



HAL
open science

La phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Maturation protéolytique et rôles fonctionnels

Jemel Ikram

► **To cite this version:**

Jemel Ikram. La phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Maturation protéolytique et rôles fonctionnels. Biochimie [q-bio.BM]. Université Nice Sophia Antipolis, 2009. Français. NNT : . tel-00496969

HAL Id: tel-00496969

<https://theses.hal.science/tel-00496969>

Submitted on 2 Jul 2010

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS - UFR Sciences
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences
De L'Université de Nice-Sophia-Antipolis
Mention Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue par

Ikram JEMEL

La phospholipase A₂ sécrétée de groupe X :
Maturation protéolytique et Rôles fonctionnels

Thèse dirigée par le Dr Gérard Lambeau

Soutenue le **16 Décembre 2009** devant le jury composé de :

Pr. Michel Lazdunski
Dr. Lhousseine Touqui
Dr. Frédéric Carrière
Dr. Gérard Lambeau

Président
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS UNSA UMR 6097

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à exprimer mon immense gratitude envers le Dr. **Gérard Lambeau** pour m'avoir contactée, sélectionnée et accueillie au sein de son laboratoire ainsi que pour la confiance et les nombreuses discussions qu'il m'a accordées tout au long de mon séjour dans son laboratoire. Je le remercie également pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, son esprit perfectionniste et ses compétences scientifiques, et pour le thème passionnant qu'il m'a confié. Qu'il trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur **Michel Lazdunski**, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements vont également à Messieurs les Docteurs **Frédéric Carrière** et **Lhoussaine Touqui** pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements plus particulièrement à Madame **Christine Payre** pour sa gentillesse, son soutien moral pendant les moments difficiles, sa compréhension et ses qualités humaines qui m'ont beaucoup marquées.

Je suis très reconnaissante à Madame le Docteur **Dominique Douquet** pour ses fructueux conseils au cours de la réalisation de ce travail, l'aide considérable qu'elle m'a apportée et ses encouragements.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à Madame le Docteur **Christelle Coatrieux** pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son amabilité, et Mademoiselle **Khaoula Chargui** pour son aide et son soutien.

Je remercie également **Fanny Surrel**, **Carine Mounier**, et **Christophe Girard** pour leur gentillesse et les conseils scientifiques qu'ils m'ont apportés.

Je suis très reconnaissante aussi à **Sabine Scarzello** et **Anne-Sophie Dabert-Gay** qui ont aimablement réalisé les tests de spectroscopie de masse.

Mes vifs remerciements vont aussi à tous les membres du laboratoire et en particulier à ceux de **l'étage R+2** pour leur sympathie et leurs encouragements qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

Ikrām

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I. Généralités sur les phospholipases A2.....	1
II. Les phospholipases A2 sécrétées (sPLA2).....	2
1. Propriétés moléculaires	2
2. Propriétés enzymatiques.....	6
3. Les inhibiteurs des sPLA2.....	9
4. Production recombinante des sPLA2	10
5. Les récepteurs des phospholipases A2 sécrétées.....	11
5.2. Le récepteur de type M.....	11
5.3. Autres protéines de liaison des sPLA2.....	13
6. Fonctions, rôles physiologiques et physiopathologiques	13
6.1. Libération de l'acide arachidonique et production de médiateurs lipidiques	14
6.2. Fonctions physiologiques et physiopathologiques des sPLA2.....	16
III. La phospholipase A2 sécrétée de groupe X (sPLA2-X).....	25
1. Clonage	25
2. Propriétés enzymatiques et de liaison au récepteur sPLA2 de type M.....	26
3. Distribution tissulaire et fonctions physiologiques de la sPLA2-X.....	26
3.1. Distribution tissulaire et régulation transcriptionnelle :	26
3.2. Rôles physiologiques et physiopathologiques :	28
4. Caractéristiques structurales.....	29
5. Etude de la maturation de la sPLA2-X.....	32
MATERIELS ET METHODES.....	36
I. Matériels	36
II. Production recombinante des formes proenzymes humaines et murines de groupe X.....	38
1. Clonage	38
b) Construction des vecteurs d'expression ProhGX/pAB3 et ProhGX-HA/pAB3	38
c) Construction des mutants ponctuels de PromGX dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 zéo+	38
2. Production des protéines recombinantes	39
III. Etude de la maturation de la proPLA2-X.....	41
1. Etude <i>in vitro</i>	41
1.1 Maturation des protéines recombinantes par des protéases purifiées.....	41
1.2 Maturation dans des cellules HEK 293 transfectées	41
a) Transfection dans les cellules HEK 293.....	41
b) Dosage d'activité sPLA2	42
c) Western blot.....	42
d) Immunoprécipitation.....	43
e) TR-FIA.....	43
f) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF	44
g) Profil d'inhibition de la maturation dans les clones stables des cellules HEK.....	45
h) Prolifération cellulaire par incorporation de la thymidine tritiée	45
i) Libération d'acide arachidonique	45
1.3 Maturation des protéines recombinantes par différents surnageants conditionnés	46
1.4 Profil d'inhibition de la maturation par des inhibiteurs spécifiques de protéases	47
1.5 Maturation dans les kératinocytes humaines : HACAT	47
2. Etude <i>in vivo</i> de la maturation des différents tissus de souris.....	47
RESULTATS.....	49
A. Etude de la maturation de la sPLA2-X.....	49
I. Etude <i>in vitro</i>	50
2. Maturation dans des cellules transfectées (HEK293).....	56
3. Etude de la maturation par différents surnageants et milieux extracellulaires	60
a) Surnageant de culture cellulaire des HEK293 sauvages	60
b) Surnageant de culture cellulaire des LOVO sauvages	66
c) Surnageants des lavages broncho-alvéolaires (BAL) et des spermatozoïdes de souris.....	72
4. Maturation dans des cellules exprimant la sPLA2-X de façon endogène (HACAT).....	77
II. Etude <i>in vivo</i> de la maturation de la sPLA2-X dans les tissus de souris	78

III. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du polymorphisme pour la phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Article 2	84
B. ETUDE FONCTIONNELLE DE LA sPLA2-X ET MATURATION	85
I. Rôle de la sPLA2-X dans la prolifération des cellules d'adénome colique murin C26 via la production de différents médiateurs lipidiques : Article 3	85
II. Les propriétés anti-malariales de la phospholipase A2 de groupe X et IIF	87
Article 4 : en préparation.....	87
III. Implication de la sPLA2-X dans la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris : Article 5	89
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	91
A. ETUDE DE LA MATURATION DE LA sPLA2-X.....	91
I. Etude in vitro	91
1. Maturation dans des cellules transfectées (HEK 293) Article 1	91
2. Etude de maturation par différents surnageants cellulaires	91
II. Etude in vivo	92
III. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du polymorphisme pour la phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Article 2	93
B. ETUDE FONCTIONNELLE DE LA sPLA2-X ET MATURATION	94
I. Etude de la prolifération des cellules côlon-26 d'adénocarcinome colique murin induite par la sPLA2-X : article 3.....	94
II. Les propriétés anti-malariales de la phospholipase A2 de groupe X et IIF : Article 4	94
III. Implication de la sPLA2-X dans la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris : Article 5	96
Conclusion	97

INTRODUCTION

I. Généralités sur les phospholipases A2

Les phospholipases A2 constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides (PL) en position sn-2, libérant un acide gras et un lysophospholipide (1) (Figure 1).

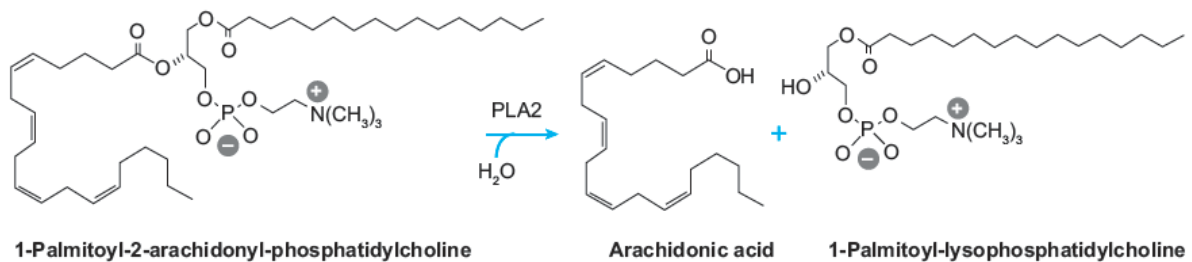


Figure 1 Exemple de réaction catalysée par les PLA2

Ces enzymes ont d'abord été découvertes dans les venins de serpent et d'abeille puis dans les tissus de mammifères et les plantes (2-3).

