et β1 laminine 10 (jaune)**



**Figure 25 : Mise en évidence des cellules n'exprimant pas Lu dans les glomérules KO au microscope confocal 60X en présence de l'anti-L55 et β1L**

**Pas de fluorescence verte, confirmation de l'absence de Lu/BCAM**

Lu/BCAM est localisé sur les cellules, en contact avec la membrane basale glomérulaire qui exprime la laminine 521, au niveau des cellules podocytaires et endothéliales (Figure 24A). Or la β1 laminine est exprimée dans la matrice mésangiale (Figures 24B et 25). Cette coloration IHF est la dernière étape de contrôle du phénotype Lu/BCAM. Une des préparations de glomérules de souris KO a été mise à l'écart, car il y avait présence de glomérules émettant une fluorescence verte indiquant la présence de Lu/BCAM.

### **III ) CO-PRECIPITATION ET ELECTROPHORESES DES EXTRAITS DE PROTEINES GLOMERULAIRES**

Pour identifier d'éventuels partenaires de Lu/BCAM, des co-précipitations ont été effectuées avec l'appât Fc-Lu à partir de l'extrait de protéines glomérulaires.

La première étape consiste à extraire les protéines glomérulaires en tampon RIPA NP40 à 0.5% contenant des inhibiteurs de protéase (IP). Ensuite l'extrait de protéines est dosé par la micro-méthode de PIERCE BCA en présence de SDS. La concentration de chaque extrait de protéines est ainsi déterminée ([Matériels et méthodes Page 52](#)).

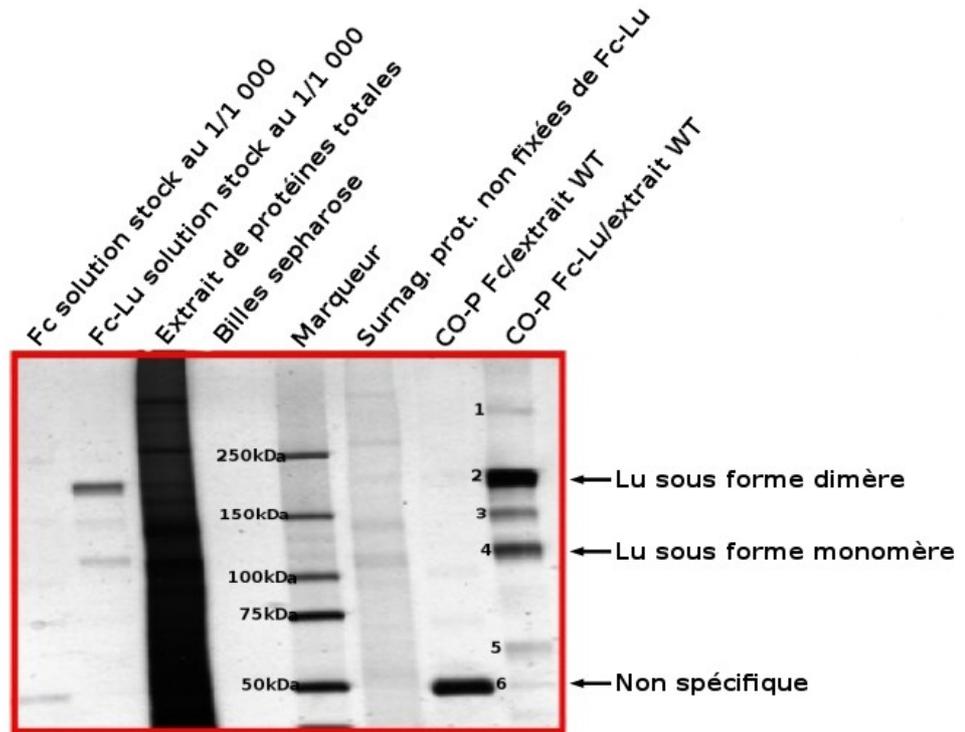
Deux co-précipitations préalables sont successivement effectuées avec l'extrait protéique afin d'éliminer les interactions non-spécifiques, tout d'abord avec les billes de protéines A sepharose seule (témoin bruit de fond), puis couplées à des fragments Fc des IgG1 humaines (achetées dans le commerce : témoin non spécifique).

Le surnageant de ces deux co-précipitations est incubé avec l'appât Fc-Lu/BCAM (Fc-Lu) pour la co-précipitation de partenaires éventuels de Lu/BCAM. Les éluats sont déposés sur gels 3 à 8% acrylamide tampon Tris Acétate SDS pour être séparés par électrophorèse.

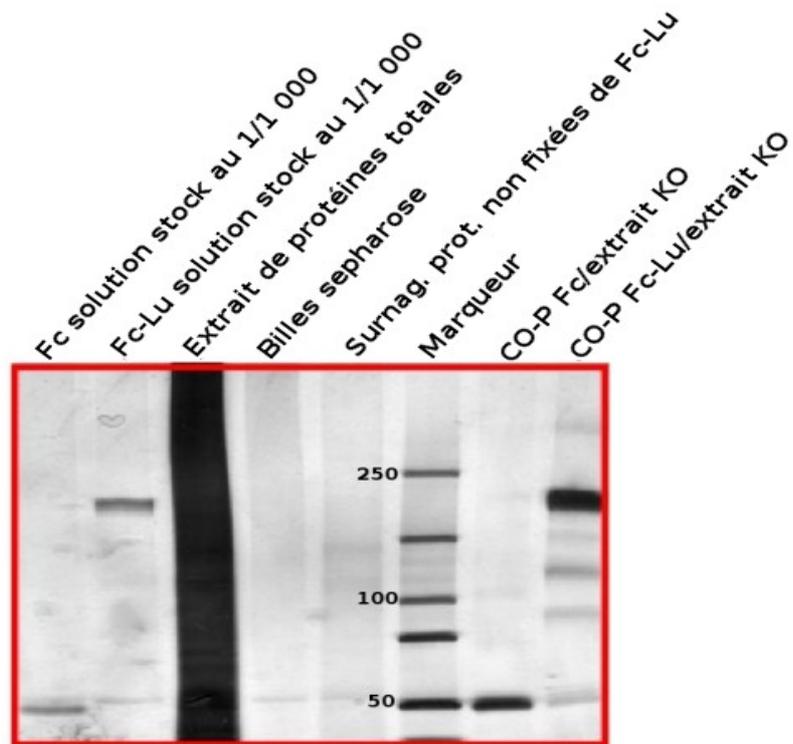
#### **III.1 ) REVELATION AU NITRATE D'ARGENT DES PROTEINES CO-PRECIPITEES AVEC L'APPÂT Fc-Lu A PARTIR DES EXTRAITS GLOMERULAIRES WT et KO**

La révélation des protéines par la coloration au nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) permet de détecter de petites quantités de protéines (~10ng) co-précipitées par l'appât Fc-Lu.

Le Fc seul sert de témoin pour la CO-P Fc, et le Fc-Lu seul sous forme de monomère/dimère pour la CO-P Fc-Lu. Pour les CO-P Fc-Lu/extrait WT et KO, on obtient le même profil, sauf que la bande 5 migre à une taille différente dans le KO. On observe 6 bandes dans l'échantillon WT dont la bande 2 est le dimère de Fc-Lu, la bande 4 est le monomère de Fc-Lu. La bande 1 à 400kDa pourrait être un bon candidat pour la laminine  $\alpha 5$ , partenaire connu de la protéine Lu/BCAM. Toutes ces bandes seront analysées ensuite par spectrométrie de masse ([Figures 26 et 27](#)).



**Figure 26 : CO-P Fc-Lu/extract WT**  
 Gel 3 à 8% acrylamide Tris Acétate de CO-P révélé par le nitrate d'argent



**Figure 27 : CO-P Fc-Lu/extract KO**

### III.2 ) REVELATION AU NITRATE D'ARGENT DES PROTEINES CO-PRECIPITEES LORS DES CO-P LuDA/extrait WT et KO

LuDA est un mutant de la glycoprotéine recombinante Lu/BCAM obtenu en remplaçant l'acide aminé aspartique en position 380 par un acide aminé alanine dans la protéine Lu/BCAM. Le Fc-LuDA muté n'est plus capable de fixer la laminine. La construction Fc-LuDA a été utilisée dans ces tests de CO-P.

La CO-P Fc-LuDA/extrait WT a le même profil en électrophorèse que la CO-P Fc-Lu/extrait WT (Figures 28 et 26).

Les bandes de la CO-P Fc-LuDA/extrait KO sont très peu visibles par rapport à la CO-P Fc-Lu/extrait KO, à l'exception de la bande Lu/BCAM (Figures 29 et 27).

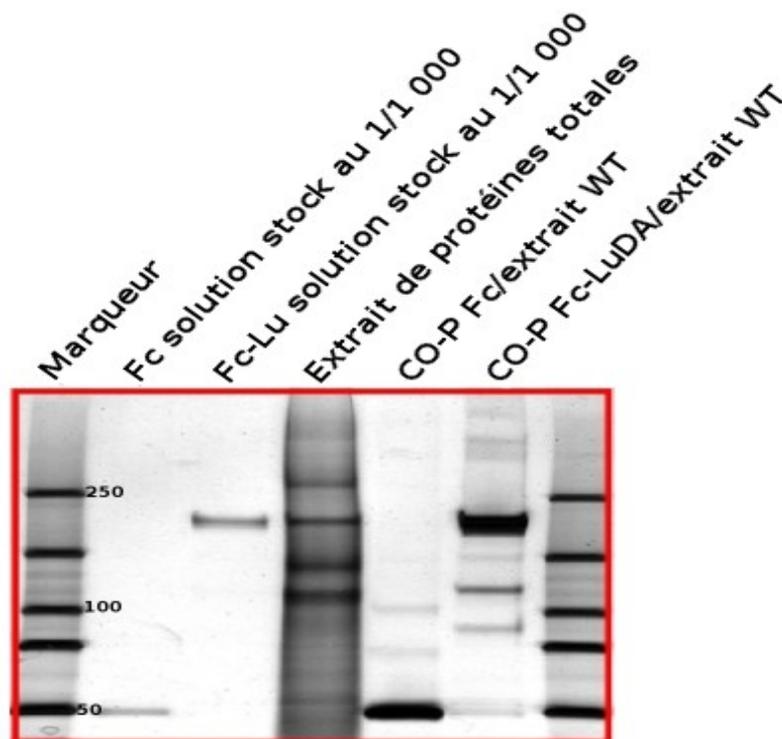
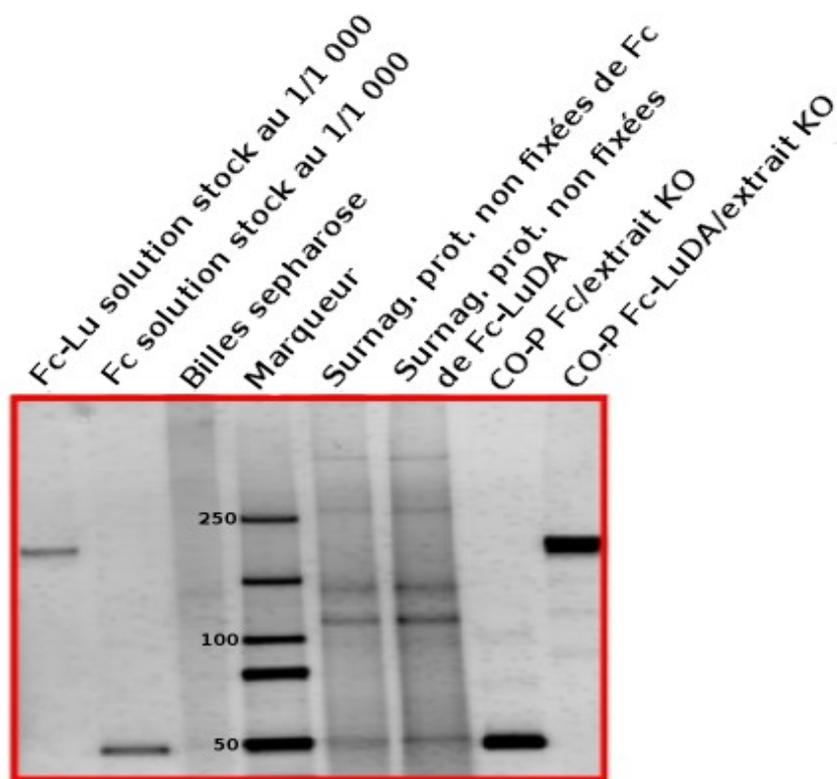


Figure 28 : CO-P Fc-LuDA/extrait WT



**Figure 29 : CO-P Fc-LuDA/extrait KO**

### **III.3 ) REVELATION DES MÊMES ELUATS EN CONDITIONS REDUITES**

On utilise le  $\beta$  mercapto-éthanol (produit toxique) pour réduire les ponts disulfures et ainsi supprimer la forme dimérique de Lu.

