



ELSEVIER

ARTICLE ORIGINAL

La protéine adaptatrice Lnk module l'activation des cellules endothéliales

The adaptor protein Lnk modulates endothelial cell activation

Juliette Fitau, Gwénola Bouliday, Flora Coulon, Béatrice Charreau *

Institut national de la santé et de la recherche médicale, UMR 643 « Immunointervention en allo et xénotransplantation » et institut de transplantation et de recherche en transplantation (ITERT), CHU Hôtel-Dieu, 30, boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France

Reçu le 29 mars 2005 ; accepté le 20 juin 2005

MOTS CLÉS

Cellules endothéliales ;
Lnk ;
Signalisation intracellulaire ;
PI3-kinase ;
Inflammation

KEYWORDS

Endothelial cells;
Lnk;
Intracellular signalling;
PI3-kinase;
Inflammation

Résumé La protéine Lnk est une molécule adaptatrice impliquée dans des mécanismes de régulation de l'activation et de la différenciation des lymphocytes et des plaquettes. Nous avons montré précédemment que Lnk est aussi exprimée et régulée dans les cellules endothéliales (CE) en réponse au *tumor necrosis factor alpha* (TNF α). Pour évaluer le rôle de la protéine Lnk dans les CE, nous avons construit et utilisé un adénovirus recombinant pour faire surexprimer Lnk dans des cultures primaires de CE. Nos résultats indiquent que la surexpression de Lnk réduit de façon significative l'activation endothéliale reflétée par la diminution de l'expression de *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) en réponse au TNF α . Par western blot, nous avons montré que Lnk n'a pas d'effet significatif sur la phosphorylation de l'inhibiteur naturel de NF κ B, I κ B α et ne modifie pas la dégradation d'I κ B α mais est associée à une expression persistante, de la forme phosphorylée (sur la sérine 473) de la kinase Akt, conséquence de l'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase). L'ensemble de ces résultats suggère que Lnk pourrait agir comme un régulateur négatif de l'activation impliquant la voie PI3-kinase.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Abstract Lnk is an adaptor protein involved in B lymphocytes and platelet differentiation and in T lymphocyte activation. We previously reported on Lnk expression and regulation in endothelial cells (ECs) upon activation. In the present study, the involvement of Lnk in the tumor necrosis factor alpha (TNF α) pathway was investigated in vitro through Lnk overexpression in primary cultures of human endothelial cells. Using a recombinant adenovirus encoding human Lnk, we first demonstrated that Lnk overexpression does not induce vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) suggesting that Lnk does not promote ECs activation. However, Lnk overexpression significantly reduced TNF α -mediated expression of VCAM-1 (at mRNA and protein levels) in activated EC as compared

Abréviations : CE, cellule endothéliale ; GFP, *green fluorescent protein* ; HUVEC, *human umbilical vein endothelial cell* ; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase ; TNF α , *tumor necrosis factor alpha* ; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr (B. Charreau).

with controls. Western blot analysis showed that Lnk overexpression in HUVEC was associated with phosphorylation of Akt kinase (at Ser 473) with no effect on I κ B α , the specific inhibitor of NF κ B, indicating that Lnk promotes activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway in ECs. Altogether, these results suggest that, in ECs, Lnk may participate to a regulatory pathway involving the PI3-kinase and modulating the inflammatory response.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Introduction

La protéine Lnk appartient avec APS (*adaptor protein with a PH and SH2 domain*) et SH2-B (*Src homology 2-B*) à une famille de molécules régulatrices dites « adaptatrices ». Ces trois molécules présentent des similarités de structure. Elles possèdent en partie N-terminale une région riche en proline, un domaine d'homologie à la plekstrine (domaine PH), un domaine SH2 (*Src homology 2*) et, en partie C-terminale, des sites de tyrosine-phosphorylation [1]. Ces particularités structurales confèrent à ces protéines un rôle dans la transduction du signal. Ces molécules « adaptatrices » ne possèdent pas d'activité enzymatique ; elles participent à la signalisation intracellulaire en s'impliquant dans des interactions protéines-protéines [2,3]. Il a été montré que Lnk joue, comme APS, un rôle de régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T. La surexpression de Lnk dans des lignées T (Jurkat) entraîne une inhibition de 60 % de l'activation du facteur de transcription NF-AT [4]. Lnk est plus fortement exprimée par les lymphocytes B que les lymphocytes T et son rôle dans ces deux populations lymphocytaires semble différent. Alors que Lnk ne semble pas indispensable au développement normal des thymocytes, cette protéine adaptatrice participe au contrôle de la maturation des cellules B [5,6]. Malgré les récentes démonstrations de l'implication de Lnk dans le développement ou la signalisation des lymphocytes [7] et des plaquettes [8], le rôle de cette protéine adaptatrice demeure mal connu.