La classification des PLA2 devient très compliquée et est basée selon les auteurs en fonction de la localisation cellulaire (intracellulaire lysosomale ou sécrétée) ou de l'homologie structurale (mécanisme catalytique, spécificité enzymatique, dépendance de l'activité PLA2 au calcium, ponts disulfures,...etc). Chez les mammifères, on distingue aujourd'hui une variété de phospholipases A2 sécrétées (sPLA2) et intracellulaires (2, 4, 5, 6, 7).

⇒ les PLA2 intracellulaires comprennent :

- les PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium ou non (cPLA2, groupe IVA, B, C, D, E, F)
- les PLA2 intracellulaires indépendantes du calcium (iPLA2, groupe VIA, B, C, E, F)
- les PLA2 intracellulaires indépendantes du calcium de type lysosomale (iPLA2, groupe XV)
- les PLA2 intracellulaires spécifiques du PAF (Platelet-Activating Factor Acétylhydrolases, PAF-AH, groupe VIII)

⇒ les PLA2 sécrétées (sPLA2) comprennent :

- les PLA₂ sécrétées « classiques » (sPLA₂, groupe I/II/III/V/X/XIIA/XIIB)
- les PLA₂ sécrétées de type PAF-AH (groupe VII, aussi appelé lipoprotein-associated PLA₂)

Les cPLA₂ présentent des hauts poids moléculaires (60-85kDa) et sont impliquées dans la signalisation cellulaire en contrôlant la libération d'acide arachidonique et des médiateurs lipidiques dérivés de ce dernier (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes) (8). Les iPLA₂ sont aussi des enzymes de hauts poids moléculaires (85-90 kDa) et interviennent dans le métabolisme des phospholipides membranaires (9). Elles pourraient également participer à la libération d'acide arachidonique et à la signalisation cellulaire (9). Les PAF-AH constituent une famille de PLA₂ intracellulaires et sécrétées qui clivent en position sn-2 spécifiquement les acides gras ayant une chaîne carbonée courte, leur substrat majeur naturel étant le PAF (10, 11). Comme les cPLA₂ et iPLA₂, ces enzymes ont un motif catalytique de type GX SXG, mais ont en fait peu homologie de séquence avec les PLA₂ intracellulaires et plus d'homologie avec les lipases neutres (12).

Les phospholipases A₂ sécrétées (sPLA₂) « classiques » constituent une famille d'enzymes qui ont une structure globale et un mécanisme catalytique très conservé. Elles présentent cependant des particularités structurales qui leurs confèrent des propriétés enzymatiques et fonctionnelles différentes.

II. Les phospholipases A₂ sécrétées (sPLA₂)

1. Propriétés moléculaires

Les sPLA₂ sont présentes chez les mammifères, les venins, les plantes, les virus et les bactéries (4, 7). Les sPLA₂ de mammifères ont toutes des caractéristiques communes, notamment une structure compacte très riche en ponts disulfures, ce qui leurs confère une grande stabilité et rigidité. Elles possèdent aussi un faible poids moléculaire (13 à 19 kDa) (Tableau 1). Cependant, ces protéines ont moins de 50% d'identité entre elles (2).

On distingue différents groupes de sPLA₂, dont les groupes I, II, III, V, X et XII présents chez les mammifères. Les sPLA₂ des groupes I, II, V et X sont proches, ce qui définit la collection I/II/V/X. Les groupes III et XII sont plus distants (Figure 2).

La sPLA2 de groupe IIF présente aussi des particularités structurales puisqu'elle possède une extension C-terminale plus longue de 23 acides aminés, riche en proline et avec une cystéine libre (17, 22). La présence de cette cystéine suggère une structure quaternaire homodimérique ou hétérodimérique, qui pourrait rappeler celle de certaines sPLA2 de venins de serpents (2, 23).

La sPLA2 de groupe III a une structure particulière puisque le cDNA code pour une protéine de 55 kDa avec un domaine central (15 kDa) encadré de deux extensions N- et C-terminales (respectivement de 130 et 219 acides aminés) (24). Selon Murakami et al. la sPLA2 de groupe III subirait un clivage protéolytique supprimant ses extensions N- et C-terminales et laissant le domaine sPLA2 central actif (25) (Tableau 1). Ces domaines n'ont aucune homologie de séquence avec des protéines connues, mais on retrouve ces types d'extension dans certaines sPLA2 de groupe III de drosophile (24).

La sPLA2 de groupe V a été clonée en 1994 (16). Elle ne présente que 6 ponts disulfures et n'a pas les ponts disulfures spécifiques des groupes I et II, ni l'extension C-terminale du groupe II. Elle a donc été classée groupe V (26).

La sPLA2 de groupe X a été clonée en 1997 (27). Elle présente à la fois les caractéristiques structurales du groupe I (propeptide et pont disulfure entre les cystéines 11 et 77) et celles du groupe II (extension C-terminale impliquée dans un pont disulfure). Elle possède donc 8 ponts disulfures. Elle est produite sous forme d'une proenzyme activable *in vitro* par la trypsine (28). Les études sur cellules transfectées ont montré qu'une fraction de la sPLA2 de groupe X se retrouve dans le milieu extracellulaire sous forme mature sans le propeptide (27-28). La protéase responsable de cette maturation reste encore inconnue.

Les deux sPLA2 du groupe XII (XIIA et XIIB) sont homologues aux autres sPLA2 seulement dans le site actif et la boucle de liaison au calcium. Elles ont une masse moléculaire relativement élevée (18-19 kDa) et 7 ponts disulfures distincts des autres sPLA2 (29-30).

Les sPLA2 XIIA et XIIB présentent seulement 40% d'identité entre elles. De plus, la sPLA2 XIIB possède une mutation ponctuelle au site actif qui remplace l'histidine catalytique par une leucine, ce qui rend l'enzyme totalement inactive.

Enfin, l'otoconine-95 constitue un dernier membre de la famille sPLA2 (31-32). Comme la sPLA2 de groupe XIIB, cette protéine est catalytiquement inactive. Elle possède une masse moléculaire de 90-95 kDa contenant deux domaines sPLA2 avec des mutations au centre actif. Cette protéine est très spécifiquement exprimée dans l'oreille interne et pourrait jouer un rôle structural dans la formation et le maintien des otolithes.

Groupe	Propeptide	Masse moléculaire (kDa)	Ponts disulfures	Caractéristiques structurales
IB	7 aa	14,1	7	Boucle pancréatique
IIA	-	13,9	7	Extension C-terminal 7 aa
IIC	-	14,6	8	Extension C-term 7 aa
IID	-	14,3	7	Extension C-terminal 7 aa
IIE	-	13,9	7	Extension C-terminal 7 aa
IIF	-	16,8	7	Extension C-terminal 23 aa
III	-	16	5 (domaine central)	Extension N-terminal 130 aa et C-terminal 219 aa
V	-	13,8	6	Pas d'extension et pas de propeptide
X	11 aa	13,6	8	Extension C-terminal 8 aa
XIIA	-	18,7	7	Faible activité enzymatique
XIIB	-	19,7	7	Enzyme inactive

Tableau 1 : Propriétés structurales des différentes sPLA2 humaines. D'après (7).

site catalytique appelé domaine de liaison interfaciale. Il est constitué d'une quinzaine d'acides aminés basiques et hydrophobes principalement localisés dans les extrémités N- et C-terminales de la sPLA2. La diversité fonctionnelle des sPLA2 est expliquée, au moins en partie, par les différences subtiles de leur enzymologie interfaciale. Ces enzymes utilisent donc un mécanisme catalytique complexe comprenant deux étapes distinctes. Il y a d'abord adsorption de l'enzyme soluble dans l'eau (E) à l'interface lipidique (E^*) puis diffusion d'un phospholipide (S) dans le site catalytique de l'enzyme et clivage enzymatique (Figure 4). Cette étape catalytique est analogue à une réaction de Michaelis-Menten se déroulant en surface et non plus en solution. Les formes enzymatiques présentes à l'interface sont notées avec un astérisque (E^* , ES^*) afin de les différencier de la forme enzymatique E, soluble dans la phase aqueuse.

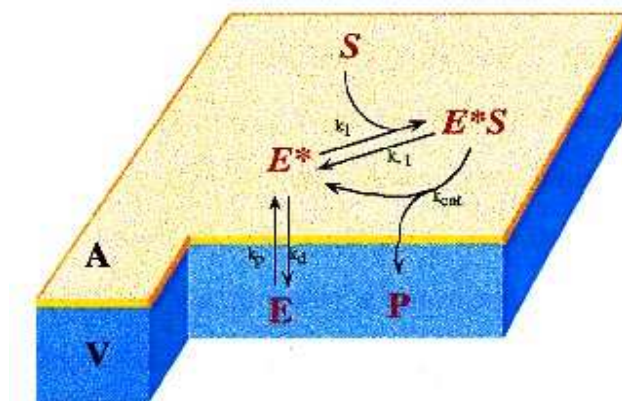


Figure 4 : Modèle de cinétique interfaciale. L'enzyme libre (E) s'adsorbe à l'interface (forme activée E^*) pour être au contact du substrat (S). L'hydrolyse a lieu à l'interface (A) et libère les produits (P). V (pour volume) représente la phase aqueuse, k_1 et k_{-1} sont les constantes d'équilibre de formation du complexe enzyme activé-substrat. Le K_{cat} est la constante de la réaction catalytique proprement dite. Le K_p est la constante de pénétration de l'enzyme dans l'interface et le K_d est la constante de désorption de l'interface (35).