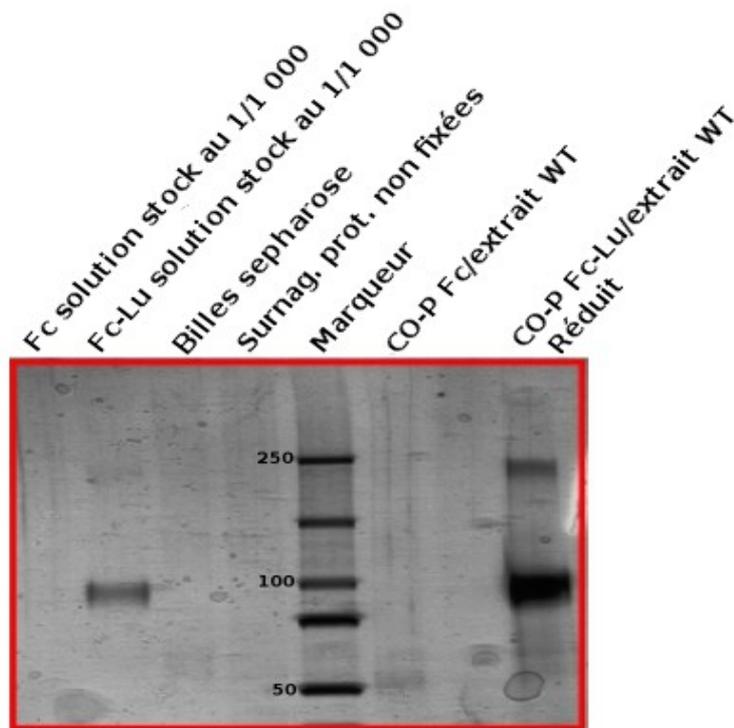


Figure 30 : CO-P Fc-Lu/extract WT en conditions réduites

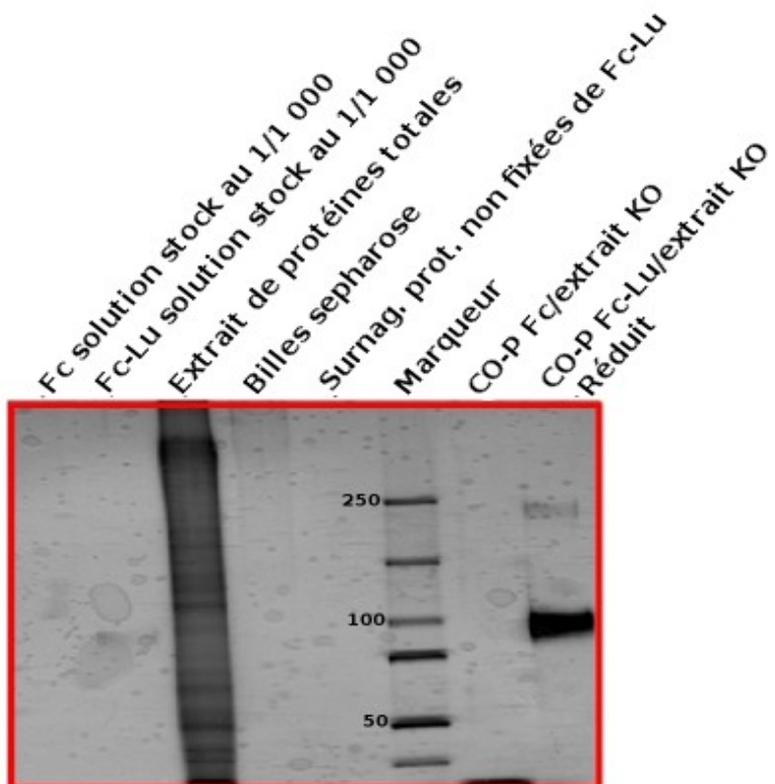


Figure 31 : CO-P Fc-Lu/extract KO en conditions réduites

La disparition des bandes hautes est observée, en particulier celle qui se trouvait à 400kDa. Lu/BCAM est présent majoritairement sous forme de monomère vers environ 100kDa. Le dimère Lu/BCAM, minoritaire, est détecté vers 250kDa. On ne révèle pas d'autres bandes dans la co-précipitation.

#### **IV ) ANALYSE DES GELS DE CO-P Fc-Lu/extrait WT PAR SPECTROMETRIE DE MASSE**

Ces CO-P Fc-Lu/extrait WT précédemment analysées par coloration AgNO<sub>3</sub> sont redéposées sur gel en quantités plus importantes (4 fois plus). Les gels sont révélés au bleu colloïdal. La révélation de la quantité limite de protéines détectée par cette coloration est environ 100 ng, ce qui correspond à la limite d'analyse en spectrométrie de masse.

Les résultats de la spectrométrie de masse n'ont pas permis de détecter de partenaire éventuel de Lu/BCAM. Les résultats de la CO-P Fc-Lu/extrait WT : Les bandes 1 et 6 sont non significatives; les autres bandes 2, 3, 4 et 5 ont révélé la présence de l'appât Lu/BCAM. On attendait en position 2 la forme dimérique de Lu/BCAM et en 4 la forme monomérique. La laminine potentiellement en position 1 n'a pas été identifiée, confirmant ainsi le résultat de la CO-P Fc-Lu/extrait WT en mode réduit. Deux hypothèses sont retenues, soit l'appât Fc-Lu sous forme dimérique ne précipite pas la laminine, soit l'extraction de protéines glomérulaire avec le tampon RIPA NP40 à 0,5% n'a pas permis d'extraire suffisamment de laminine ([Matériels et méthodes Page 51](#)). Nous avons testé dans un premier temps la deuxième hypothèse. Deux autres protocoles d'extraction de protéines ont été testés pour essayer d'améliorer l'extraction de la laminine.

#### **V ) ESSAIS D'EXTRACTION ET DE CO-PRECIPITATION DE LA LAMININE**

Nous avons extrait les protéines de glomérules en EDTA 10mM ([Annexe Page 115](#)). La CO-P a ensuite été faite comme précédemment à l'aide de l'appât Fc-Lu, en tampon Tris NaCl EDTA 2mM, NP40 1%, Na desoxycholate 0,05% et IP.

● Le dosage par la méthode de PIERCE BCA donne une concentration en protéines

glomérulaire beaucoup plus faible qu'avec la méthode classique d'extraction.

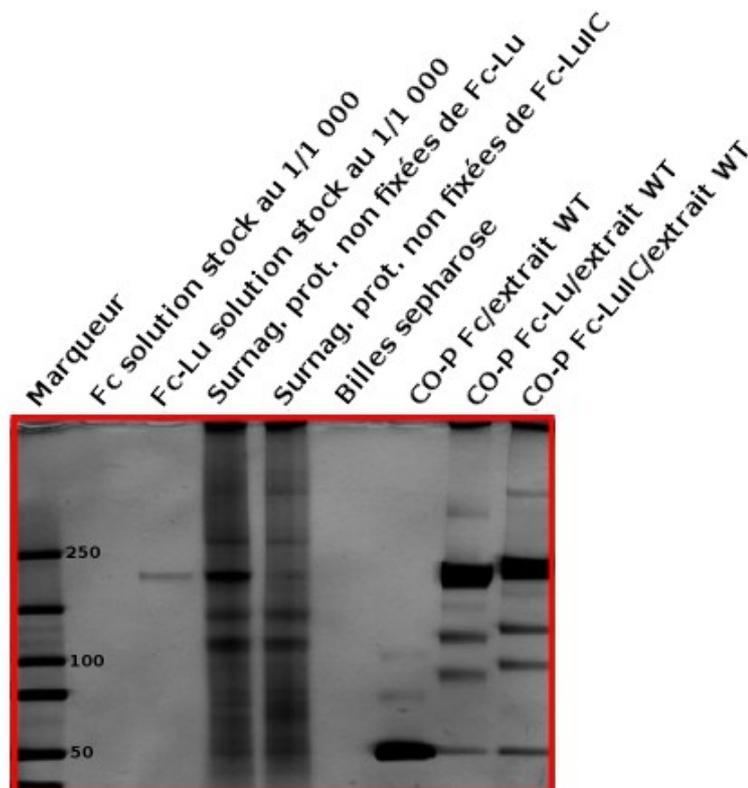
[Laminines protéines] = 0.12 $\mu$ g/ $\mu$ l, or en détergent NP40 [Protéines] = 1.8 $\mu$ g/ $\mu$ l en moyenne.

● La CO-P en RIPA EDTA 2mM final à partir de cet extrait donne toujours **le même profil** déjà obtenu auparavant sur le gel Tris Acétate 3 à 8% acrylamide (voir **Résultats III-1 Figure 26** : CO-P Fc-Lu/extrait WT).

Nous avons ensuite testé l'extraction de protéines membranaires par deux détergents le **BRIJ 97** et l'**octylglucoside**, détergents doux qui permettent d'extraire des complexes protéiques (**Annexe Page 115**).

● L'extraction de protéines membranaires à partir des glomérules et le dosage des protéines à partir d'un échantillon WT donnent une concentration faible (0,3 $\mu$ g/ $\mu$ l) par rapport aux conditions d'extraction en RIPA NP40 0,5%.

● Nous avons testé l'extrait par le détergent BRIJ 97 en CO-P en utilisant la protéine Fc-Lu comme appât, comme précédemment, mais également la nouvelle construction Fc-LuIC contenant en plus de la partie extracellulaire de la protéine Lu/BCAM, la partie intracytoplasmique (voir **Matériels et méthodes III**).



**Figure 32 : CO-P WT Fc-Lu et Fc-LuIC après extraction glomérulaire en détergent BRIJ 97**

Pas plus que précédemment, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une co-précipitation de la laminine. De plus, les résultats obtenus avec l'appât Fc-LuIC, comparés aux résultats obtenus avec l'appât Fc-Lu ne montrent pas l'apparition de nouvelles bandes co-précipitées. Le même profil est obtenu avec les deux appâts, avec un léger décalage des tailles des bandes présentes (Figure 32).

## VI ) ANALYSES PAR WESTERN BLOT

Nous avons entrepris l'analyse des co-précipitations par western blot, à l'aide d'anticorps anti  $\alpha 5$  laminine, afin de confirmer la présence ou l'absence de la laminine dans nos échantillons.

### VI.1 ) ANALYSE PAR WESTERN BLOT DES CO-P Fc-Lu

La présence de laminine  $\alpha 5$  est recherchée dans les CO-P par western blot en conditions non réduites grâce à l'anticorps (Ac L85) spécifique de la laminine  $\alpha 5$ .