Nous avons montré récemment que l'expression de Lnk est fortement augmentée dans les cellules endothéliales (CE), en réponse au *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) [9]. C'est, à notre connaissance, la première description de l'expression de Lnk dans un type cellulaire autre que les lymphocytes B et T et de la régulation transcriptionnelle de cette protéine dans un contexte inflammatoire.

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer le rôle de Lnk dans les CE et, en particulier, à définir si son induction au cours de l'activation endothéliale est associée à une régulation positive ou négative comme cela a été montré respectivement pour les lymphocytes B et T. Nos résultats

indiquent que la surexpression de Lnk, obtenue par transduction à l'aide d'un adénovirus recombinant, réduit de façon significative l'activation endothéliale reflétée par la diminution de l'expression de VCAM-1, en réponse au TNF α suggérant que Lnk pourrait agir comme un régulateur négatif de l'activation.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire et activation par le TNF α

Les cellules endothéliales primaires issues de cordons ombilicaux (HUVEC) ont été cultivées dans du milieu *endothelial cell growth medium* (ECGM), supplémentées en ECGS/H (0,4 %), hydrocortisone (1 μ g/ml), hbFGF (1 ng/ml), hEGF (0,1 ng/ml) amphotéricine B (50 ng/ml) et gentamicine (50 μ g/ml) (Promocell[®], Heidelberg, Allemagne) et 10 % de sérum de veau fœtal. Les HUVEC, infectées ou non, ont été incubées 12 heures avec du milieu ECGM 10 % SVF et déprivées en supplément puis activées avec du TNF α recombinant humain (100 U/ml) pendant six heures ou bien pendant 5, 20 ou 60 minutes.

Adénovirus recombinant

L'ADNc codant pour la molécule Lnk nous a été gracieusement donné par le Dr Jun Hayashi (School of Pharmacy, University of Maryland, Baltimore, MD, USA). L'ADNc Lnk a été inséré dans une cassette d'expression contenant un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) suivi de l'ADNc codant pour la GFP et l'ensemble est sous le contrôle du promoteur CMV. Cette construction permet l'expression d'un transcrit commun, mais induit la traduction de deux molécules distinctes : Lnk et la GFP. Les adénovirus recombinants AdTrackGFP (AdGFP) et AdLnk ont été produits dans les cellules humaines 293 par le laboratoire de thérapie génique (Nantes, France) et selon la technique décrite [10]. Les HUVEC à 75 % de confluence ont été infectées par l'AdGFP avec une multiplicité d'infection (M.O.I.) de 10 ou par l'AdLnk avec 500 de M.O.I.

RT-PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux ont été extraits par du TRIzol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), traités à la Dnase (Roche, Indianapolis, IN, USA) et les ARNm ont été rétrotranscrits en utilisant la reverse transcriptase MMLV-1 (Invitrogen, France). Les PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées avec un système de détection GenAmp 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et utilisant des sondes humaines spécifiques de VCAM-1 (réf. : Hs00365486 m1) et de l'HPRT (réf. : Hs99999909 m1) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Immunodétection par western blot