Les caractéristiques cinétiques et interfaciales de la plupart des sPLA2 humaines et murines agissant sur des liposomes de phospholipides ont été étudiées (30, 36). Ces études montrent que les sPLA2 ont des activités spécifiques très variables et dépendantes de la nature du substrat. Ainsi, les sPLA2s de groupe V et X montrent une affinité élevée pour les phospholipides anioniques (PG) ou zwitterioniques comme la phosphatidylcholine (PC), qui est le principal constituant des membranes cellulaires (36-37). Les sPLA2 de groupe IB et IIA

sont les enzymes les plus actives sur des vésicules de phosphatidylglycérol (PG). Les sPLA2 de groupe IID, IIE et XIIA sont très peu actives quelle que soit la nature du substrat, tandis que la sPLA2-XIIB est totalement inactive. Les sPLA2 sont en général peu spécifiques pour la nature de l'acide gras en position sn-2. Cependant, la sPLA2 de groupe X apparaît un peu plus sélective pour l'acide arachidonique que pour l'acide oléique (27, 36), et sa sélectivité semble augmentée par le rapport cholestérol/phospholipide et sphingomyéline/phospholipide sur un substrat synthétique (liposomes) ou des lipoprotéines (38-39).

L'activité enzymatique des sPLA2 est strictement dépendante du calcium. Toutes les sPLA2 ont un site actif composé d'une boucle de liaison du calcium et d'une diade catalytique : histidine/acide aspartique. A l'inverse, les acides aminés constituant le site de reconnaissance interfaciale varie fortement entre les sPLA2, ce qui explique la spécificité de leurs propriétés enzymatiques. Le site de liaison interfaciale contient environ 15 acides aminés dont la nature polaire, basique ou hydrophobe, va déterminer la force de l'interaction entre la sPLA2 et les phospholipides. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que le nombre et la localisation des résidus tryptophanes hydrophobes présents dans le site de reconnaissance interfaciale étaient particulièrement importants pour la liaison aux phospholipides zwitterioniques comme le PC (40) : les sPLA2 de groupe V et X présentent respectivement un tryptophane en position 31 et 67, et sa mutation en alanine diminue l'affinité pour le PC (37, 41-42).

A l'inverse, les sites de reconnaissance interfaciale des sPLA2 de groupe I et II ne contiennent pas de tryptophanes et leur interaction avec le PC est faible. De plus, ces enzymes contiennent plusieurs résidus basiques cationiques qui favorisent l'adsorption sur des membranes anioniques comme le phosphatidylglycérol (PG) ou la phosphatidylsérine (PS), mais défavorisent leur interaction avec le PC (43).

3. Les inhibiteurs des sPLA2

De nombreux inhibiteurs de sPLA2 ont été identifiés (1, 44-46). Ces inhibiteurs sont importants pour déterminer quels types de sPLA2 sont impliqués dans des effets biologiques et obtenir de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Les premières molécules découvertes étaient des inhibiteurs non spécifiques qui agissent soit sur le substrat phospholipidique (par exemple la mépacrine et la quinacrine) soit sur l'histidine du site actif comme le bromure de bromophénacyle (1, 44-45) ou sur les acides aminés du domaine interfacial comme le manoalide (47-49).

La découverte de la sPLA2 humaine de groupe IIA (hGIIA) mais surtout sa surexpression dans de nombreuses pathologies inflammatoires a poussé plusieurs laboratoires pharmaceutiques à développer des inhibiteurs de type compétitif contre cette enzyme. Les premiers inhibiteurs compétitifs développés sont des analogues de phospholipides (amides et phosphonates sn-2) (44). Ces molécules inhibent faiblement la sPLA2 hGIIA.

Par la suite, d'autres inhibiteurs compétitifs de type indole ont été développés, notamment la molécule LY311727 qui constitue le premier inhibiteur très puissant de la sPLA2 hGIIA. Cette molécule a été développée par les laboratoires Lilly et a une affinité dans la gamme nanomolaire (45, 50). Depuis, plusieurs dérivés de cette molécule ont été générés comme le LY315920, LY329722, LY333013, Méthyl-indoxam et indoxam, et utilisés dans des modèles animaux et en essais cliniques (45, 51-53). Les études de spécificité sur l'ensemble des sPLA2 montrent cependant que ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques de la sPLA2 hGIIA, mais inhibent plusieurs sPLA2 de la collection I/II/V/X. Par exemple, le Mé-indoxam a une forte affinité pour les sPLA2-IIA, IIE et V et une plus faible pour les sPLA2 IIC, IID et X (36). La cristallographie des sPLA2 de groupe IIA et X humaines couplés au méthyl-indoxam a permis de définir les zones d'interactions de cet inhibiteur avec le site catalytique (54-55).

Avec une IC_{50} d'environ 30 nM, le LY329722 apparaît plus efficace sur la sPLA2-X que l'Indoxam (56). Plusieurs analogues du LY315920 ont été développés par Oslund et al. et se révèlent soit très spécifiques de la sPLA2 X, soit de type PAN inhibiteurs pour toutes les sPLA2 I/II/V/X (46).

Par ailleurs, de nouvelles molécules avec une structure triazepan-dione ont été identifiées comme des inhibiteurs spécifiques des sPLA2 V et X (57).

Néanmoins, aucune molécule n'est aujourd'hui capable d'inhiber l'activité enzymatique des sPLA2 des groupes III et XIIA.

Certains de ces inhibiteurs ont été utilisés dans des essais cliniques. Ils n'ont pas permis d'obtenir un effet thérapeutique dans l'asthme, le choc septique ou l'arthrite rhumatoïdale (45). Cependant, le LY315920 (varespladib ou A-002) apparaît intéressant dans son effet anti-athérosclérose (53, 58-59).

Compte tenu de la sélectivité d'action des différentes sPLA2 (cf ci-dessous), il apparaît nécessaire d'obtenir des inhibiteurs spécifiques pour chaque membre de la famille des sPLA2 de mammifères : ces molécules permettront de mieux définir les fonctions propres de chaque enzyme et devraient avoir un meilleur potentiel thérapeutique que les inhibiteurs ci-dessus dans différentes indications médicales, tout en limitant de potentiels effets secondaires.

4. Production recombinante des sPLA2

La production recombinante des sPLA2 reste une étape incontournable pour déterminer les propriétés structurales et moléculaires, et le rôle des différentes sPLA2s. Il est très difficile d'obtenir des quantités de sPLA2 natives à partir de cellules et ou de tissu naturels, hormis pour les sPLA2-IB et IIA. Par ailleurs, les sPLA2 sont très riches en ponts disulfures et la production de sPLA2 recombinante à partir d'*E.coli* nécessite une étape limitante de repliement *in vitro* au cours de laquelle les ponts disulfures doivent s'assembler correctement. De plus certaines sPLA2 sont N-glycosylées, pouvant nécessiter l'utilisation de systèmes de production reproduisant ces modifications post-traductionnelles (36).

La production recombinante peut être faite dans différents systèmes, comme les cellules de mammifères (60-62), le baculovirus ou les cellules d'insectes de drosophile S2 (36, 61, 63). Ces systèmes sont utilisés dans le cas des sPLA2-IIC et IID qui possèdent des modifications post-traductionnelles comme une N-glycosylation. Le système *Pichia pastoris* (64-65) ou la synthèse chimique peptidique (66-67) ont également été utilisés pour produire des sPLA2.

Le système le plus utilisé dans notre laboratoire et ailleurs est l'expression dans *Escherichia coli*. (36, 68-73). Avec ce système de production recombinante, il est possible d'obtenir plusieurs mg de sPLA2 par litre de culture. Après renaturation des protéines et dans certains cas clivage de la protéine de fusion, celles-ci sont purifiées par plusieurs étapes de chromatographie HPLC. La pureté et la qualité des protéines recombinantes purifiées sont analysées par gel de SDS-PAGE, spectrométrie de masse et dosage d'activité enzymatique.