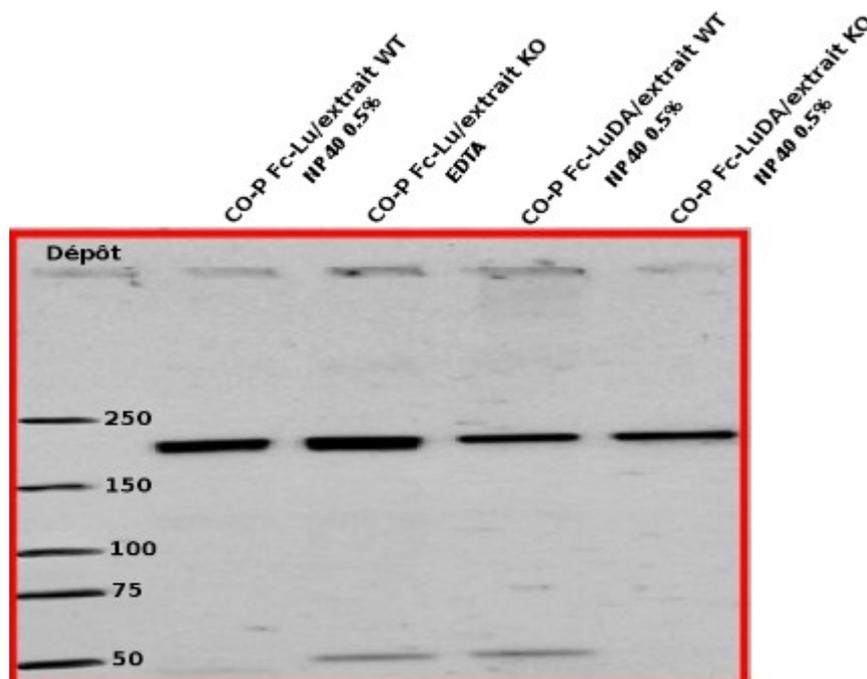


Figure 33 : Western blot des CO-P Fc-Lu et Fc-LuDA à la fois extrait WT et KO avec Ac L85 au 1/5 000 en conditions non réduites

On révèle une bande de 200kDa environ pour tous les échantillons (**CO-P Fc-Lu/extrait KO en EDTA 2mM NP40 1%**, les trois autres en **RIPA NP40 0,5%**), or on attend pour les CO-P Fc-Lu, la laminine  $\alpha 5$  au environ de 400kDa. Pour les CO-P Fc-LuDA on obtient une quantité moindre. Certains échantillons montrent la présence d'une bande au environ de 50kDa ([Figure 33](#)).

## **VI.2 ) ANALYSE A L'AIDE DE PLUSIEURS ANTICORPS ANTI ALPHA 5 LAMININE**

Plusieurs anti  $\alpha 5$  laminine sont testés sur des CO-P Fc-Lu/extrait WT en NP40 0,5% et CO-P Fc-Lu/extrait KO en EDTA par western blot en conditions non réduites et réduites. Ce sont :

L'anti  $\alpha 5$  laminine de chèvre Santacruz 16 595, l'anti  $\alpha 5$  laminine de lapin Santacruz 20 145, l'anti  $\alpha 5$  laminine de rat 4G6. On obtient les mêmes résultats que précédemment, c'est-à-dire la présence d'une bande au environ de 200kDa en conditions non réduites et une bande à 50kDa en conditions réduites ([Figures non présentées](#)).

D'autres tests ont été faits sur les mêmes CO-P après restauration forte des blots de nitrocelluloses, mais avec les anticorps secondaires seuls. Une bande est révélée à 200kDa pour les anticorps secondaires anti-lapin, et une faible bande à 200 et 50kDa pour les anticorps secondaires anti-chèvre et anti-rat en conditions non réduites. En conditions réduites, on révèle une bande à 50kDa avec les anticorps anti-chèvre et anti-rat ([Figures non présentées](#)).

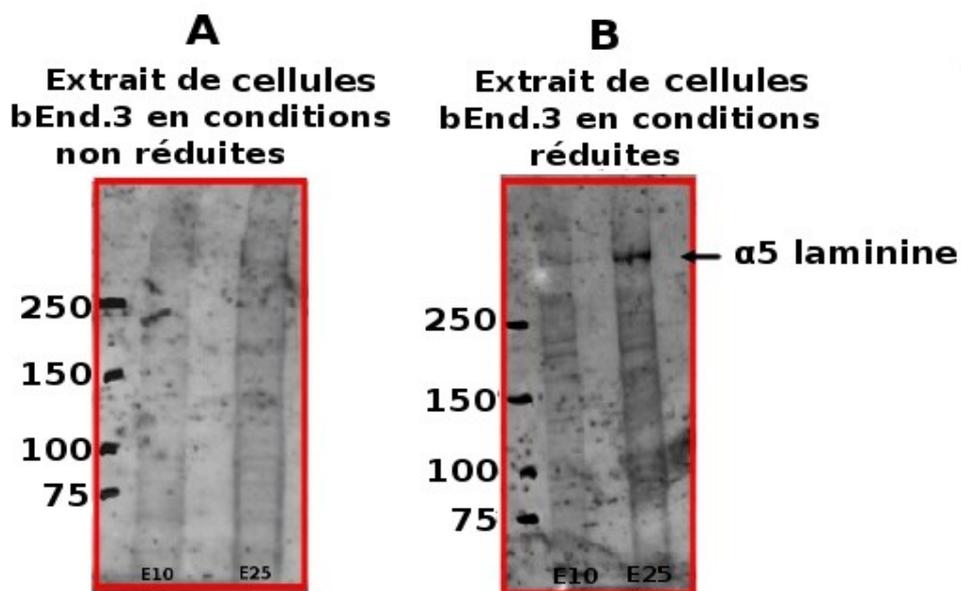
Enfin, dans une dernière série d'analyses, nous avons incubé les membranes avec des IgGs ou des serums normaux de lapin, de chèvre ou de rat, à la place des anticorps primaires, et révélés les bandes d'hybridation avec les anticorps secondaires correspondants. Nous avons révélé une bande à 200kDa et une bande à 50kDa en conditions non réduites, et uniquement la bande à 50kDa en conditions réduites ([Figures non présentées](#)).

Nous avons donc conclu que les profils d'hybridations obtenus n'étaient pas spécifiques des anticorps anti  $\alpha 5$  laminine.

### VI.3 ) CONTRÔLE DES ANTICORPS ANTI LAMININE ALPHA 5

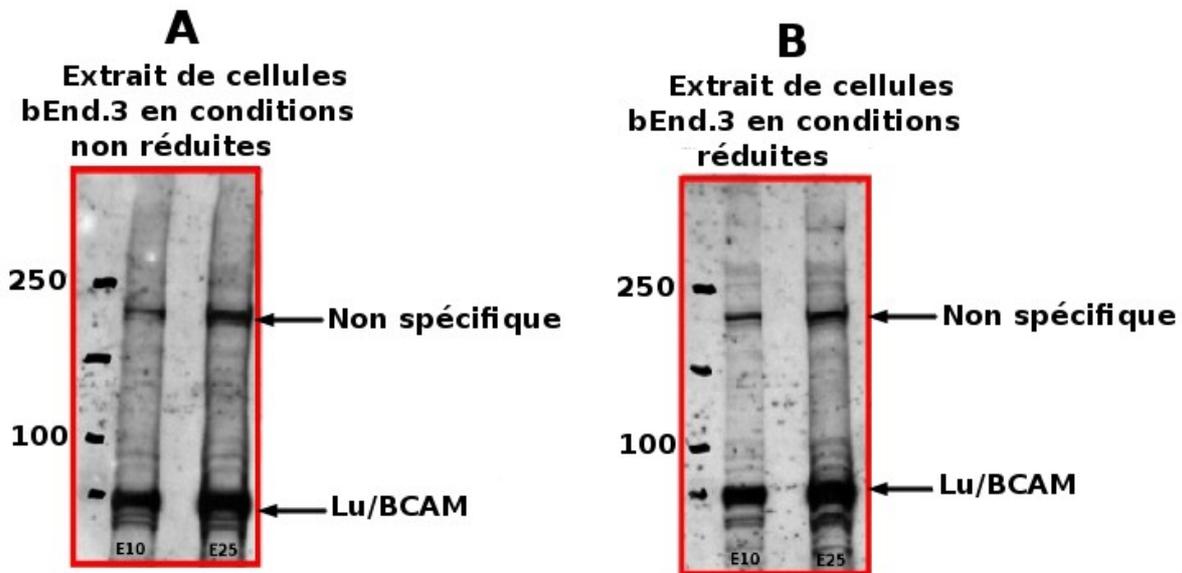
Nous avons utilisé des extraits cellulaires bEnd.3. Ces cellules sont décrites comme exprimant la laminine  $\alpha 5$ , ainsi que la protéine Lu/BCAM, et nous ont servi de témoin positif pour nos analyses.

L'extrait de cellules murines bEnd.3 (lignée endothéliale du cerveau) a été préparé en tampon RIPA-BRIJ 97/NP40, et testé par Western Blot en conditions réduites et non réduites, tout d'abord avec l'anticorps anti  $\alpha 5$  laminine de lapin, L85.



**Figure 34 : Les western blots des extraits de cellules bEnd.3 (E10 = 10  $\mu$ l, E25 = 25 $\mu$ l) en tampon BRIJ 97 en conditions non réduites A et réduites B révélés par l'Ac L85 1/5 000. Présence d'une bande  $\alpha 5$  laminine à 400kDa en conditions réduites dans E25.**

L'anticorps L85 au 1/5 000 révèle une bande à 400kDa en conditions réduites dans l'extrait de 25 $\mu$ l (E25). Les autres anticorps anti  $\alpha 5$  laminine n'ont pas été testés. L'anticorps L85 révèle bien la laminine  $\alpha 5$ , confirmant la spécificité de cet anticorps (Figure 34).



**Figure 35 : Mise en évidence l'expression du gp Lu/BCAM par Ac 602 au 1/3 000  
Présence d'une bande à 75kDa à la fois en conditions non réduites A et réduites B**

Puis nous avons contrôlé la présence de la glycoprotéine Lu/BCAM sur le même extrait bEnd.3. L'anticorps 602 au 1/3 000 anti Lu/BCAM met en évidence 1 bande à 75kDa spécifique de la forme endogène de la protéine Lu/BCAM, à la fois en conditions non réduites et réduites. Par contre la bande d'hybridation révélée aux environs de 200kDa est non spécifique.

#### **VI.4 ) ANALYSE DES CO-P A L'AIDE DE L'ANTICORPS ANTI ALPHA 5 LAMININE L85 PURIFIE**

Dans une dernière série d'analyses, nous avons testé l'anticorps anti laminine  $\alpha 5$  ultra-purifié (Ac L85 P52) avec 3 dilutions différentes à la fois en conditions non réduites et réduites sur un échantillon de CO-P Fc-Lu/extrait KO en RIPA base. Le western blot donne les résultats suivants : Toutes les bandes révélées par la coloration au nitrate d'argent sont révélées par l'anticorps L85 P52 en conditions non réduites. En conditions réduites, la bande à 400kDa est absente. (Figure 36).