Après lyse des cellules avec une solution de NaCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM ; cocktails inhibiteurs de protéases (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) ; NP-40 1 %, les protéines (10-20 µg par puits) sont séparées par électrophorèse (SDS-PAGE) puis transférées sur membranes de nitrocellulose (ECL Hybond™; Amersham Biotech, Little Chalfont, UK). Les membranes sont lavées 30 minutes avec un tampon TBS/0,1 % Tween20 (TBST) puis saturées pendant deux heures en TBST contenant 5 % de BSA (Sigma). L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée à 4 °C pendant une nuit. Après plusieurs lavages en TBST, l'anticorps fixé est révélé avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yveline, France) ou encore anti-chèvre (Serotec, Cergy-Saint-Christophe, France) couplé à la peroxydase. Les membranes sont révélées avec le système de détection ECL™ (Amersham Biotech). Les anticorps utilisés pour cette étude sont : anticorps polyclonal de lapin anti-Akt, anti-Phospho-Akt (Ser473), anti-P-IkBα (Ser32) et anti-IkBα (1/1000) (Cell Signaling Technology), polyclonal de chèvre anti-Lnk (1/500) (Serotec) et monoclonal anti-VCAM-1 (1/100) (E-10) (Santa Cruz Biotechnologies, inc, Californie, USA). Un anticorps monoclonal anti-Tubuline (MERCK Eurolab, Val-de-Fontenay, France) a été utilisé après déshybridation des membranes afin de normaliser les quantités de protéines. La quantification des blots par densitométrie a été réalisée grâce au Kodak Digital Science Image Station 440 CF et au logiciel Kodak Digital Science Image Analysis 1D®.

Résultats

Surexpression de Lnk dans les cellules endothéliales humaines

Pour évaluer le rôle de la protéine Lnk dans les CE, nous avons construit et utilisé un adénovirus recom-

binant (AdLnk) pour faire surexprimer Lnk dans des cultures primaires de CE. Dans ce vecteur viral, Lnk est sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV) et son expression est associée à l'expression de la protéine GFP (protéines distinctes). La Fig. 1 montre que l'AdLnk utilisé à 500 M.O.I. induit de façon efficace l'expression de la protéine adaptatrice reflétée par l'expression de la protéine reporter GFP (Fig. 1A). L'expression forte de Lnk dans les cellules transduites a été confirmée par RT-PCR (résultats non montrés) et par western blot au moyen d'un anticorps spécifique de Lnk (Fig. 1B). L'expression de Lnk dans les CE non transduites ou les CE infectées avec l'adénovirus témoin (AdGFP) est faible.

Lnk diminue l'induction de la molécule VCAM-1 dans les cellules endothéliales activées

Afin d'étudier l'effet de l'expression de Lnk sur la voie d'activation du TNFα, les CE ont été transduites avec l'AdLnk, ou l'AdGFP comme témoin, puis incubées pendant six heures avec du TNFα. L'analyse transcriptionnelle, réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel, indique tout d'abord que la surexpression de Lnk n'induit pas l'expression de VCAM-1 dans les cellules quiescentes (Fig. 2A,B). Lorsque les CE sont activées par le TNFα, le taux de transcrits pour VCAM-1 augmente et la protéine VCAM-1 devient détectable par western blot (Fig. 2B). L'infection des CE par l'adénovirus témoin (AdGFP) n'affecte pas l'expression de VCAM-1 (quantités de transcrits et protéines similaires aux CE non infectées). En revanche, l'expression de Lnk se traduit par une diminution de l'expression transcriptionnelle (de l'ordre de 50 %) qui a pour conséquence une forte réduction de la protéine VCAM-1 dans les CE activées (Fig. 2B).

Lnk : une protéine adaptatrice impliquée dans l'activation de la voie PI3-kinase

Nos résultats suggèrent que Lnk intervient dans la voie de signalisation du TNFα lors de l'activation des cellules endothéliales. Dans les CE, le TNFα aboutit à l'activation de la voie NFκB, responsable de la régulation rapide et transitoire de nombreux médiateurs de l'inflammation (incluant molécules d'adhésion, cytokines, chimiokines, facteurs de la coagulation, molécules du CMH) [11] ainsi qu'à l'activation de la voie PI3-kinase impliquée dans les mécanismes de survie et de prolifération endothéliale [12]. Considérant à la fois la structure et les propriétés présumées de Lnk, nous avons testé