5. Les récepteurs des phospholipases A2 sécrétées

Les sPLA2 de venins (vPLA2) de serpents exercent une multitude d'effets pharmacologiques. Elles peuvent être neurotoxiques, myotoxiques ou cardiotoxiques (74). Les effets biologiques et pathologiques induits par les vPLA2 ne peuvent pas être expliqués par la simple activité d'hydrolyse des phospholipides. Ceci est particulièrement évident dans le cas de certaines sPLA2 de venins de serpent qui sont catalytiquement inactives à cause d'une mutation au niveau du site actif, mais sont encore myotoxiques (75).

Deux types de récepteurs spécifiques pour les sPLA2 ont été identifiés, en utilisant, comme ligand, la neurotoxine OS2 du venin du serpent australien Taïpan (76-78).

5.1. Les récepteurs de type N

Les récepteurs N correspondent à une famille de protéines présentes en grande quantité dans le cerveau de rat, où ils ont d'abord été identifiés (76). Ces récepteurs sont également exprimés dans d'autres tissus comme le poumon, le foie, le cœur et le rein.

Dans le cerveau de rat, au moins deux classes de sites de liaison de très haute affinité pour OS2 ont été identifiés (76). Plusieurs vPLA2 neurotoxiques comme la taïpoxine, la crotoxine et la notexine lient les récepteurs N avec une haute affinité. Par opposition, les vPLA2 non neurotoxiques, comme OS1, se lient avec une faible affinité à ces récepteurs. Ces observations suggèrent un rôle important de ces récepteurs dans les effets neurotoxiques des vPLA2. Une corrélation assez significative existe entre la liaison de différentes vPLA2 aux récepteurs N et leur neurotoxicité (76).

Les récepteurs N n'ont pas encore été clonés, leurs structures moléculaires, leurs ligands endogènes et leurs rôles physiologiques sont de ce fait inconnus.

5.2. Le récepteur de type M

Il a d'abord été identifié dans une culture primaire de muscle squelettique de lapin (77, 79).

Le récepteur M est une protéine de 180 kDa présentant des propriétés de liaison distinctes de celles des récepteurs de type N. En effet, le récepteur M est capable de lier à la fois les sPLA2 toxiques comme OS2 et des sPLA2 non toxiques comme OS1 avec de très hautes affinités. Contrairement aux récepteurs N, ce récepteur ne lie pas la sPLA2 de venin d'abeille (77). Le récepteur M est organisé en 5 régions distinctes :

- un domaine N-terminal riche en cystéine de 140 acides aminés reliés par trois ponts disulfures. Son rôle dans le fonctionnement du récepteur reste non élucidé.

- un domaine fibronectine de type II dont la fonction physiologique est encore inconnue, mais qui permet la liaison du récepteur au collagène (80). Ce domaine existe aussi dans d'autres protéines (la fibronectine, le collagène de type IV, le précurseur du facteur de coagulation XII et le récepteur du mannose-6 phosphate).
- une région centrale contenant 8 domaines distincts de reconnaissance des sucres (CRD). Les domaines CRD sont capables de lier les sucres dans les lectines de façon dépendante du calcium (lectines de type C). La liaison du récepteur M avec les sPLA2 se fait au niveau du domaine CRD5 mais sans implication d'une éventuelle fonction lectine (81).
- un seul domaine transmembranaire suivi d'une courte région C-terminale intracellulaire, qui présente notamment un motif d'internalisation NPXY (82).

La distribution tissulaire du récepteur M est très variable selon les espèces. Le récepteur M humain est abondamment exprimé dans les reins et à plus faibles niveaux dans le placenta, les poumons et le muscle squelettique (83). Chez la souris, il est exprimé majoritairement dans le rein, le poumon, le côlon et les glandes salivaires et à des niveaux plus faibles dans le cœur et le foie (61). Le récepteur M est présent dans certains types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les macrophages, les neutrophiles et les podocytes (27, 61, 84-89).

Contrairement aux récepteurs N, la liaison de la sPLA2 au récepteur M est une réaction indépendante du calcium. La liaison de la sPLA2 à son récepteur entraîne une inhibition de l'activité enzymatique, suggérant un rôle du récepteur dans le contrôle de l'activité enzymatique des sPLA2 (73, 78, 80). Le récepteur M est aussi capable d'internaliser et de dégrader rapidement la sPLA2 via une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (82-83).

Les sPLA2 des groupes IB et X, une fois liées au récepteur M et internalisées, pourraient être transportées au niveau de structures périnucléaires (90) mais aussi au niveau des endosomes et des lysosomes (91).

Rouault et al. ont montré que 5 des 8 sPLA2 de souris de la collection I/II/V/X sont des ligands de haute affinité (0.3-3 nM) pour le récepteur M de souris dans cet ordre : IIF, X, IIE, IB, IIA (73). Les sPLA2 Vet IIC ont une plus faible affinité (30-75 nM). A l'inverse, les sPLA2-III, XIIA et XIIB de souris n'interagissent que très peu ou pas avec le récepteur murin. Ces résultats indiquent clairement que plusieurs sPLA2 de souris sont des ligands

endogènes du récepteur M, mais posent la question du rôle (inhibiteur ou promoteur) de ce récepteur dans la régulation de la fonction de ces sPLA2.

5.3. Autres protéines de liaison des sPLA2

Il existe d'autres protéines qui sont capables de lier les sPLA2. Certaines sPLA2 sont capables de lier les protéoglycans de la membrane plasmique. Les protéoglycans sont des molécules membranaires extracellulaires constituées d'une partie protéique sur laquelle sont greffées des chaînes polysidiques sulfatées et anioniques, les glycosaminoglycans, dont les principaux sont les héparanes sulfates (heparan sulfate proteoglycans ou HSPG). Les sPLA2-IIA, IID, III et V sont capables de se lier aux HSPG (92). A l'inverse, les sPLA2-X, IIC et IIF ne sont pas capables de lier ces molécules. La liaison des sPLA2 aux HSPG favoriserait leur capacité à hydrolyser les phospholipides.

Mounier et al. ont montré que hGIIA et d'autres sPLA2 de mammifères étaient capables de se lier au facteur Xa, inhibant ainsi la formation du complexe coagulant prothrombinase (93-94).

Le surfactant pulmonaire est composé de 95% de lipides et a pour fonction de réduire la tension de surface au niveau de l'interface air-liquide des alvéoles. L'altération du surfactant pulmonaire est une des principales caractéristiques du syndrome adulte de détresse respiratoire aiguë (ARDS) dans lequel plusieurs sPLA2 dont la sPLA2-IIA pourraient être induites et jouer un rôle clé (95-97). La protéine SP-A est très abondante dans le surfactant et fait partie des lectines de type C, comme le récepteur de type M et des inhibiteurs sPLA2 de sang de serpents (78). Elle est impliquée dans la réponse inflammatoire et le maintien de l'intégrité du surfactant pulmonaire. Chez la souris, cette protéine est capable de lier les sPLA2-IIA et -X, mais pas -V, et inhibe leur capacité à hydrolyser le surfactant (98), suggérant un rôle anti-sPLA2 dans l'ARDS.

6. Fonctions, rôles physiologiques et physiopathologiques

Les sPLA2 possèdent des propriétés enzymatiques distinctes sur différents types de phospholipides (36), et leurs distributions tissulaires et leurs régulations géniques sont très variables (2, 99-100). Tout ceci suggère que chaque sPLA2 exerce des fonctions distinctes. Si leurs fonctions précises restent encore largement à découvrir, on sait que certaines sPLA2 participent à la production de divers médiateurs lipidiques (icosanoïdes par exemple) dans des conditions normales ou inflammatoires (101-102), participent à la défense innée de l'hôte (103-105), et pourraient jouer un rôle dans différents contextes physiologiques et dans

différentes pathologies inflammatoires et certains cancers (7, 95, 102, 106-108). Certaines sPLA2 possèdent aussi des propriétés anti-bactériennes (104, 109-110), anti-virales (111), et anti-malariales (112).

6.1. Libération de l'acide arachidonique et production de médiateurs lipidiques

La cPLA2- α joue un rôle clé dans la libération d'acide arachidonique et la production de médiateurs lipidiques dans une multitude de fonctions physiologiques et physiopathologiques (113, 114, 115). Par exemple, les souris cPLA2- α (-/-) sont résistantes à l'asthme (116), l'arthrite rhumatoïdale (117) et le syndrome de détresse respiratoire aigu (118). Nakanishi et al ont également montré l'importance de la cPLA2- α dans certains cancers et sa contribution potentielle dans l'apoptose (119).

La capacité des sPLA2 à libérer de l'acide arachidonique (AA) et à produire des icosanoïdes a été notamment étudiée pour les sPLA2-IIA, -V et -X. Ces travaux restent encore incomplets concernant notamment le mode d'action intracellulaire ou extracellulaire de ces enzymes. Les sPLA2 sont des enzymes sécrétées qui devraient a priori agir depuis le milieu extracellulaire sur la membrane plasmique. Cependant, les sPLA2 pourraient agir pendant leur sécrétion.