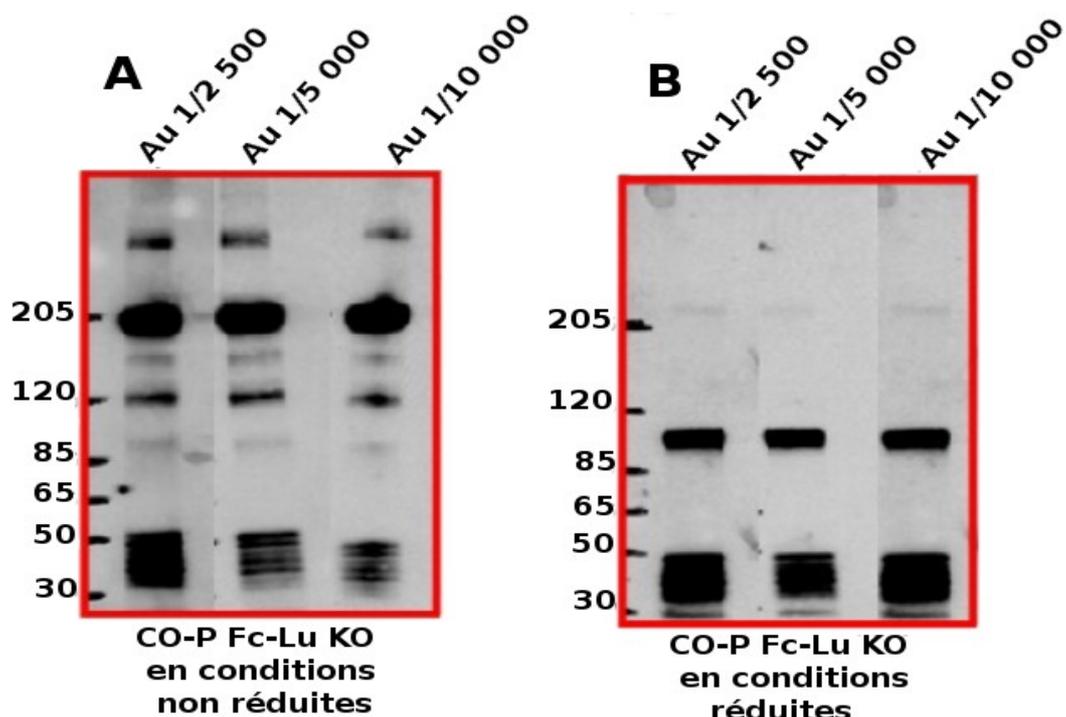


Figure 36 : L'utilisation de l'Ac L85 P52 au 1/2 500, 1/5 000, 1/10 000 en conditions non réduites et réduites

## VII ) PREPARATION D'UN NOUVEL APPÂT LuIC

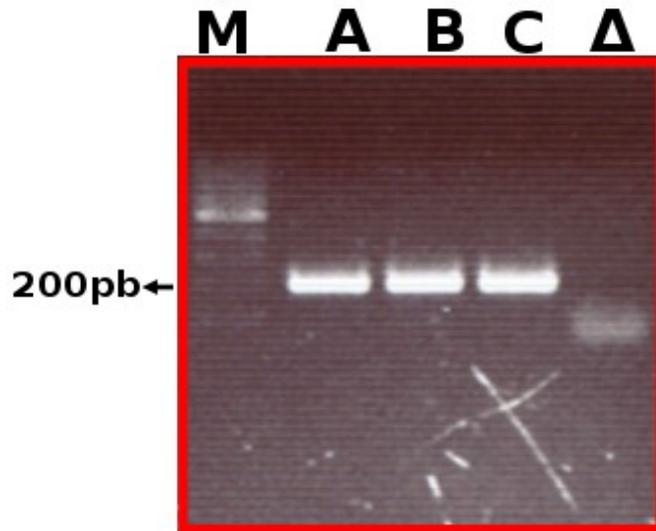
Le mode opératoire de la préparation d'un nouvel appât est décrit de manière très détaillée en «Matériels et méthodes». Dans ce chapitre, je présente principalement les difficultés rencontrées au cours de la préparation de l'appât Lu/BCAM.

### VII.1 ) CLONAGE

#### VII.1.1 ) PREPARATION DE L'INSERT

##### AMPLIFICATION DE L'INSERT

L'amplification de l'ADN correspondant à la partie intra-cytoplasmique du Lu/BCAM murin a donné un bon rendement pour les trois conditions expérimentales utilisées (Figure 37).



**Figure 37 : Contrôle de la taille et la PCR des trois préparations A, B et C en présence d'eau distillée (Δ : témoin PCR non spécifique)**

### **DIGESTION DU PRODUIT DE PCR PAR L'ENZYME DE RESTRICTION Esp3I**

La première difficulté est apparue avec la digestion du produit de PCR par l'endonucléase de restriction Esp3I. Cette étape ne peut pas être contrôlée. L'enzyme ôte quelques nucléotides aux extrémités du produit de PCR, ce qui ne modifie pas la migration du fragment d'ADN sur gel d'agarose de manière suffisante pour être visualisé.

Remarque : l'amplification de l'insert est visualisée sur gel d'agarose 2 ou 3% et non sur gel à 0,8%.

Sachant que les enzymes de restriction digèrent mal l'ADN quand leur site de restriction est localisé aux extrémités du fragment à digérer, nous avons dû faire des estimations du rendement de la digestion par Esp3I. Un premier essai de clonage a été fait avec une estimation de 50% de molécules digérées (5 à 10ng d'insert mis en ligation) et n'a pas réussi. Un deuxième essai avec une estimation de 25% de molécules digérées (10 à 20ng d'insert en ligation) a permis l'obtention d'un des clonages. Enfin, une estimation à 10% de digestion nous a permis d'obtenir le deuxième clonage.

## **VII.1.2 ) PREPARATION DES VECTEURS**

### **DIGESTION DES VECTEURS PAR Esp3I**

Deux vecteurs ont été utilisés pour le sous-clonage de l'insert Lu/IC, le **vecteur LuN** contenant l'ADNc codant pour la partie extracellulaire de la protéine Lu/BCAM non mutée, et

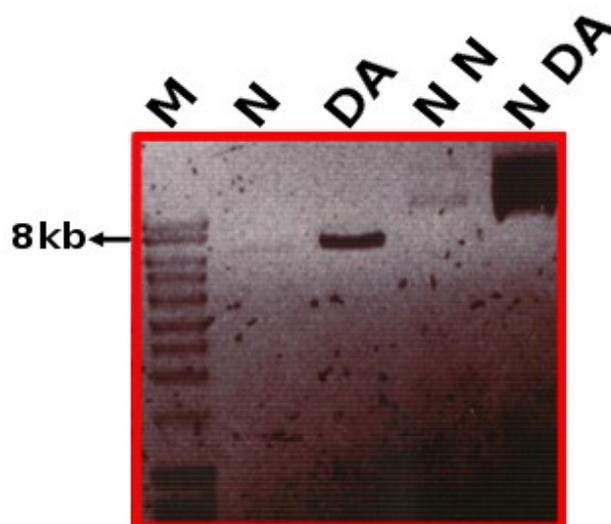
**le vecteur LuDA**, muté pour que la protéine recombinante produite ne puisse plus fixer la laminine  $\alpha 5$ .

Les deux vecteurs ont été digérés par l'endonucléase Esp3I, pour permettre la ligation des extrémités compatibles avec l'insert Lu/IC.

Cette fois, l'étape de digestion peut être contrôlée après dépôt d'un aliquote et migration sur gel d'agarose. Le vecteur digéré migre à la taille attendue du fragment d'ADN linéarisé, alors que le vecteur non digéré migre soit plus vite, soit plus lentement, selon la forme «super-enroulée» ou «relâchée» de l'ADN circulaire.

La digestion du vecteur DA par l'enzyme «Esp3I» est montrée en [Figure 38](#). Le vecteur DA (DA) digérés migre à 8kb, qui est la taille attendue, sur gel d'agarose à 0,8%. Le vecteur non digéré migre nettement au dessus de 8kb. Par contre, pour le vecteur N<sub>3</sub>C, la quantité d'ADN est très faible ([Figure 38](#)) et ne correspond pas à la quantité théorique. L'expérience a été refaite en utilisant une nouvelle préparation du vecteur pig plus signal Lum clone N<sub>3</sub>C de départ. La deuxième digestion des vecteurs N<sub>3</sub>C a donné le rendement attendu. Nous avons dû répéter cette étape pour la préparation d'un des vecteurs, en grande partie dégradé après digestion par Esp3I, le rendement de la bande digérée non dégradée étant trop faible pour nous permettre de poursuivre le clonage.

Les vecteurs digérés par Esp3I sont ensuite précipités à l'éthanol absolu, rincés en éthanol 70%, séchés et redissout en tampon TE. Cette étape permet d'éliminer le tampon de digestion de l'endonucléase Esp3I, et de préparer l'ADN pour l'étape suivante.



**Figure 38: Contrôle des vecteurs N<sub>3</sub>C et DA avant (N N, N DA) et après (N, DA) digestion par l'enzyme «Esp3I»**

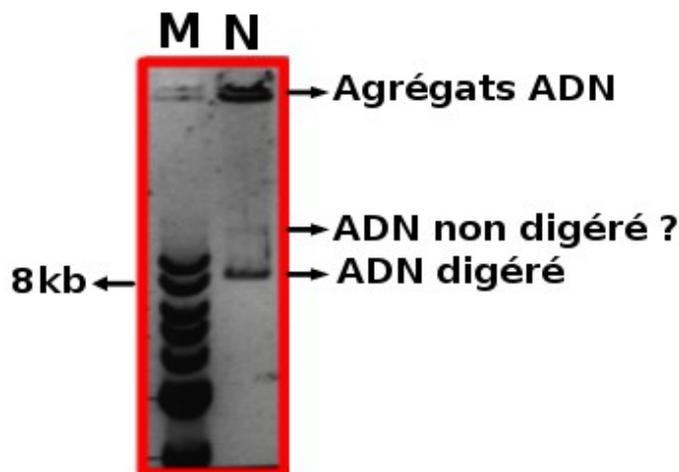
## DEPHOSPHORYLATION DES VECTEURS

Lorsqu'on réalise la ligation avec un vecteur digéré par une enzyme de restriction (linéarisé) en présence d'un insert, le vecteur a tendance à se recirculariser sans inclure l'insert avec une haute efficacité, alors qu'il se referme en incluant l'insert avec une efficacité bien moindre. Ceci engendre un «bruit de fond» très important lors de la transformation bactérienne, avec la présence de nombreuses colonies contenant le vecteur vide, et peu ou pas de colonies contenant le plasmide recombinant.

Pour pallier à ce problème, on procède donc à une étape de déphosphorylation du vecteur, ce qui le rend incapable de se refermer sur lui-même sans la présence de l'insert.

Là encore, la déphosphorylation du vecteur est une étape qu'on ne peut pas contrôler. Les produits de déphosphorylation sont déposés sur gel d'agarose à 0,8% en TAE et mis à migrer. Cette étape permet de purifier l'ADN déphosphorylé et de vérifier plusieurs paramètres :

La taille des vecteurs (8kb) et l'absence d'ADN non digéré, ainsi que l'absence d'agrégats d'ADN.



**Figure 39 : Contrôle des vecteurs N<sub>3</sub>C après déphosphorylation par l'enzyme «fast AP»**

Le résultat de la déphosphorylation du vecteur N<sub>3</sub>C (Figure 39) donne un exemple des problèmes rencontrés :

- La préparation N après déphosphorylation montre la présence du vecteur digéré, mais également de traces de vecteur non digéré, ainsi que des agrégats.

● Seule la bande correspondant à l'ADN digéré déphosphorylé est découpée au scalpel et éluée du gel d'agarose. La présence d'ADN non digéré ou agrégé entraîne donc des pertes de rendement de la préparation, ce qui nous a conduit à devoir refaire plusieurs fois cette étape, en modifiant les conditions de digestion, d'une part, et en prolongeant le temps de resolubilisation de l'ADN après précipitation à l'éthanol, d'autre part.

### **ELUTION DU GEL D'AGAROSE**

L'ADN des vecteurs est extrait du gel d'agarose en utilisant le «Elution-KIT : QIAEX II» (Matériels et méthodes Page 63). Cette étape donne des rendements variables, en fonction de la taille du fragment d'ADN élué, mais généralement faibles pour les vecteurs de haut poids moléculaire, ce qui est notre cas. D'où la nécessité de reconstrôler la quantité d'ADN avant d'effectuer la ligation. Nous avons obtenu en moyenne des rendements de 20 à 40%. Les ADN plasmidiques élués peuvent être directement utilisés pour la dernière étape avant la transformation bactérienne, la ligation avec l'insert.

### **LIGATION**

Nous avons utilisé trois conditions expérimentales différentes pour la ligation, en faisant varier le rapport vecteur/insert. La première ligation avec peu d'insert (10 à 20ng) n'a pas permis d'obtenir de clones après transformation bactérienne. La deuxième ligation (20 à 40ng d'insert) nous a permis d'obtenir des bactéries recombinantes pour le vecteur N. Enfin la dernière ligation (60ng d'insert) a permis d'obtenir des bactéries recombinantes pour le vecteur DA.