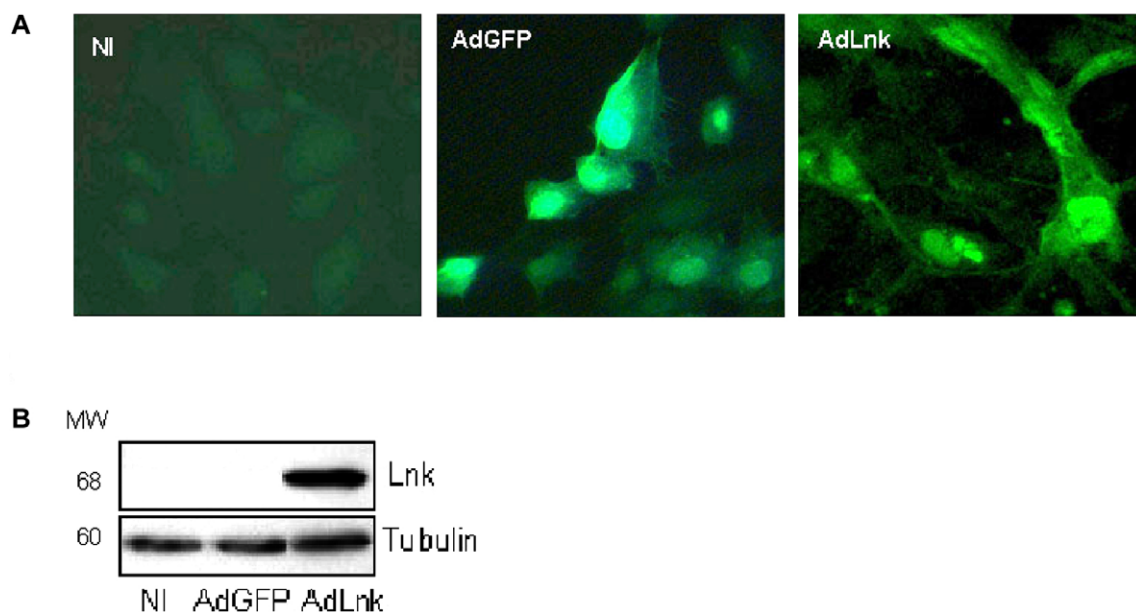


Figure 1 Expression de l'adénovirus recombinant AdLnk dans les HUVEC. Les cellules ont été infectées par l'AdGFP ou l'AdLnk. A. Expression de la GFP dans les HUVEC transduites ou non (NI) par l'AdGFP ou l'AdLnk montrant que l'expression de la GFP est concomitante à l'expression de Lnk. B. Expression de Lnk dans les HUVEC non infectées (NI) ou infectées par l'AdGFP (témoin) ou l'AdLnk analysé par western blot avec un anticorps spécifique de Lnk comparé à celui de la tubuline, utilisé comme témoin de quantité.

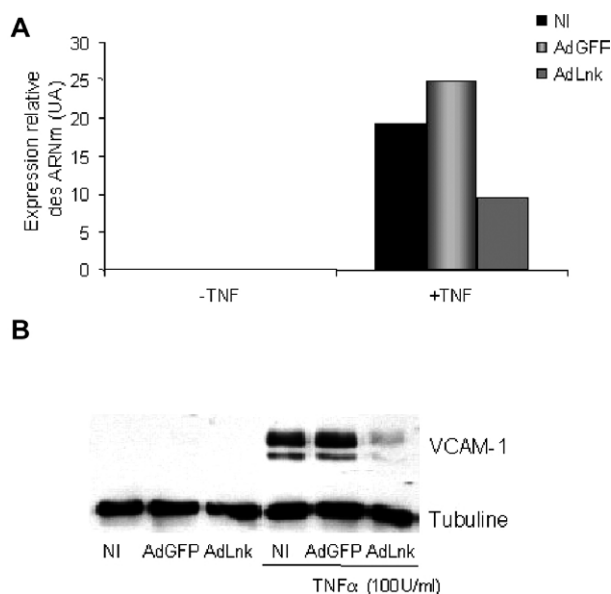


Figure 2 Effet de Lnk sur l'expression de VCAM-1 dans les HUVEC activées par du TNFα.

Les HUVEC non infectées (NI) ou infectées par l'AdGFP ou l'AdLnk ont été activées par du TNFα (100 U/ml) pendant six heures. A. Expression des ARNm de VCAM-1 par RT-PCR quantitative en temps réel. Le niveau d'expression des ARNm a été normalisé par rapport à l'HPRT et est exprimé en unités arbitraires. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. B. Expression protéique de VCAM-1 analysée par western blot et comparée à celle de la tubuline, utilisée comme témoin de quantité. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes.