Murakami et al. ont montré que la surexpression des sPLA2-IIA et -V dans les cellules HEK 293 permet d'induire la libération d'AA et la production de prostaglandine E2 (120). L'activité enzymatique des sPLA2 et leur liaison aux héparans sulfates protéoglycans membranaires apparaissent nécessaires à la production de médiateurs lipidiques (121-123). En effet, des mutations sur les acides aminés qui permettent la liaison aux héparans sulfates ou l'activité catalytique provoquent une diminution de la libération d'acide arachidonique. Il a aussi été démontré que les quantités de sPLA2-IIA et -V associées à la membrane cellulaire sont supérieures à celles présentes dans le milieu extracellulaire (120).

Mounier et al. ont montré que la surexpression de la sPLA2-IIA par une transfection stable dans les cellules HEK 293 permet d'induire la libération de l'acide arachidonique pendant sa sécrétion, par hydrolyse des membranes intracellulaires, alors que l'ajout exogène de la sPLA2-IIA est incapable de libérer de l'acide arachidonique (124).

Les sPLA2-V et -X sont capables de se lier au phosphatidylcholine (PC) avec une bonne affinité (36). Ajoutées de façon exogène, seules ces deux sPLA2 sont capables de libérer l'AA à partir de la membrane plasmique extracellulaire riche en PC. En accord avec la faible affinité de la sPLA2-IIA pour le PC, l'ajout de cette sPLA2 de façon exogène n'induit aucune libération d'acide arachidonique, même après stimulation par de l'interleukine-1 (37).

L'ajout d'un inhibiteur spécifique non perméant de la sPLA2-X permet d'inhiber partiellement la libération de l'acide arachidonique. Ceci suggère que la libération d'AA par la sPLA2-X se fait dans les milieux intra et extracellulaires (124).

Plusieurs travaux ont montré qu'il existe un « cross-talk » entre certaines sPLA2 et la cPLA2- α , qui pourrait être essentielle pour l'induction de la libération de l'acide arachidonique par ces sPLA2 dans le milieu intra- ou extra-cellulaire.

L'ajout de façon exogène de la sPLA2 humaine de groupe V sur des polynucléaires neutrophiles permet d'induire la production de leucotriène B4 qui pourrait être dépendante de l'activation de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2- α) (125). Ces travaux ont été confirmés en utilisant des mastocytes issus de souris KO pour la sPLA2-V (101). Des études similaires ont également montré que l'ajout exogène de sPLA2-IIA sur des cellules de mammifères conduit à l'activation de la cPLA2 et des MAP kinases (126-127). Cette hypothèse a été confirmée en utilisant des inhibiteurs spécifiques de la cPLA2 ou des cellules qui n'expriment pas l'enzyme (8). Les cellules mésangiales n'exprimant pas la cPLA2 et stimulées par les sPLA2-IIA et -V ne libèrent pas d'acide arachidonique alors que cette libération est importante dans les cellules exprimant cette enzyme (128).

Les macrophages murins, exprimant la cPLA2 α et la sPLA2-V, sont capables de libérer l'acide arachidonique après une stimulation par différents Toll-like receptors (TLR-récepteurs de la membrane des cellules immunitaires) qui permettent la phosphorylation de la cPLA2 α augmentant ainsi sa capacité à libérer l'acide arachidonique. Cette phosphorylation est induite par la sPLA2-V (129).

Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la cPLA2- α comme la pyrrolidine-1 supprime l'augmentation d'acide arachidonique libéré par les cellules transfectées avec sPLA2-IIA (124).

En résumé, la sPLA2-IIA n'est capable de libérer de l'acide arachidonique que pendant la sécrétion alors que les sPLA2 des groupes V et X agissent dans les milieux intra et extracellulaires. Hormis dans le cas de la sPLA2-X ajoutée de façon exogène, l'action des sPLA2 apparaît dépendante de l'activation de la cPLA2 α . En effet, la sPLA2-X est capable de libérer l'acide arachidonique indépendamment de l'action de la cPLA2 α . Cette hypothèse a été vérifiée en utilisant des inhibiteurs spécifiques de la sPLA2-X et de la cPLA2 α . De plus, cette libération par la sPLA2 n'est pas altérée dans les cellules déficientes en cPLA2 α , ainsi que la formation des médiateurs lipidiques (130).

Enfin, il est intéressant de noter qu'une libération d'acide arachidonique par la sPLA2-X pendant la sécrétion présuppose que l'enzyme est déjà sous forme active à ce stade. La

mesure de la libération d'AA est donc un bon moyen pour déterminer où pourrait se faire la maturation de cette sPLA2.

6.2. Fonctions physiologiques et physiopathologiques des sPLA2

6.2.1. Digestion des phospholipides alimentaires

La sPLA2 pancréatique de groupe IB fut la première sPLA2 clonée (131). Elle est fortement exprimée dans le pancréas et sécrétée dans le duodénum. Dans le tissu pancréatique, elle existe exclusivement sous la forme d'un zymogène inactif. Elle est ensuite sécrétée dans le duodénum et clivée par la trypsine pour générer une enzyme catalytiquement active (13). L'utilisation de souris déficientes pour la sPLA2 pancréatique a permis de montrer un rôle de cette enzyme dans la digestion des phospholipides du bol alimentaire, avec un rôle exacerbé en condition de régime riche en lipides (132-134). De plus, le traitement de souris sauvages C57/Bl6 soumises à un régime très riche en sucre par le méthyl-indoxam, un inhibiteur de la sPLA2-IB, prévient la prise de poids et le diabète (135).

La sPLA2-IB et les sPLA2-IIA, IID, IIE, IIF, V et X sont également sécrétées dans le tractus gastro-intestinal (100) et ces dernières sont aussi inhibées par le méthyl-indoxam, suggérant qu'elles pourraient aussi participer à ce type de fonction.

6.2.2 Coagulation

Comme plusieurs sPLA2 de venins, les sPLA2 de mammifères possèdent des effets anti-coagulants. Certaines sPLA2 anti-coagulantes agissent par hydrolyse des phospholipides. C'est le cas pour la sPLA2 de groupe X, la sPLA2 de venin d'abeille et celle de venin de *Naja mossaambica mossaambica* (94). D'autres sPLA2 ont une action indépendante des phospholipides.

Dans ce cas, l'inhibition de la coagulation implique une inhibition du complexe prothrombinase (composé *in vivo* de calcium, de phospholipides, des facteurs Xa et Va et de la prothrombine) via une interaction directe entre les sPLA2 et le facteur Xa. Une interaction directe avec le facteur Xa a été observée, *in vitro*, pour les sPLA2 de mammifères hGIIA, mGIIA, mGIID et hGV ainsi que pour des sPLA2 de venins (94, 136). Le site de la sPLA2 hGIIA impliqué dans l'interaction avec le facteur Xa comprend plusieurs résidus basiques du domaine de liaison interfaciale. Cette interaction empêche la liaison du facteur Va au facteur Xa et conduit à une inhibition du complexe prothrombinase.

6.2.3 Exocytose et sécrétion de cytokines

La surexpression de certaines sPLA2 dans des mastocytomes de rat montre l'implication de certaines sPLA2 dans le processus de dégranulation (137). Dans ce cas, seules les sPLA2 capables de lier les protéoglycans (IIA, IID et V), augmentent fortement la dégranulation de ces cellules après stimulation par un mélange Ig E/antigène. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité enzymatique ainsi que des études de mutagenèse dirigée indiquent l'importance de l'activité enzymatique et de la liaison aux protéoglycans dans le processus de dégranulation. Une fois liée aux protéoglycans, la sPLA2 hydrolyserait les phospholipides membranaires, produisant des lysophospholipides favorisant la fusion des vésicules avec la membrane (137).

Par ailleurs, il a été montré que les sPLA2-IB, IIA et X stimulent la sécrétion de TNF- α et IL6 sur des macrophages alvéolaires humains (86). Des sPLA2 mutées au centre actif sont cette fois toujours capables d'induire la sécrétion de cytokines. Le méthyl-indoxam, un inhibiteur sPLA2, apparaît cependant capable de bloquer la production des cytokines. Cet effet, pourrait être expliqué par la présence du récepteur M dans ces macrophages humains et par l'effet bloquant du méthyl-indoxam sur la liaison des sPLA2 au récepteur (86, 138). L'implication formelle du récepteur dans cet effet biologique n'est cependant pas clairement établie.

6.2.4 Inflammation

Plusieurs sPLA2 jouent différents rôles dans l'inflammation, notamment dans la production des médiateurs lipidiques.