### **TRANSFORMATION BACTERIENNE**

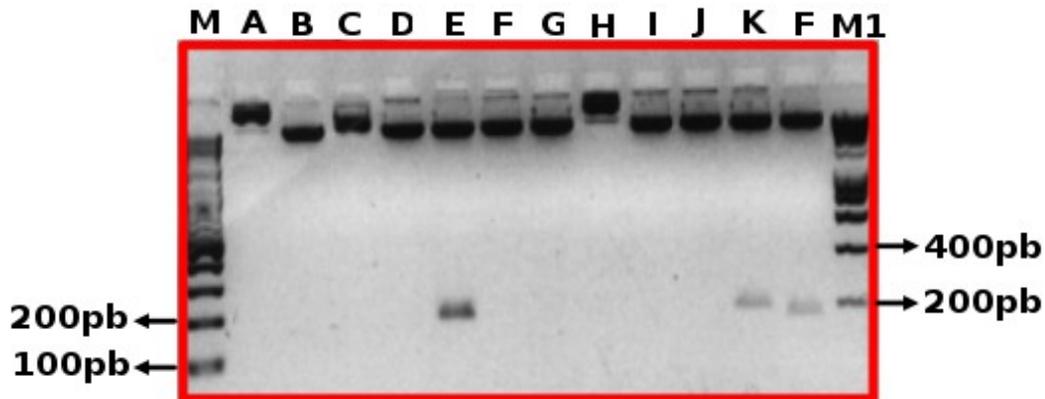
Un premier essai de transformation bactérienne par choc thermique n'ayant pas donné de résultats, nous avons utilisé des bactéries électro-compétentes DH5 $\alpha$ . Les produits de ligation ont été précipités à l'éthanol et redissouts en tampon TE pour la transformation bactérienne, le tampon de ligation étant toxique pour les bactéries électro-compétentes.

Le clonage du fragment ADNc LuIC dans le vecteur N<sub>3</sub>C a été obtenu au bout de deux essais, et celui du fragment LuIC dans le vecteur DA au bout de trois essais.

### **MINIPREPARATION DE PLASMIDES**

L'ADN plasmidique a été préparé à partir d'une dizaine de colonies bactériennes pour

chaque clonage. Un aliquote de chaque minipréparation a été digéré par l'endonucléase de restriction Esp3I afin de vérifier la présence de l'insert.



**Figure 40 : Identification des clones de bactéries transformées (E, K, F) par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.**

Le contrôle de la présence de l'insert pour le clonage dans le vecteur N a montré trois clones positifs sur douze, dont un clone migrant à la taille attendue 180pb, et les deux autres migrant aux environs de 200pb (Figure 40). Trois clones sur douze également étaient positifs pour le clonage dans le vecteur DA (Figure non présentée). L'identification des clones à sélectionner pour la suite de la manipulation nécessite le séquençage de tous les clones positifs.

### **SEQUENÇAGE**

Tous les clones positifs pour la présence de l'insert ont été envoyés pour séquençage, le contrôle de la séquence par rapport à la séquence consensus de l'ADNc Lu/BCAM, permettant de choisir le ou les bons clones. Pour le clonage dans le vecteur N, un clone a montré une insertion de la séquence LuIC en tandem (clone E), un clone en sens inverse de lecture (clone K) et un dans le bon sens (clone F) (Figure 40). Les 3 clones positifs pour le clonage DA ont montré une insertion correcte du fragment LuIC. La prochaine étape est la transformation des cellules COS 7 par les plasmides N<sub>3</sub>C et DA pour produire les protéines recombinantes LuIC et LuDA/IC.

## **VII.2 ) EXPRESSION DANS DES CELLULES COS 7**

La mise en culture des cellules COS 7 a été faite pour la préparation des deux

nouveaux appâts – **Fc-LuIC** et **Fc-LuDA/IC**. En appliquant les règles de sécurité et d'hygiène durant les différentes manipulations, aucune contamination n'a été constatée dans les milieux de culture, de l'étape de transfection jusqu'au recueil des surnageants des cultures cellulaires. Un aliquote des surnageants après transfection des cellules COS 7 a été prélevé, puis déposé sur gel acrylamide 8% pour contrôler la production des glycoprotéines recombinantes Lu/BCAM. Les échantillons de surnageants des cellules COS 7 transfectées par les plasmides N<sub>3</sub>C et DA sont séparés par électrophorèse et révélés par le nitrate d'argent (Figure 41).

Les glycoprotéines Lu/BCAM recombinantes brutes sont mises en évidence. L'étape suivante est la purification de cette production de glycoprotéines recombinantes Lu/BCAM.

### **VII.3 ) PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES DE Lu/BCAM**

La purification des surnageants a été réalisée dans des mini-colonnes contenant des billes de protéine A sepharose. Chaque échantillon est passé trois fois sur la même colonne sur trois jours. La vérification des profils de migration des protéines recombinantes Lu/BCAM N<sub>3</sub>C et DA s'effectue par électrophorèse sur gel acrylamide 8%, puis révélation au nitrate d'argent. Les productions étaient pures, puis des contrôles par Western blot ont été effectués sur les préparations purifiées, à l'aide des anticorps anti Luthéran 602 et L54. **L'anticorps L54 reconnaît la partie extracellulaire de la protéine Lu/BCAM alors que l'anticorps 602 reconnaît la partie intra-cytoplasmique (IC)**. Les préparations protéiques migrent à la taille attendue pour l'expression des protéines Fc-LuIC, Fc-LuDA/IC et sont bien reconnues par l'anticorps 602 et L54 (Figure 42).

La présence des glycoprotéines Lu/BCAM recombinantes signifie que les cellules COS 7 transfectées ont bien produit les glycoprotéines Fc-LuIC, Fc-LuDA/IC attendues. La présence du fragment Fc des IgGs provoque la dimérisation de la molécule, d'où la migration vers 250kDa. On note également la présence de 2 isoformes (doublet). Ceci est probablement dû à des différences de glycosylation lors de la production dans les cellules COS 7.

**Ces nouvelles préparations de protéines recombinantes sont quantifiées par densité optique à 280nm, et ont été utilisées dans les essais de co-précipitations.**

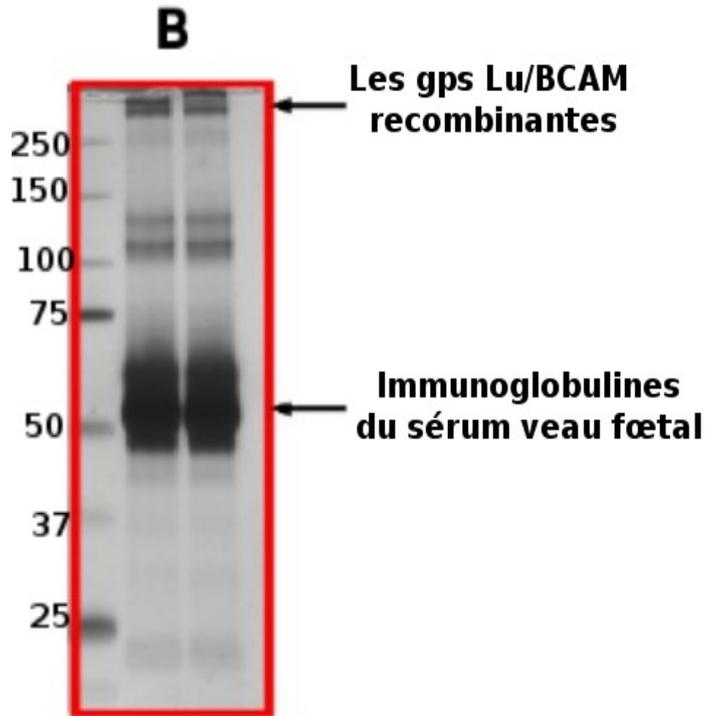


Figure 41 : Électrophorèse des surnageants des cellules COS 7 transfectées par des plasmides N<sub>3</sub>C et DA, coloration par le nitrate d'argent. Présence des glycoprotéines Lu/BCAM recombinantes à une taille supérieure à 250kDa.

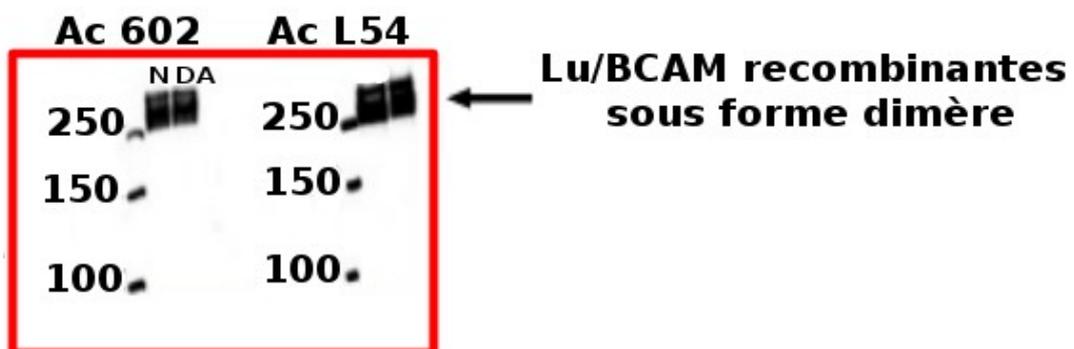


Figure 42 : Contrôle des surnageants des cellules COS 7 transfectées, après purification sur colonne, séparés par western blot en conditions non réduites et révélé à l'aide d'anticorps 602, L54

## DISCUSSION

Les glycoprotéines Lu/BCAM ont été tout d'abord découvertes à la surface des globules rouges, chez l'homme, système dans lequel elles ont été le plus étudiées. Elles sont les récepteurs uniques de la chaîne  $\alpha 5$  des laminines dans les cellules érythroïdes et les co-récepteurs avec certaines intégrines dans les cellules épithéliales. Dans les globules rouges, leur fonction de récepteur est modulée par des mécanismes de phosphorylation et de liaison au cytosquelette membranaire (Gauthier et al. 2005; Chaar et al. 2010). On retrouve Lu/BCAM avec un profil d'expression très large dans de nombreux tissus et organes (Moulson et al. 2001). Toutefois, sa fonction n'y a été que très peu étudiée.

Mon équipe a montré au niveau des glomérules de souris Lu/BCAM est le récepteur exclusif de la chaîne  $\alpha 5$  des laminines. L'absence de la chaîne  $\alpha 5$  chez l'embryon provoque en effet une dysmorphogénèse, voire une agénèse des reins associée à une désagrégation de la lame basale (Miner et Li 2000). Or l'inactivation de Lu/BCAM entraîne des altérations rénales beaucoup moins sévères que l'inactivation de son ligand, la chaîne  $\alpha 5$  laminine. Lu/BCAM ne semble pas impliqué dans le développement rénal, mais dans le maintien de l'intégrité de la membrane basale dans le rein et l'intestin. Dans les glomérules, Lu/BCAM est localisé sur les cellules podocytaires et endothéliales, en contact avec la membrane basale glomérulaire qui exprime la laminine 521, mais pas dans la matrice mésangiale qui exprime la laminine 511 (Colin et al. 2008; Rahuel et al. 2008). L'objectif du stage était de tenter d'identifier des partenaires de Lu/BCAM au niveau des cellules podocytaires et endothéliales, en travaillant sur des extraits de protéines glomérulaires des souris Lu/BCAM<sup>+/+</sup> et Lu/BCAM<sup>-/-</sup> par co-précipitations avec l'aide de l'appât Fc-Lu. Il n'y a aucune littérature scientifique sur la méthode à utiliser, car les premières études approfondies de la structure de la glycoprotéine ont débuté en 1994, donc relativement récente.

Ce laboratoire a généré un modèle murin n'exprimant plus Lu. Les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles, mais présentent des anomalies structurales des membranes basales contenant la laminine 521, dans le rein et dans l'intestin, tissus dans lesquels la protéine Lu/BCAM est fortement exprimée. Mon équipe a montré que l'absence de Lu conduit dans ces deux tissus à un épaissement de la membrane basale qui perturbe la structure des couches musculaires intestinales et de la membrane basale glomérulaire (GBM) dans le rein, sans répercussion fonctionnelle en conditions normales d'élevage (Rahuel et al. 2008). Les souris Lu/BCAM<sup>-/-</sup> ont été utilisées comme

de témoin négatif aux souris Lu/BCAM<sup>+/+</sup> pour la mise en évidence éventuelle de partenaires de Lu/BCAM.