l'hypothèse que Lnk pourrait servir d'adaptateur pour l'activation de la PI3-K par le TNFα. Pour cela, nous avons infecté des CE avec l'AdLnk, ou l'AdGFP comme témoin, puis incubé les cellules avec du TNFα de 0 à 60 minutes pour analyser par western blot, l'activation des voies NFκB et PI3-kinase. Les résultats présentés (Fig. 3) montrent que Lnk n'a pas d'effet significatif sur la phosphorylation de l'inhibiteur naturel de NFκB, IκBα et ne modifie pas la dégradation d'IκBα. En effet, dans les trois conditions étudiées (NI, AdGFP et AdLnk), l'activation des cellules par le TNFα induit une phosphorylation rapide de IκBα dès cinq minutes puis de nouveau après 60 minutes. Cette phosphorylation est associée en même temps à une dégradation progressive de la protéine totale IκBα entre 5 et 60 minutes d'activation avec une disparition quasi totale à 20 minutes. Cependant, l'expression de Lnk est associée à une forte expression au niveau basal, de la forme phosphorylée (sur la sérine 473) de la kinase Akt (PKB) qui est persistante après activation par le TNFα. La phosphorylation de Akt traduit l'activation de la voie PI3-kinase. Si l'effet de Lnk sur l'activité NFκB reste à déterminer, nos résultats suggèrent que l'expression de Lnk soit suffisante pour activer la voie de la PI3-kinase/Akt.

Conclusion

Nous avons montré que la surexpression de Lnk dans des CE primaires réduit de façon significative l'acti-

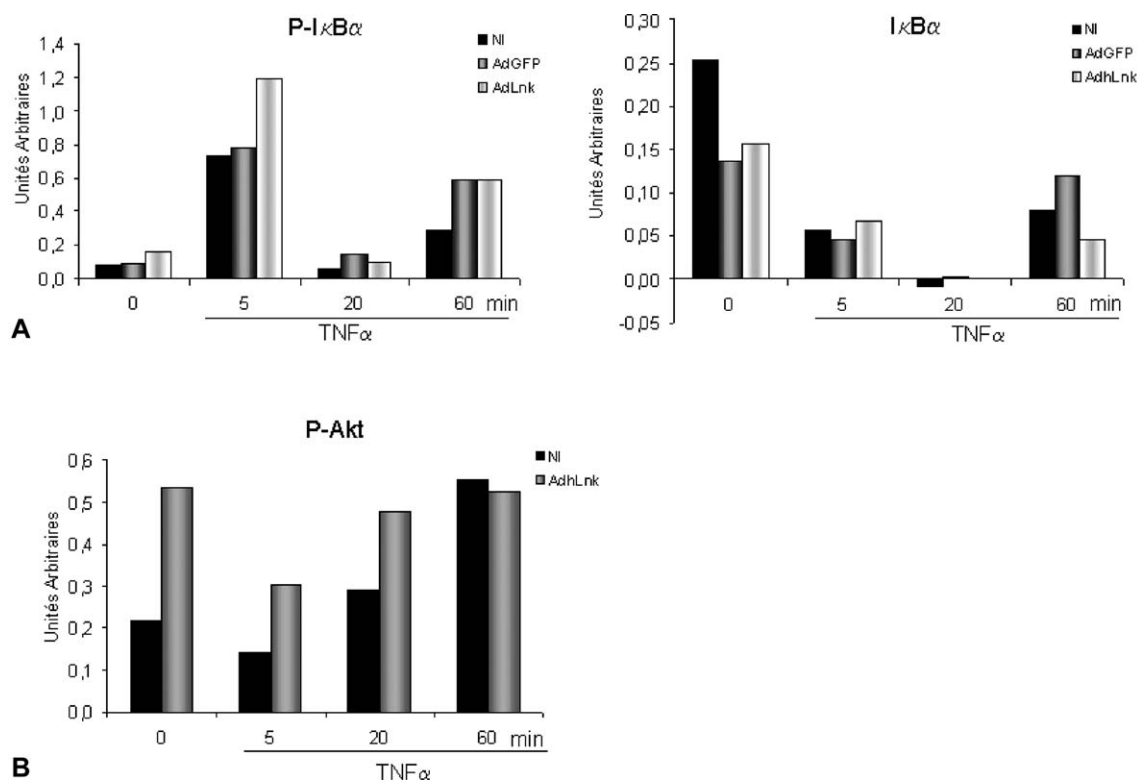


Figure 3 Induction de la voie PI3-K/Akt dans les HUVEC surexprimant Lnk.