La sPLA2 de groupe IIA pourrait jouer un rôle important dans l'inflammation. Elle est fortement exprimée dans les sites inflammatoires. Sa concentration dans le sérum et les tissus inflammés corrèle avec la sévérité de plusieurs maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïdale, le choc septique, la maladie de Crohn, la pancréatite, l'asthme ou les accidents cardiovasculaires (14-15, 139-144).

Des études *in vitro* ont montré que cette sPLA2 participe à la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (124, 145) et que son expression est inductible en réponse à divers stimuli pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 (IL-1), le LPS et l'interféron- γ (IFN- γ), mais également réprimée en réponse à divers stimuli anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes. Ces différentes observations suggèrent un rôle clé de cette sPLA2 dans la réponse inflammatoire (146-150).

De plus, des souris traitées par le lipopolysaccharide, agent pro-inflammatoire, ont montré une augmentation d'expression des sPLA2-V, IID, IIE et IIF (99).

Les sPLA2 IIA et V sont exprimées dans plusieurs tissus humains et cette expression est induite dans le cas de certaines pathologies inflammatoires tandis que les sPLA2 des groupes IID et IIE ne sont détectables qu'au niveau des cardiomyocytes inflammées (151).

Des souris transgéniques qui surexpriment la sPLA2-IIA humaine (hGIIA) dans plusieurs tissus dont le foie, le rein et la peau ne développent pas d'inflammation spontanée mais des problèmes au niveau de la peau (152). Ces souris transgéniques sont viables et fertiles.

Des travaux plus récents ont étudié l'effet de la sur-expression de la sPLA2-III au niveau de la peau de souris. Sa surexpression dans des souris transgéniques induit le développement de certaines pathologies inflammatoires de la peau. Une augmentation du niveau de production des cytokines pro-inflammatoires a été détectée (153).

Des souris transgéniques surexprimant la sPLA2-X dans les macrophages développent une pathologie inflammatoire pulmonaire et meurent rapidement après la naissance (154). Ceci est probablement dû à la forte activité catalytique de cette enzyme pour la phosphatidylcholine, constituant essentiel de la membrane cellulaire et pour le phosphatidylglycérol, un phospholipide présent en grande quantité dans le surfactant pulmonaire. In vitro, des macrophages surexprimant la sPLA2-X présente un profil anti-inflammatoire et produisent plus d'IL-10 et moins de TNF-alpha, mais se différencient plus rapidement en macrophages spumeux en présence de LDL. De façon intéressante, d'autres souris transgéniques surexprimant la sPLA2-X avec un promoteur actin pléiotropique ne développent pas de problème au niveau du surfactant pulmonaire (155). Ce dernier résultat contraste avec le phénotype de souris transgéniques surexprimant la sPLA2-V avec le même promoteur actin et qui meurent à la naissance par dégradation du surfactant pulmonaire (155).

Des souris C57BL/6 invalidées pour la sPLA2-IIA présentent une susceptibilité pour l'arthrite rhumatoïdale plus faible que des souris Balb/C exprimant la sPLA2-IIA, suggérant un rôle de cette sPLA2 dans le développement de cette pathologie (156).

Les macrophages péritonéaux de souris KO pour la sPLA2-V produisent moins de médiateurs lipidiques que les macrophages de souris WT (157) et les souris KO pour cette sPLA2 sont moins résistantes à une infection par *Candida albicans* (105).

Des souris invalidées pour la sPLA2 de groupe X montrent une réduction de l'induction de l'asthme contrairement aux souris sauvages (102).

Des inhibiteurs sPLA2, de type indole comme le LY311727 ou l'indoxam, ont un effet thérapeutique dans des modèles animaux de pathologies inflammatoires du poumon ou du choc septique (158-160). Ces molécules ne sont pas spécifiques de la sPLA2 de groupe IIA, et cela ne permet donc pas de discriminer l'implication de l'une des sPLA2 de la collection I/II/V/X dans la réaction inflammatoire. Cependant, l'injection de sPLA2-IIA de rat ou humaine dans des modèles d'inflammation *in vivo* exacerbe la réaction inflammatoire qui est diminuée après injection d'anticorps dirigés contre la sPLA2-IIA (161-163).

Enfin, des travaux très récents suggèrent un rôle immuno-suppresseur de la sPLA2 de groupe IID sur les cellules T régulatrices dans un modèle de colite inflammatoire et de sclérose en plaque (164) et l'implication de cette sPLA2 dans la Broncho-pneumopathie chronique obstructive (ou COPD : chronic obstructive pulmonary disease) (165).

6.2.5 Inflammation pulmonaire : Asthme/ARDS (*acute respiratory distress syndrome ou syndrome de détresse respiratoire aigu*)

- ARDS :

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est un état inflammatoire qui conduit à la dégradation du surfactant pulmonaire et à un défaut respiratoire sévère. Dans ce syndrome, les sPLA2 jouent vraisemblablement différents rôles dont un qui consiste à hydrolyser le surfactant pulmonaire.

La sPLA2-IIA est fortement induite dans le SDRA et joue très probablement un rôle important dans l'hydrolyse des phospholipides du surfactant pulmonaire et le développement de cette pathologie inflammatoire aiguë (166). La sPLA2-IIA a été détectée à des niveaux très importants dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL fluides, cellules et plasma) de patients SDRA (97). Chez le cobaye, l'instillation intra-trachéale de l'inhibiteur sPLA2 LY311727 diminue fortement la libération d'acides gras et de lysophospholipides dans le lavage broncho-alvéolaire (BALF). Ceci suggère que la sPLA2-IIA pourrait jouer un rôle dans le SDRA, mais ne permet pas d'exclure un rôle d'autres sPLA2, notamment des groupes V et X puisque celles-ci sont inhibées par le LY311727 (36) et que leur sur-expression dans des souris transgéniques conduit à une dégradation du surfactant pulmonaire et à la mort des souris (155).

- Asthme :

L'asthme est une maladie du système respiratoire touchant les voies aériennes supérieures, notamment les bronches. La sPLA2 de groupe X joue un rôle important dans

cette pathologie inflammatoire. Les souris déficientes en sPLA2-X présentent une réponse inflammatoire très fortement atténuée lorsqu'elles sont introduites dans le modèle d'asthme à l'ovalbumine (102). Ce phénotype serait principalement dû à une plus faible production d'icosanoïdes, notamment de leucotriène C4, un puissant vasoconstricteur et chemoattractant pour les cellules inflammatoires, et par une réduction de la réponse Th2 dans les souris KO. Chez des patients asthmatiques, les sPLA2 des groupes X et XIIA sont exprimées à des niveaux importants (167).

D'autres sPLA2 pourraient être impliquées dans l'asthme. L'instillation de la sPLA2-V induit une hyper-réactivité bronchique tandis que l'ajout d'un anticorps spécifique bloque la réponse induite par l'ovalbumine (168). Les souris KO pour la sPLA2-V montrent aussi une plus faible réaction asthmatique (168). Par ailleurs, diverses cellules immunitaires impliquées dans cette pathologie inflammatoire, comme les polynucléaires basophiles, les lymphocytes Th-2, les cellules épithéliales, les macrophages et les mastocytes expriment des sPLA2 (169).

6.2.6 Athérosclérose

Au moins trois sPLA2, celles de groupes IIA, V et X, sont impliquées dans le développement de cette pathologie. Ces sPLA2 pourraient jouer un rôle pro-inflammatoire en augmentant la production de médiateurs lipidiques comme les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et les lysophospholipides et en hydrolysant les lipoprotéines, les rendant plus athérogènes (170-174).

Les lipoprotéines sont des particules sphériques circulant dans le plasma, composées d'une apoprotéine et de lipides. Le coeur lipidique de la particule est constitué de triglycérides et de cholestérol tandis que la surface externe est composée de phospholipides, essentiellement de PC. La densité des lipoprotéines varie depuis les lipoprotéines les plus denses (*high density lipoprotein* HDL) vers les moins denses (VLDL). Les HDL permettent d'évacuer le cholestérol vers le foie. Les LDL, moins mobiles, peuvent s'infiltrer dans la sous-intima vasculaire, oxydées, puis phagocytées par les macrophages. L'accumulation excessive de lipides dans ces macrophages aboutit à leur transformation en cellules spumeuses (*foam cells*) qui s'accumulent dans la paroi vasculaire et participent à la formation de la plaque d'athérome.

Plusieurs travaux suggèrent l'implication de la sPLA2 de groupe IIA dans l'athérosclérose. Cette sPLA2 est présente dans les plaques d'athérome (175). A forte

concentration, cette sPLA2 est capable d'hydrolyser les lipoprotéines, après oxydation, malgré sa faible affinité pour le phosphatidylcholine qui est le principal constituant des LDL. Ces altérations de la structure des LDL (augmentation du rapport protéines/lipides) entraînent une augmentation de leur affinité pour les protéoglycans et leur accumulation dans la paroi vasculaire (176). L'implication de la sPLA2-IIA dans le processus d'athérosclérose a été confirmée grâce à des souris transgéniques surexprimant cette enzyme (177). Les souris transgéniques pour la sPLA2 hGIIA développent un grand nombre de lésions athérosclérotiques comparées aux souris contrôles.