Un autre difficulté à contourner était le choix de la technique. La technique classique de co-immunoprécipitation par un anticorps n'a pas été utilisée au démarrage du projet parce qu'il n'avait pas d'anticorps anti Lu/BCAM immunoprécipitant disponible. Une technique alternative a donc été mise au point, la co-précipitation (CO-P) de la protéine recombinante Lu/BCAM (avec ou sans la partie intra-cytoplasmique) comme appât pour entraîner d'éventuels partenaires présents dans l'extrait glomérulaire. L'avantage de cette technique de CO-P était de permettre de travailler sur des souris WT (Lu/BCAM<sup>+/+</sup>) ou KO (Lu/BCAM<sup>-/-</sup>), et d'utiliser des protéines de fusion mutées, comme le Fc-LuDA qui n'est plus capable d'interagir avec la laminine  $\alpha 5$ .

Autre précaution, avant d'utiliser l'appât Fc-Lu dans notre protocole de co-précipitation, nous avons vérifié par marquage Immuno-Histo-Fluorescence que la protéine recombinante Fc-Lu (sous forme dimérique) était capable de reconnaître son (ses) partenaire(s) sur des coupes de tissus. De même, nous avons incubé la protéine recombinante sur des coupes de rein, lavé les coupes et révélé la fixation du Fc-Lu sur le tissu à l'aide d'un anticorps fluorescent dirigé contre le fragment Fc. Les images obtenues au microscope confocal correspondaient aux images obtenues en analysant l'expression de Lu/BCAM endogène. Les résultats obtenus par notre équipe, indiquent que le Fc-Lu se fixe dans des zones exprimant majoritairement la laminine 521. La spécificité de cette approche est démontrée par le fait qu'un Fc-Lu muté ponctuellement sur le site d'interaction avec la laminine ne se fixe plus sur les coupes de rein. L'inconvénient de cette technique était que la construction Fc-Lu dimérise, à cause de la présence du fragment Fc des immunoglobulines humaines.

## ***1) CO-PRECIPITATION DES EXTRAITS GLOMERULAIRES***

La protéine A sepharose (billes sepharose), les fragments Fc et Fc-Lu solution stock au 1/1000 servent de bruit de fond aux CO-P Fc et CO-P Fc-Lu. Les extraits de glomérules ont été d'abord en contact avec les billes sepharose, puis transférés sur les billes sepharose-Fc, et enfin en contact avec les billes sepharose-Fc-Lu. La co-précipitation des billes sepharose et les billes sepharose-Fc n'indiquent pas la présence de fixation non spécifique. L'observation macroscopique des gels 3 à 8% acrylamide révélé par la coloration au nitrate d'argent des protéines co-précipitées avec l'appât Fc-Lu, à partir des extraits glomérulaires WT et KO ([Figures 26 et 27](#)). La présence de 6 bandes avec le même profile à la fois dans les extraits WT et KO, sauf que la bande 5 migre à un

taille différente dans le KO. En comparant les bandes 2 et 4 au bruit fond Fc-Lu solution stock au 1/1000, on peut déduire que la bande 2 est le dimère de Fc-lu et la bande 4 est le monomère de Fc-Lu. La bande 6 est non spécifique. La bande 1 à 400kDa pourrait être un bon candidat pour la laminine  $\alpha 5$ , partenaire connu de la protéine Lu/BCAM. Si ce résultat se confirme, se sera une étape importante pour la mise en place du protocole.

D'autres co-précipitations spécifiques ont été réalisées pour confirmer les premiers résultats. Pour cela, on a utilisé pour la co-précipitation LuDA à la fois pour l'extrait WT et KO. LuDA est un mutant de la glycoprotéine recombinante Lu/BCAM obtenu en remplaçant l'acide aminé aspartique en position 380 par un acide aminé alanine dans la protéine Lu/BCAM. Le Fc-LuDA muté n'est plus capable de fixer la laminine.

L'observation de la CO-P Fc-LuDA/extrait WT donne le même profil en électrophorèse que la CO-P Fc-Lu/extrait WT (Figures 28 et 26). Autrement dit, on aurait dû obtenir la disparition au moins de la bande 1. En revanche, les bandes de la CO-P Fc-LuDA/extrait KO sont très peu visibles par rapport à la CO-P Fc-Lu/extrait KO, à l'exception de la bande Lu/BCAM (Figures 29 et 27). Donc, l'hypothèse de la présence de la laminine  $\alpha 5$  au niveau de la bande 1 n'est pas confirmée.

La co-précipitation de Fc-Lu/extrait WT et Fc-Lu/extrait KO en conditions réduites montrent la présence uniquement de deux bandes. L'action du  $\beta$  mercapto-éthanol réduit les ponts disulfures et ainsi supprimer la forme dimérique de Lu. D'où la présence majoritaire du monomère Lu/BCAM en environ 100kDa. Le dimère Lu/BCAM, minoritaire, est détecté vers 250kDa. En revanche, aucune autre bande a été révélée. Ces derniers résultats rendent peu probable la présence de la laminine  $\alpha 5$  au niveau de la bande 1. Pour avoir une réponse définitive, l'analyse des bandes du gel de CO-P Fc-Lu/extrait WT ont été réalisées par spectromètre de masse.

## **II ) ANALYSE DES BANDES DU GEL DE CO-P PAR SPECTROMETRIE DE MASSE**

Les CO-P Fc-Lu/extrait WT sont révélées au bleu colloïdal et les extraits sur gel sont déposés en quantité plus importantes (4 fois plus). La présence de l'appât Lu/BCAM est mise en évidence au niveau des bandes 2, 3, 4 et 5. Par contre, la bande 1 demeure non significative donc la laminine potentiellement n'a pas été identifiée confirmant ainsi les résultats précédents, l'absence de la laminine  $\alpha 5$ .

Une question s'imposait, avons nous extrait suffisamment de la laminine avec le tampon RIPA NP40 à 0,5%? L'extraction de la laminine est décrite dans des articles, soit en tampon à haute force ionique en NaCl 4,5M (Timpl et al. 1979), soit à forte concentration en EDTA 10mM

(Paulsson et Saladin 1989). Nous avons extrait les protéines de glomérules en EDTA 10mM et par deux détergents doux le **BRIJ 97** et l'**octylglucoside**. Dans les deux cas, le dosage par la méthode de PIERCE BCA donne une concentration en protéines glomérulaire beaucoup plus faible qu'avec la méthode classique d'extraction en RIPA NP40 0,5% ([Protéines] = 0.12 et 0.3µg/µl contre en détergent NP40 [Protéines] = 1.8µg/µl en moyenne). De même, les CO-P Fc-Lu et Fc-LuIC/extrait WT en BRIJ 97 ne mettent pas en évidence une co-précipitation de la laminine ([Figure 32](#)). Pour continuer la mise en place du protocole, je devais vérifier la présence de la laminine dans les différents extraits glomérulaires à l'aide de plusieurs anticorps anti  $\alpha 5$  laminine.

### **III ) ANALYSE PAR WESTERN BLOT**

Le premier anticorps (**Ac L85 au 1/5 000**) spécifique de la laminine  $\alpha 5$  utilisé sur les différents échantillons (**CO-P Fc-Lu/extrait KO en EDTA, les trois autres en RIPA NP40 0,5%**), ne montre pas la présence de la laminine  $\alpha 5$  au environ de 400kDa pour les CO-P Fc-Lu ([Figure 33](#)). Ce résultat peut s'expliquer, soit par la présence de la chaîne  $\alpha 5$  laminine sous forme dégradée, soit par une réaction non spécifique de l'anticorps L85.

L'utilisation d'autres anticorps spécifiques, l'anti  $\alpha 5$  laminine de chèvre Santacruz 16 595, l'anti  $\alpha 5$  laminine de lapin Santacruz 20 145 et l'anti  $\alpha 5$  laminine de rat 4G6 qui reconnaissent une partie de la région interne de la chaîne  $\alpha 5$  laminine. Les tests effectués des CO-P Fc-Lu/extrait WT en NP40 0,5% et CO-P Fc-Lu/extrait KO en EDTA par western blot en conditions non réduites et réduites confirment les résultats antérieurs. Les co-précipitations ne révèlent pas la présence de la laminine  $\alpha 5$  dans les différents extraits. Nous pouvons affirmer que les profils d'hybridations obtenus n'étaient pas spécifiques des anticorps anti  $\alpha 5$  laminine.

Nous avons utilisé un autre extrait de cellules murines bEnd.3 (lignée endothéliale du cerveau). Ces cellules sont décrites comme exprimant la laminine  $\alpha 5$ , ainsi que la protéine Lu/BCAM. L'extrait de cellules murines bEnd.3 a été préparé en tampon RIPA-BRIJ 97/NP40, et testé par Western Blot en conditions réduites et non réduites, tout d'abord avec l'anticorps anti  $\alpha 5$  laminine, L85 au 1/5 000. L'anticorps L85 révèle une bande à 400kDa en conditions réduites dans l'extrait de 25µl (E25), confirmant la présence de la laminine  $\alpha 5$  et de la spécificité de cet anticorps ([Figure 34](#)).

Nous avons aussi vérifié la présence de la glycoprotéine Lu/BCAM sur le même extrait

bEnd.3. L'anticorps 602 au 1/3 000 qui reconnaît la partie intra-cytoplasmique (IC) de Lu/BCAM, met en évidence 1 bande à 75kDa spécifique de la forme endogène de la protéine Lu/BCAM, à la fois en conditions non réduites et réduites.

Nous avons conclu de ces analyses que :

- Le tampon d'extraction BRIJ 97 permet bien d'extraire à la fois la laminine et le Lu/BCAM endogène à partir des cellules en culture bEnd.3 (Figure 35).
- L'anticorps anti  $\alpha 5$  laminine de lapin L85 est bien spécifique de la chaîne  $\alpha 5$  laminine en conditions réduites.

Dernier contrôle sur notre échantillon de CO-P Fc-Lu/extrait KO en RIPA base, à l'aide de l'anticorps anti laminine  $\alpha 5$  ultra-purifié (Ac L85 P52) en conditions non réduites et réduites (Figure 36). On obtient le résultat inverse par rapport aux cellules murines bEnd.3. La présence d'une bande à 400kDa en conditions non réduites, mais absente en conditions réduites. Tous ces résultats confirment que nous n'avons pas co-précipité la laminine, quelque soit le tampon d'extraction ou l'appât utilisé.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les différents essais de co-précipitation que nous avons effectués ne nous ont pas permis d'identifier la laminine 521 dans nos échantillons co-précipités, alors que nous l'avons caractérisé dans des extraits utilisés pour la co-précipitation.

Nous n'avons pas réussi à co-précipiter la laminine 521 à l'aide de notre appât Fc-Lu. Notre hypothèse actuelle est que la dimérisation de l'appât peut être un inconvénient majeur c'est-à-dire que Lu/BCAM sous forme dimérique, dans nos conditions expérimentales, ne reconnaît pas ou trop peu son partenaire laminine, alors qu'il le reconnaît bien par des techniques Immuno-Histo-Fluorescence (voir **RESULTATS II**). En IHF, on a une interaction entre une protéine en solution (Fc-Lu) et la laminine présente sur la coupe de rein (dans son environnement cellulaire, favorable à sa conformation fonctionnelle). En technique de co-précipitation, par contre, les différents partenaires sont tous les deux en solution, et les affinités peuvent en être affectées de façon importante.

Mon équipe de projet poursuit les mises au point technique en reprenant les essais de co-précipitation, mais cette fois en utilisant un appât Lu monomérique pour vérifier cette hypothèse. Kikkawa et al. 2002 ont montré qu'in vitro Lu monomérique était capable d'interagir avec la laminine 10/11 coatée sur boîte de pétri.

La préparation de Fc-Lu contient deux sites de clivage situés entre la séquence Lu/BCAM et Fc pour des protéases, pouvant ainsi séparer les deux fragments protéiques. Lu/BCAM sans la présence du fragment Fc est majoritairement sous forme monomérique. De fait de la séparation des fragments Lu et Fc, les billes de Protéine A sepharose ne peuvent plus être utilisées pour les co-précipitations. L'idée retenue est de biotinyler le fragment Lu/BCAM, pour permettre d'utiliser la technique de streptavidine-agarose pour effectuer les co-précipitations. Le protocole est en cours de test.