Les HUVEC non infectées (NI) ou infectées par l'AdGFP ou l'AdLnk ont été activées par du TNF α 5, 20 et 60 minutes. L'activation de la voie NF κ B et de la voie Akt a été analysée par western blot avec des anticorps spécifiques (A) de P-I κ B (Ser32), de I κ B et (B) de P-Akt (Ser473). L'expression de ces protéines phosphorylées a été normalisée par rapport à l'expression de la tubuline pour P-I κ B et I κ B et par rapport à Akt total pour P-Akt. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires et sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

vation endothéliale en diminuant l'expression de VCAM-1 en réponse au TNF α . Le TNF α active différentes voies de signalisation dans la CE dont : la voie du facteur de transcription NF κ B, ainsi que la voie de la PI3-kinase/Akt (ou PKB). Le facteur de transcription NF κ B joue un rôle central dans les CE puisqu'il active la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation. À l'état basal, NF κ B est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B α . La phosphorylation et la dégradation de I κ B α induite par la liaison du TNF α à son récepteur permettent l'activation et la translocation de NF κ B dans le noyau et ainsi la transcription, entre autres, de la molécule d'adhérence VCAM-1 [13]. Par ailleurs, le TNF α active la voie PI3-kinase/Akt qui est également impliquée dans la régulation de l'activation endothéliale [12]. Il a été montré que Akt activée pouvait entraîner l'activation de NF κ B [14]. Nous montrons ici que Lnk ne modifie pas la phosphorylation ni la dégradation de I κ B α , mais induit l'activation de la voie PI3-kinase reflétée par la phosphorylation de la kinase Akt.

Cette activation observée précocement (dès cinq minutes d'activation) aurait comme conséquence une modification de la transcription et de la traduction de VCAM-1, événement en aval de la cascade

de signalisation. De plus, VCAM-1 n'est pas exclusivement régulée par le facteur de transcription NF κ B, mais fait intervenir d'autres facteurs comme AP-1 qui pourrait être régulé par la voie PI3-kinase/Akt. Les mécanismes de régulation négative Lnk-dépendante, responsables de la diminution de VCAM-1 et passant par l'activation de Akt, sont actuellement à l'étude. Nous supposons que l'activation d'Akt, capable de réguler l'homéostasie cardiovasculaire par la voie du NO, pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activation endothéliale et cela de manière indépendante de la voie NF κ B.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère que Lnk participe à une voie de régulation négative des CE activées par le TNF α via la voie de signalisation PI3-kinase/Akt et indépendamment de la voie NF κ B.

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien de la Société française de néphrologie.

Les auteurs remercient la plateforme de production de vecteurs de l'université de Nantes supportée par l'Association française contre les myopa-

thies (AFM) pour la production des vecteurs adénoviraux : AdGFP et AdLnk.

Références

- [1] Kubo-Akashi C, Iseki M, Kwon SM, Takizawa H, Takatsu K, Takaki S. Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:356.
- [2] Huang X, Li Y, Tanaka K, Moore KG, Hayashi J. Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11618.
- [3] Takaki S, Watts JD, Forbush KA, Nguyen NT, Hayashi J, Alberola-Ila J, et al. Characterization of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J Biol Chem* 1997;272:14562.
- [4] Li Y, He X, Schembri-King J, Jakes S, Hayashi J. Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol* 2000;164:5199.
- [5] Takaki S, Sauer K, Iritani BM, Chien S, Ebihara Y, Tsuji K, et al. Ms. Control of B cell production by the adaptor protein Lnk. Definition of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity* 2000;13:599.
- [6] Rudd C. Es. Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Sci STKE* 2001; 2001: PE1.
- [7] Takaki S, Tezuka Y, Sauer K, Kubo C, Kwon SM, Armstead E, et al. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein. *J Immunol* 2003;170:703.
- [8] Tong W, Lodish H. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* 2004;200:569.
- [9] Bouliday G, Coulon F, Fraser CC, Souillou JP, Charreau B. Transcriptional up-regulation of the signaling regulatory protein Lnk in activated endothelial cells. *Transplantation* 2002;74:1352.
- [10] He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509.
- [11] Pober J. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl 3):S109.
- [12] Madge LA, Pober J. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkB in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:15458.
- [13] Gerritsen ME, Bloor C. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993;7:523.
- [14] Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner D. NFkB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401:82.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®