Comme la sPLA2 de groupe IIA, les sPLA2-V et X sont aussi présentes dans les lésions athérosclérotiques mais leur distribution est partiellement différente. L'expression de la sPLA2-V, mais pas celle de la sPLA2-IIA, est aussi augmentée par un régime riche en lipides (178). Ceci suggère que ces sPLA2 ont des fonctions distinctes (172-174, 179-180). Les sPLA2-V et -X ont une activité d'hydrolyse des lipoprotéines plus forte que celle de la IIA car ces sPLA2 sont plus actives sur le PC (172-173, 179-182). La présence de ces sPLA2 dans les lésions athérosclérotiques, leur forte capacité à hydrolyser les particules de LDL et leur implication dans la transformation des macrophages en cellules spumeuses, suggère l'importance des sPLA2 de groupe V et X dans cette pathologie. Les travaux récents utilisant des souris déficientes pour la sPLA2-V ou surexprimant la sPLA2 après infection rétrovirale montrent que cette enzyme joue un rôle pro-athérosclérotique (183), mais que son action dépend fortement de la nature des lipoprotéines selon les modèles d'athérosclérose utilisés (184).

Le rôle *in vivo* pro- ou anti-athérosclérose de la sPLA2 de groupe X reste à définir. Les données *in vitro* sur l'hydrolyse des LDL et sur l'activation des macrophages ou sur la polarisation des cellules T helper laissent ouvertes les deux possibilités (102, 154, 172, 180).

Enfin, des souris transgéniques surexprimant la sPLA2-III développent des altérations au niveau des lipoprotéines par comparaison avec les souris contrôles. Ceci est dû à la conversion du phosphatidylcholine hydrolysé par la sPLA2-III en lysophospholipides. Ce produit d'hydrolyse contribue à la formation des cellules spumeuses (*foam cells*) qui s'accumulent dans la paroi vasculaire en formant la plaque d'athérome. La sPLA2-III a été détectée dans les lésions athérosclérotiques et pourrait donc exercer un rôle pro-athérosclérotique (185).

6.2.7 Prolifération cellulaire, cancer

Différentes PLA2 intracellulaires et les sPLA2 IIA, IID, III, V et X sont impliquées dans le processus de tumorigénèse, principalement en raison du rôle de ces PLA2 dans la production de médiateurs lipidiques favorisant l'initiation et/ou le développement tumoral, ou au contraire la mort cellulaire (108). Effectivement, différents travaux *in vitro* sur des lignées cellulaires ont montré que les sPLA2, directement ou via l'activité des produits d'hydrolyse, étaient impliquées dans des mécanismes conduisant à la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la migration cellulaire.

In vitro, les sPLA2 de groupe IB et IIA jouent un rôle dans la prolifération, la migration cellulaire et l'apoptose. Ceci suggère que ces sPLA2 pourraient jouer un rôle potentiel dans le cancer (84, 186-188).

Les sPLA2 des groupes IIA, V et X sont détectées dans trois lignées cellulaires de cancer de la prostate (189) et sont plus exprimées dans ces cellules par rapport aux cellules normales de prostate.

D'autres travaux ont montré que la sPLA2-IIA possède une forte affinité pour les intégrines, qui sont des récepteurs transmembranaires permettant la transduction de signaux entre les cellules. Cette liaison sPLA2-IIA et intégrines permet d'induire un signal prolifératif des cellules monocytaires U937. Ces études ont donc montré l'importance des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha4\beta1$ à induire une fonction pro-inflammatoire de la sPLA2-IIA humaine (190).

In vivo, MacPhee et al. (1995) ont utilisé le modèle murin *Apc* (souris *Min*) de polypes intestinaux qu'ils ont croisé avec des souris de différents fonds génétiques exprimant ou non la sPLA2 murine de groupe IIA (mGIIA). Ces travaux ont permis de montrer pour la première fois un rôle de type suppresseur de tumeur pour mGIIA dans ce modèle *Min* de polypose adénomateuse familiale humaine (FAP) (191). De plus, des souris *Min* transgéniques surexprimant mGIIA font moins de polypes intestinaux (106). Un autre modèle de souris a été utilisé pour confirmer le rôle de mGIIA comme suppresseur de tumeurs. Plusieurs lignées de souris ont été soumises au carcinogène colique azoxyméthane (AOM), puis les niveaux d'expression de cette sPLA2 ont été évalués. Ces travaux ont montré qu'il existe une corrélation entre la résistance de certaines lignées murines au carcinogène et l'élévation du niveau d'expression de la sPLA2-IIA (192). L'augmentation de l'expression de mGIIA pourrait donc exercer un effet protecteur sur l'apparition des polypes intestinaux. Les différents travaux effectués par la suite chez l'homme indiquent un rôle complexe de la sPLA2 humaine de groupe IIA dans le cancer colorectal et dans d'autres cancers de l'estomac ou de la prostate dans lesquels cette sPLA2 pourrait être anti- ou pro-tumoral (193-195)

La sPLA2-III pourrait jouer un rôle dans le développement de certains cancers comme les cancers de peau, colorectal, leucémie...etc (25, 196-197).

L'expression de la sPLA2-XIIB est fortement diminuée dans les tumeurs du foie, de l'intestin grêle et du rein, suggérant que cette dernière pourrait aussi jouer un rôle dans le cancer (30).

Des études sur des biopsies humaines du cancer colorectal ont montré que la sPLA2-X est fortement exprimée dans le cancer colorectal (196, 198-200), mais le rôle *in vivo* de cette sPLA2 dans le développement tumoral reste à déterminer. Les travaux de Takaku et al et Morioka et al ont suggéré que cette sPLA2 pourrait jouer un rôle dans le côlon via la production de PGE2 (198, 201). Nos travaux *in vitro* récemment publiés vont dans ce sens et montrent le rôle de la sPLA2-X dans la prolifération cellulaire des cellules tumorales de souris côlon-26 (cf ci-dessous : (202)). La démonstration *in vivo* du rôle de cette sPLA2 dans un modèle murin de cancer du côlon reste cependant à faire.

Enfin, deux études récentes indiquent un rôle nouveau de la sPLA2 humaine de groupe IIA dans la sénescence cellulaire répliquative de différents fibroblastes humains comme les WI38 (fibroblaste de poumon), les HMEC (*human mammary epithelial cell*) et les HDF (*human primary dermal fibroblasts*) (203). La sénescence cellulaire correspond à un état d'arrêt irréversible de la croissance des cellules. On distingue la sénescence répliquative, provoquée par un raccourcissement des télomères au fil des divisions cellulaires, et la sénescence induite par un stress (dommage répété de l'ADN, stress oxydatif, activation d'oncogènes, inactivation de gènes suppresseurs de tumeur...) (204). Le rôle de cette sPLA2 dans la sénescence pourrait être à rapprocher de son effet anti-tumoral dans les cancers du côlon et de l'estomac.

En résumé, les rôles potentiels de certaines sPLA2 dans la carcinogénèse font l'objet de nombreuses études, cependant les fonctions pro- ou anti-cancéreuse et les mécanismes d'action de ces dernières restent encore controversées.

6.2.8 Activité anti-microbienne

La sPLA2 de groupe IIA est connue depuis longtemps pour son activité anti-microbienne (110, 205-206). La sPLA2 humaine de groupe IIA est retrouvée en abondance dans les larmes, l'intestin et les lavages broncho-alvéolaires de patients infectés (207, 208, 209).

La sPLA2-IIA possède une activité bactéricide directe contre un grand nombre de bactéries Gram-positives comme *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria*

monocytogenes et *Bacillus anthracis* (104, 210-211). L'enzyme exerce aussi un effet bactéricide sur les bactéries Gram-négatives, mais nécessite dans ce cas la présence de cofacteurs (110, 212).

Le mécanisme d'action de la sPLA2-IIA contre les bactéries Gram-positives comprend deux étapes : diffusion de l'enzyme au travers de la paroi bactérienne par interactions électrostatiques entre la paroi polyanionique de la bactérie et la surface basique de la sPLA2 (pI>10,5), puis hydrolyse de la membrane phospholipidique enrichie en phosphatidylglycérol (213-214). Dans le cas des bactéries Gram-positives dont l'enveloppe cellulaire est constituée par des lipopolysaccharides, l'action de la sPLA2 nécessite la présence d'autres protéines des polynucléaires neutrophiles comme la « BPI » (bactericidal permeability-increasing protein) qui permet à la sPLA2 de pénétrer dans la paroi bactérienne (215).