Par ailleurs, mon équipe dispose actuellement d'un anticorps anti-Lu/BCAM immunoprécipitant produit chez le rat. L'utilisation de cet anticorps permettra des analyses de co-immunoprécipitation classique, chez les souris WT.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### -A-

**Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB and Seed B.** 1990. CD44 is the principal cell surface for hyaluronate. *Cell*. 61 : 1303-1313.

**Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta v, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, Von Der Mark K, Wewer UM, Yamada Y and Yurchenco PD.** 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol*. 24: 326-332.

**Aumailley M and Smyth N.** 1998. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat*. 193 : 1-21.

**Avasthi PS and Koshy V.** 1988. Glomerular endothelial glycocalyx. *Contrib Nephrol*. 68 : 104-113.

### -B-

**Bulger RE, Eknayan G, Purcell DJ and Dobyan DC.** 1983. Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest*. 72 : 128-141.

**Burton NM and Brady RL.** 2008. Molecular structure of the extracellular region of Lutheran blood group glycoprotein and location of the laminin binding site. *Blood Cells Mol Dis*. 40 : 446-448.

### -C-

**Callender ST, Race RR and Pykoc ZV.** 1945. Hypersensitivity to transfused blood. *Br Med J*. ii : 83.

**Campbell IG, Foulkes WD, Senger G, Trowsdale J, Garin-Chesa P and Rettig WJ.** 1994. Molecular cloning of the B-CAM cell surface glycoprotein of epithelial cancers: a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*. 54 : 5761-5765.

**Chaar V, Picot J, Renaud O, Bartolucci P, Nzouakou R, Bachir D, Galacteros F, Colin Y, Le Van Kim C, and EL Nemer W.** 2010. Aggregation of mononuclear and red blood cells through alpha4beta1 Lu/BCAM interaction in sickle cell disease. *Haematologica*.

**Chanarin I and Cutbush M.** 1956. The expected blood-group antibody, anti-Lub. 1956. *Nature*. 178 : 855-856.

**Chang RL, Deen WM, Robertson CR and Brenner BM.** 1975. Permeability of the glomerular capillary wall to macromolecules. I. Theoretical considerations. *Biophys J*. 15 : 861-886.

**Colin Y, Rahuel C, Wautier MP, El Nemer W, Filipe A, Cartron JP, Le Van Kim C and Wautier JL.** 2008. Red cell and endothelial Lu/BCAM beyond sickle cell disease. *Transfus Clin Biol.* 15 : 402-405.

**Collec E, El Nemer W, Gauthier E, Gane P, Lecomte MC, Dhermy D, Cartron JP, Colin Y, Le Van Kim C and Rahuel C.** 2007. Ubc9 interacts with Lu/BCAM adhesion glycoproteins and regulates their stability at the membrane of polarized MDCK cell. *Biochem J.* 402 : 311-319.

**Cognato H and Yurchenco PD.** 2000. Form and function : the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 218 : 213-234.

**-D-**

**Daniels G and Green C.** 2000. Expression of red cell surface antigens during erythropoiesis. *Vox Sang.* 78 Suppl 2 : 149-153.

**Drewniok C, Wienrich BG, Schön M, Ulrich J, Zen Q, Telen MJ, Hartig RJ, Wieland I, Gollnick H and Schön MP.** 2004. Molecular interactions of B-CAM (basal-cell adhesion molecule) and laminin in epithelial skin cancer. *Arch Dermatol Res.* 296 : 59-66.

**-E-**

**El-Aouni C, Herbach N, Blattner SM, Henger A, Rastaldi MP, Jarad G, Jarad G, Miner JH, Moeller MJ, St-Arnaud R, Dedhar S, Holzman LB, Wanke R and Kretzler M.** 2006. Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 17 : 1334-1344.

**El Nemer W, Wautier MP, Rahuel C, Gane P, Hermand F, Galactéros F, Wautier JL, Cartron JP, Colin Y and Le Van Kim C.** 2007. Endothelial Lu/BCAM glycoproteins are novel ligands for red blood cells alpha4beta1 integrin : role in adhesion of sickle red blood cells to endothelial cells. *Blood.* 109 : 3544-3551.

**El Nemer W, Colin Y, Bauvy C, Codogno P, Fraser RH, Cartron JP and Le Van Kim C.** 1999. Isoforms of the Lutheran/basal cell adhesion molecule glycoprotein are differentially delivered in polarized epithelial cells. Mapping of the basolateral sorting signal to a cytoplasmic di-leucine motif. *J Biol Chem.* 274 : 31903-31908.

**El Nemer W, Gane P, Colin Y, Bony V, Rahuel C, Galactéros F, Cartron JP and Le Van Kim C.** 1998. The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesions molecules. *J Biol Chem.* 273 : 16686- 16693.

**El Nemer W, Rahuel C, Colin Y, Gane P, Cartron JP and Le Van Kim C.** 1997. Organisation of the human Lu gene and molecular basis of the Lu(a)/Lu(b) blood group polymorphism. *Blood.* 89 : 4608-461

**-G-**

**Gauthier E, Rahuel C, Wautier MP, El Nemer W, Gane P, Wautier JL, Cartron JP, Colin Y and Le Van Kim CL.** 2005. Protein kinase A-dependent phosphorylation of Lutheran/Basal cell

adhesion molecule glycoprotein regulates cell adhesion to laminin alpha5. *J Biol chem.* 280 : 30055-3062.

**Gee B and Platt. OS.** 1995. CD44 may be a laminin receptor of normal and sickle erythrocytes. *Blood.* 86 : 137a.

**Gross PL and Aird W.C.** 2000. The endothelium and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 26 : 463-478.

**-H-**

**Higgins JM, Eddington DT, Bhatia SN and Mahadevan.** 2007. Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluidic device. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 : 20496-20500.

**Hines PC, Zen Q, Burney SN, Shea DA, Ataga KI, Orringer Ep, Telen MJ and Parise LV.** 2003. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood.* 101 : 3281-3287.

**Horvat R, Hovorka A, Dekan G, Poczewski H and Kerjaschki D.** 1986. Endothelial cell membranes contain podocalyxin- the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol.* 102 : 484-491.

**Humphries MJ.** 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 28 : 311-339.

**-I-**

**Ido H, Harada K, Futaki S, Hayashi Y, Nishiuchi R, Natsuka Y, Li S, Wada Y, Combs AC, Ervasti JM and Sekiguchi K.** 2004. Molecular dissection of the alpha-dystroglycan and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10. *J Biol Chem.* 279 : 10946-10954.

**Issett PD and Anstee DJ.** 1998. The lutheran blood group system. *Montgomery Scientific Publications.* Durham pp : 671-694.

**-J-**

**Judson PA, Spring FA, Parsons SF, Anstee DJ and Mallinson G.** 1988. Report on group 8 (Lutheran) antibodies. *Rev Fr Transfus Immunohematol.* 31 : 433-440.

**-K-**

**Kershaw DB, Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Whiteside CI and Wiggins RC.** 1995. Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium. *J Biol Chem.* 270 : 29439-29436.

**Kikkawa Y, Sudo R, Kon J, Mizuguchi T, Nomizu m, Hirata K and Mitaka T.** 2008. laminin alpha5 mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or lutheran/basal cell adhesion molecule. *Exp Cell Res.* 314 : 2579-2590.

**Kikkawa Y, Virtanen I and Miner JH.** 2003. Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane. *J Cell Biol.* 161 : 187-196.

**Kikkawa Y, Moulson CL, Virtanen I and Miner JH.** 2002. Identification of the binding site for the Lutheran blood group glycoprotein on laminin alpha 5 through expression of chimeric laminin chains in vivo. *J Biol Chem.* 277 : 44864-44869.

**Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A and Sekiguchi K.** 2000. Integrin binding specificity of laminin-10/11 : laminin-10/11 are recognized by alpha3 beta1, alpha6 beta1 and alpha6 beta4 Integrins. *J Cell Sci.* 113 : 869-876.

**King AJ and Brunner BM.** 1991. Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *Am. J. Physiol.* 260 : R653-R662.

**Kissemeyer-Nielsen.F** 1960. A further example of anti-Lu-b as a cause of a mild haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.* 5 : 532-537.

**Kralovics R, Passamonti E, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M and Skoda RC.** 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 352 : 1779-1790.

**Kroviaski Y, El Nemer W, Gane P, Rahuel C, Gauthier E, Lecomte MC, Carton JP, Colin Y and Le Van Kim C.** 2004. Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin. *Br J Haematol.* 126 : 255-264.

-L-

**Levene C, Karniel Y and Sela R.** 1987. 2-Aminoethylisothiuronium bromide-treated red cells and the Lutheran antigens Lu<sup>a</sup> and Lu<sup>b</sup>. *Transfusion.* 27 : 505-506.

-M-

**Makino M, Okazaki I, Kasai S, Nishi N, Bougaeva M, Weeks BS, Otaka A, Nielsen PK, Yamada Y and Nomizu M.** 2002. Identification of cell binding sites in the laminin alpha5-chain G domain. *Exp. Cell Res.* 277 : 95-106.

**Mankelov TJ, Burton N, Stefansdottir FO, Spring FA, Parsons SF, Pedersen JS, Oliveira CL, Lammie D, Wess T, Mohandas N, Chasis JA, Brady RL and Anstee DJ.** 2007. The Laminin 511/521-binding site on the Lutheran blood group glycoprotein is located at the flexible junction of Ig domains 2 and 3. *Blood.* 110 : 3398-3406.

**Mckee KK, Harrison D, Capizzi S and Yurchenco PD.** 2007. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem.* 282 : 21437-21447.

**Metral S, Machnicka B, Bigot S, Colin Y, Dhermy D and Lecomte MC.** 2009. AlphaII-spectrin is critical for cell adhesion and cell cycle. *J Biol Chem.* 284 : 2409-2418.

**Miner JH.** 2008. Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech.* 71 : 349-356.

**Miner JH and Yurchenco PD.** 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Dev Biol.* 20 : 255-284.

**Miner JH and Li C.** 2000. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol.* 217 : 278-289.

**Miner JH, Cunningham J and Sanes JR.** 1998. Roles for laminin in embryogenesis : exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol.* 143 : 1713-1723.

**Miner JH, Lewis RM and Sanes JR.** 1995. Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J Biol Chem.* 270 : 28523-28526

**Moulson CL, Li C and Miner JH.** 2001. Localization of Lutheran, a novel laminin receptor, in normal, knockout, and transgenic mice suggests an interaction with laminin alpha5 in vivo. *Dev Dyn.* 222 : 101-114.

**Mulley JC, Norman PC, Tippett P and Beat RW.** 1988. A regional localisation for an X-linked suppressor gene (XS) for the the Lutheran blood group. *Hum Genet.* 78 : 127-129.

**Murphy MM, Zayed MA, Evans A, Parker CE, Ataga KI, Telen MJ and Parise LV.** 2005. Role of Rap1 in promoting sickle red blood adhesion to laminin via BCAM/Lu. *Blood.* 105 : 3322-3329.

**Mundel P and Kriz W.** 1995. Structure and function of podocytes: an update. *Anat. Embryol.* 192 : 385-397.

**Myhre B, Thompson M, Anson C, Fishkin B and Carter PK.** 1975. A further example of the recessive Lu(a-b-) phenotype. *Vox Sang.* 29 : 66-68.

-N-

**Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron IP, Colin Y and Mouro-Chanteloup I.** 2003. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated site mutation. *J Biol Chem.* 278 : 255526-25536.

**Nielsen PK and Yamada Y.** 2001. Identification of cell-binding sites on the Laminin alpha 5 N-terminal domain by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 276 : 10906-10912.

**Nielsen PK, Gho YS, Hoffman MP, Watanabe H, Makino M, Nomizu M and Yamada Y.** 2000. Identification of a major heparin and cell binding site in the LG4 module of the laminin alpha 5 chain. *J Biol Chem.* 275 : 14517-14523.

-P-

**Parsons SF, Lee G, Spring FA, Willig TN, Peters LL, Gimm JA, Tanner MJ, Mohandas N,**

**Anstee DJ and Chasis JA.** 2001. Lutheran blood group glycoprotein and its newly characterized mouse homologue specifically bind alpha 5 chain-containing human laminin with high affinity. *Blood.* 97 : 312-320.

**Parsons SF, Mallinson G, Daniels GL, Green CA, Smythe JS and Anstee DJ.** 1997. Use of domain-deletion mutants to locate Lutheran blood group antigens to each of the five immunoglobulin superfamily domains of the Lutheran glycoprotein : elucidation of the molecular basis of the Lu(a)/Lu(b) and the Au(a)/Au(b) polymorphisms. *Blood.* 97 : 4219-4225.

**Parsons SF, Mallinson G, Holmes CH, Houlihan JM, Simpson KL, Mawby WJ, Spurr NK, Wame D Barclay AN and Anstee DJ.** 1995. The Lutheran blood group glycoprotein, another member of the immunoglobulin superfamily, is widely expressed in human tissues and is developmentally regulated in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 : 5496-4500.

**Parsons SF, Mallinson G, Judson PA, Anstee DJ, Tanner MJ and Daniels GL.** 1987. Evidence that the Lub blood group antigen is located on red cell membrane glycoproteins of 85 and 78 kd. *Transfusion* 27 : 61-63.

**Patarroyo M, Tryggvason k and Virtanen I.** 2002. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 12 : 197-207.

**Paulsson M and Saladin K.** 1989. Mouse heart laminin. Purification of native protein and structural comparison with Engelbreth-Holm tumor laminin. *J Biol Chem.* 264 : 18726-18732.

-R-

**Rahuel C, Filipe A, Ritie L, El Nermer W, Patey-Mariaud N, Eladari P, Cartron JP, Le Van Kim C and Colin Y.** 2008. Genetic inactivation of the lamini  $\alpha 5$  chain receptor Lu/B-CAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294 : F393-F406.

**Rahuel C, Colin Y, Goossens D, Gane P, El Nemer W, Cartron JP and Le Van Kim C.** 1999. Characterization of a mouse laminin receptor gene homologous to the human blood group Lutheran gene. *Immunogenetics.* 50 : 271-277.

**Rahuel C, Le Van Kim C, Mattei MG, Cartron JP and Colin Y.** 1996. A unique gene encodes spliceoforms of the B-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein. *Blood.* 88 : 1865-1872.

**Rettig WJ, Dracopoli NC, Goetzger TA, Spengler BA, Biedler JL, Oettgen HF and Old LJ.** 1984. Somatic cell genetic analysis of human cell surface antigens : chromosomal assignments and regulation of expression in rodent-human hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81 : 6437-6441.

**Rostgaard J and Qvortrup K.** 2002. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries-site of the filtration barrier? *Cells Tissues Organs.* 170 : 132-138.

**Ryan GB, Hein SJ and Karnovsky MJ.** 1976. Glomerular permeability to proteins. Effects of hemodynamic factors on the distribution of endogenous immunoglobulin G and exogenous catalase in the glomerulus. *Lab. Invest.* 34 : 415-427.

-S-

**Sasaki T and Timpl R.** 2001. Domain Iva of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS Lett.* 509 : 181-185.

**Sassetti C, Van Zante A and Rosen SD.** 2000. Identification of endoglycan, a member of the CD34/podocalyxin family of sialomucins. *J Biol Chem.* 275 : 9001-9010.

**Savage CO.** 1994. The biology of the glomerulus: endothelial cells. *Kidney Int.* 45 : 314-319.

**Schön M, Klein CE, Hogenkamp V, Kaufmann R, Wienrich BG and Schön MP.** 2000. Basal-cell adhesion molecule (B-CAM) is induced in epithelial skin tumors and inflammatory epidermis, and is expressed at cell-cell and cell-substrate contact sites. *J Invest Dermatol.* 115 : 1047-11053.

**Spring FA, Judson PA, Daniels GL, Parsons SF, Mallinson G and Anstee DJ.** 1987. A human cell-surface glycoprotein that carries Cromer-related blood group antigens on erythrocytes and is also expressed on leucocytes and platelets. *Immunology.* 62 : 307-313.

**Suzuki N, Yokoyama E and Nomizu M.** 2005. Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res.* 46 : 142- 152.

-T-

**Takano T and Brady HR.** 1995. The endothelium in glomerular inflammation. *Curr. Opin.Nephrol. Hypertens.* 4 : 277-286.

**Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y and Betsholtz C.** 2002. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 161 : 799-805.

**Telen MJ.** 1995. Lutheran antigens, CD44-related antigens, and Lutheran regulatory genes. *Transfus Clin Biol.* 2 : 291-301.

**Timpl R, Tisi D, Talts J.F, Andac Z, Sasaki T and Hohenester E.** 2000. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biology* 19 : 309-317

**Timpl R and Brown JC.** 1996. Supermolecular assembly of basement membranes. *Bioessays.* 18 : 123-132.

**Tunggal P, Smyth N, Paulsson M and Ott MC.** 2000. Laminins : structure and genetic regulation. *Microsc Res Tech.* 51 : 214-227.

**Tzu J and Marinkovich MP.** 2008. Bridging structure with function : structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 40 : 199-214.

-U-

**Udani M, Zen Q, Cottman M, Jefferson S, Daymont C, Truskey G and Telen MJ.** 1998. Basal

cell adhesion molecule/Lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest.* 101 : 2550-2558.

-V-

**Virtanen I, Banerjee M, Palgi J, Korsgren O, Lukinius A, Thomell LE, Kikkawa Y, Sekiguchi K, Hukkanen M, Konttinen YT and Otonkoski T.** 2008. Blood vessels of human islets of langerhans are surrounded by a double basement membrane. *Diabetologia.* 51 : 1181-1191.

-W-

**Wautier MP, El Nemer W, Gane P, Rain JD, Cartron JP, Colin Y, Le Van Kim C and Wautier JL.** 2007. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia ver ais mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. *Blood.* 110 : 894-901.

**Willberg J, Hormia M, Takkunen M, Kikkawa Y, Sekiguchi K and virtanen I.** 2007. Lutheran blood group antigen as a receptor for alpha5 laminins in gingival epithelia. *J Periodontol.* 78 : 1810- 1818.

-X-

**Xu H, Foltz L, Sha Y, Madlansacay MR, Cain C, Lindemann G, Vargas J, Nagy D, Harriman B, Mahoney W and Schueler PA.** 2001. Cloning and characterization of human erythroid membrane-associated protein, human ERMAP. *Genomics.* 76 : 2-4.

-Y-

**Yu H and Talts JF.** 2003. Beta1 integrin and alpha-dystroglycan binding sites are localized to different laminin-G-domain-like (LG) modules within the laminin alpha5 chain G domain. *Biochem J.* 371 : 289-299.

**Yurchenco PD and Schittny JC.** 1990. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4 : 1577-1590.

-Z-

**Zen Q, Cottman M, Truskey G, Fraser R and Telen MJ.** 1999. Critical factors in basal cell adhesion mecleule/lutheran-mediated-adhesion to laminin. *J Biol Chem.* 274 : 728-734.

## ANNEXES

### ***1) COÛT EXPERIMENTAL***

#### **Institut Clinique de la Souris de Strasbourg**

Hébergement : 1,03€ HT/*souris* soit 3X donc 3,09€ HT/test

Perfusion de billes : 47,44€ HT/*souris* soit 3X donc 142,32€ HT/test

Prélèvement (reins) : 26,15€ HT/*souris* soit 3X donc 78,45€ HT/test

Coût global de l'ICS : **223.86€ HT/expérience**

#### **SARL MEG Import/Export (10 à 20 échantillons)**

Taxe fuel 4,2% : 13,69€ HT

Carboglace : 24€ HT

Contrôle température : 75€ HT

Base de transport Strasbourg/Paris : 190€ HT

Coût du transport : **302.69€ HT soit 15,13 à 30,27€ HT/*souris***

#### **Isolement des glomérules**

Solution HBSS 1X : 2,47€ HT/test

Solution de collagénase 60X : 9,30€ HT/test

Solution DNase 100X : 6,60€ HT/test

Inhibiteur de protéase : 10,70€ HT soit 2X donc 21,40€ HT/test

Tamise cellulaire : 1,6€ HT soit 2X donc 3,2€ HT /test

Coût de l'expérience : **42,97€ HT/expérience**

#### **Immuno-Histo-Fluorescence**

Solution PBS 1X : 6,63€ HT soit 3X donc 19,90€ HT/test

Anticorps Lu : 0,20€ HT/test

Anti anticorps Lu : 0,18€ HT/test

Anticorps  $\beta$ 1 laminine: 0,20€ HT/test

Anti anticorps  $\beta$ 1 laminine : 0,18€ HT/test

Coût de l'expérience : **20.66€ HT/expérience**

### **Dosage des protéines**

Le réactif PIERCE BCA : 1,06€ HT/test

### **Co-précipitations des protéines**

Les fragments Fc : 0,90€ HT/test

Protéine A sepharose CL 4B : 1,62€ soit 3X donc 4.90€ HT/test

Inhibiteur de protéase : 10,70€ HT soit 2X donc 21,40€ HT/test

Coût de l'expérience : **27.20€ HT/expérience**

### **Électrophorèse des protéines**

Gel 3 à 8% Tris Acétate SDS : 18,10€ HT/test

Marqueur protéine Plus 3,50€ HT/test

Tris Acétate 20X : 3,33€ HT/test

Coût de l'expérience : **24,93€ HT/expérience**

### **Western blot**

Tampon Tris glycine 10X : 2.35€ HT/test

Marqueur protéine Plus 3,50€ HT/test

Lait demi-écrémé régilait (300g) : 0,05€ HT/test

ECL Plus western blotting détection : 7,8€ HT/test

Film Kodac 13 X 18cm : 2,64€ Ht/test

Rouge ponceau : 0,30€ HT/test

Coût de l'expérience : **13,14€ HT/expérience**

### **La spectrométrie de masse**

Préparation des échantillons : 25€ HT soit 6X donc 150€ HT/test

Mesures : 60€ HT soit 3X donc 180€ HT/test

Coût de l'expérience : **330€ HT/expérience**

## **II ) LES PRODUITS UTILISES**

### **Pour extraction de protéines glomérulaires (NP40 0,5%)**

Tris 20mM pH7,5  
NaCl 150mM  
MgCl<sub>2</sub> 1mM  
NP40 0,5%  
+ IP 1X, le jour de l'extraction

### **Pour extraction de la laminine (EDTA)**

Tris 50mM pH7,5  
NaCl 150mM  
EDTA 10mM  
NP40 1%  
Na Desoxycholate 0,05%  
+ IP 1X, le jour de l'extraction

### **Pour extraction de la laminine (BRIJ 97)**

Tris 20mM pH7,5  
NaCl 150mM  
MgCl<sub>2</sub> 1mM  
Octylglycoside 1%  
BRIJ 97 1%  
+ IP 1X, le jour de l'extraction

### **Tampon RIPA base 1X**

Tris 20mM pH7,5  
NaCl 150mM  
MgCl<sub>2</sub> 1mM

## **III ) MANIPULATION DE SOURIS**

Dans l'unité INSERM U665, il n'y a pas d'élevage de souris. Toutes les souris font partie de la lignée K99.6. Les souris sont élevées jusqu'à l'âge adulte à l'Institut Clinique des Souris (ICS) de Strasbourg. L'ICS est un organisme privé est organisé comme un laboratoire de technologie intégrée avec un service 5 plateformes très interactives. L'ICS est logé dans un établissement de 6000 m<sup>2</sup> avec une capacité d'abriter jusqu'à 70.000 souris et emploie 93 personnes consacrées à la production, de soins, et l'analyse des modèles de souris.

Pour diminuer le coût, on effectue nous même le génotypage des souris. Les souris sauvages et mutantes sont sélectionnées en fonctions des besoins des projets.

**Site : <http://www.ics-mci.fr>**