L'importance de la sPLA2 hGIIA dans la lutte contre les infections bactériennes a été confirmée par l'utilisation de souris transgéniques surexprimant cette protéine. Les souris transgéniques surexprimant l'enzyme sont résistantes à une infection par des bactéries Gram-positives comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* et des bactéries Gram-négative comme *Escherichia coli* (104, 110, 216-217).

La sPLA2- IIA n'est pas le seul membre de la famille des sPLA2 capable d'exercer des activités bactéricides (109, 218). Le potentiel anti-bactérien contre différentes souches des sPLA2 humaines est le suivant : IIA>X>V>XIIA>IIE>IB=IIF (109). La sPLA2-IIA possède cependant la plus forte activité bactéricide. Seule la sPLA2 de groupe XIIA semble exercer un effet bactéricide sur les bactéries Gram-négatives sans la présence d'un cofacteur comme le BPI (109, 211).

Certaines sPLA2 de venins et de mammifères possèdent aussi des propriétés anti-virales et anti-parasitaires. En effet, certaines sPLA2 de venins et la sPLA2 humaine de groupe X sont capables d'inhiber l'infection par le VIH (219-220).

L'effet anti-viral des sPLA2 a aussi été constaté sur d'autres familles de virus. Les sPLA2-V, X et III sont capables d'empêcher l'infection par un adénovirus dans des cellules de mammifères en inhibant l'entrée de l'adénovirus dans les endosomes (221-222).

Le paludisme ou malaria est une parasitose due à un protozoaire transmis par la piqûre de la femelle d'un moustique, l'anophèle. On compte 300 à 500 millions de malades et 1,5 à 2,7 millions de décès par an, concernant majoritairement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (OMS, 2005).

Les sPLA2 de venins et de mammifères comme la sPLA2 pancréatique de groupe IB, bloquent le développement intra-érythrocytaire du parasite *Plasmodium falciparum* (112). Inversement, une étude chez la souris utilisant des souris KO pour la cPLA2 montre que cette dernière ne semble pas jouer un rôle majeur dans le développement de cette maladie (223). Enfin, les travaux effectués en collaboration avec le Dr Deregnaucourt montrent que les sPLA2-IIIF et X sont aussi capables d'empêcher l'infection des globules rouges humains par *P. falciparum* (cf ci-dessous). Le rôle in vivo des sPLA2 dans la malaria reste à explorer. Deux études anciennes montrent que la sPLA2 de groupe IIA est sur-exprimée chez des patients infectés, mais un éventuel rôle protecteur n'a pas été démontré (224-225).

III. La phospholipases A2 sécrétée de groupe X (sPLA2-X)

1. Clonage

Le gène de la sPLA2 de groupe X a été cloné et caractérisé chez l'homme en 1997 (27). Ce gène code pour une protéine mature de 13.6 kDa constituée de 123 acides aminés précédé d'un propeptide de 11 acides aminés, avec un point isoélectrique de 5.3 et un site de N-glycosylation en position 105. La sPLA2 de groupe X possède 16 cystéines (8 ponts disulfure) dont certaines localisées aux positions caractéristiques des sPLA2 des groupe I et II, une extension C-terminale caractéristique du groupe II, et n'a pas la boucle pancréatique, caractéristique du groupe I. Cette sPLA2 a donc été classée dans un nouveau groupe : le groupe X (27). Le propeptide de 11 acides aminés finit par un doublet arginine ou lysine arginine, suggérant une coupure par des protéases de la famille des furines. Seule la sPLA2-X et la sPLA2 pancréatique possèdent un propeptide. Nous avons observé un polymorphisme non silencieux dans le gène humain à la position Arg-38 (mutation R38C). Cette mutation est localisée dans le propeptide et conduit à l'absence de sécrétion de la sPLA2 sous forme active (cf article Gora et al ci-dessous). La sécrétion de la sPLA2-X pourrait se faire sous la forme d'une proenzyme ou sous forme mature après clivage du propeptide au niveau d'un doublet arginine dans l'appareil de Golgi. Chez l'homme la sPLA2-X possède 29 % d'identité avec la sPLA2 de groupe IB, 33% avec la sPLA2-IIA et 35 % avec la sPLA2-V.

2. Propriétés enzymatiques et de liaison au récepteur sPLA2 de type M

La sPLA2-X a un pH optimal compris entre 6 et 8. Cette sPLA2 présente une forte activité enzymatique sur différentes classes de phospholipides, et hydrolyse de façon efficace la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol (36). En effet, les sPLA2 de groupe X humaine et murine possèdent une activité spécifique sur le PG et le PC de l'ordre de 30 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ et 7,3 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectivement (36). La capacité d'hydrolyse de la sPLA2-X sur le PC suggère son implication dans la libération de l'acide arachidonique à partir des membranes cellulaires, puisque la surface des cellules est essentiellement constituée par des phosphatidylcholines zwitterioniques et des sphingomyélines (226). Il a été montré que le rapport PC/sphingomyéline participait au contrôle de l'activité enzymatique de la sPLA2-X et d'autres sPLA2 (IIA et V) (38, 182, 227).

La spécificité de substrat et la vitesse d'hydrolyse de cette sPLA2 restent similaires en présence ou en absence de la N-glycosylation (28).

D'autres études ont montré que l'enzyme mature est plus active que la forme proenzyme, après le clivage du propeptide par la trypsine, montrant que ce clivage est essentiel pour l'activation de l'enzyme (62). De plus, Morioka et al. ont montré également que la pro-sPLA2-X possède une faible capacité de libérer l'acide arachidonique par rapport à sa forme mature (62).

Cette enzyme possède aussi une forte affinité pour le récepteur de type M de souris et la protéolyse du propeptide est nécessaire pour la liaison au récepteur (62, 73), comme dans le cas de la sPLA2-IB (228).

3. Distribution tissulaire et fonctions physiologiques de la sPLA2-X

3.1. Distribution tissulaire et régulation transcriptionnelle :

Chez l'homme, le gène de la sPLA2-X est fortement exprimé dans la rate, le thymus et les leucocytes du sang périphérique (27). Il est aussi fortement exprimé dans le pancréas, l'estomac, le côlon, la peau et à de plus faibles niveaux dans les poumons et les testicules, ainsi que dans différentes cellules immunitaires purifiées comme les macrophages et les neutrophiles, les kératinocytes, ou les cellules de l'épithélium nasal et pulmonaire (22, 27, 89, 167, 169, 196, 229-234).

La sPLA2-X est également exprimée dans la plupart des tissus ci-dessus chez la souris, mais à des niveaux différents. Elle est abondante dans les testicules, le côlon, l'intestin grêle et l'estomac (17, 62, 100, 154, 202, 235-236).

Des analyses par immunohistochimie ont montré que la sPLA2-X est exprimée dans les macrophages et les cellules alvéolaires épithéliales des poumons humains (232, 237), les spermatogonies et spermatozytes de souris (235) et dans les plaques d'athérosclérose de lapin et humaines (172, 180). Ces distributions sont en accord avec les rôles proposés de la sPLA2-X dans l'athérosclérose, l'asthme (102, 167, 172, 180), le cancer colorectal (196, 198, 202), l'ischémie cardiaque (236) et la maturation terminale des spermatozoïdes (cf ci-dessous l'article Escoffier et al., 2009).

La sPLA2 de groupe X apparaît aussi être exprimée dans les ganglions nerveux périphériques de différents tissus comme le poumon, la prostate, l'estomac, le côlon et l'utérus (151, 202, 238). Bien que la sPLA2-X semble exercer un effet neuritogénique *in vitro*, son rôle fonctionnel *in vivo* reste inconnu dans ces ganglions nerveux, et nous ne pouvons pas exclure un rôle neurotoxique de cette sPLA2, comme cela a été observé pour des sPLA2 de venins ou pour les sPLA2 des groupes IB et IIA (239-241). Dans des carcinomes de l'estomac, la sPLA2-X apparaît aussi exprimée dans les cellules en gobelet sécrétant le mucus, suggérant que la sPLA2 est libérée dans la lumière de l'estomac (151).

Peu de travaux ont concerné l'étude de la régulation transcriptionnelle de la sPLA2 de groupe X. A l'inverse des sPLA2-IIA et V, cette enzyme ne subit pas de régulation transcriptionnelle ou épigénétique dans les cellules T-lymphoblastiques (lignée Jurkat) stimulées par différentes cytokines (197). Son niveau d'expression ne varie pas non plus dans des lignées de cellules prostatiques normales ou cancéreuses (189). De façon similaire, aucune différence d'expression de la sPLA2-X n'est observée au niveau transcriptionnel dans le cancer colorectal humain (25, 196, 200). Les études de Masuda et al montrent aussi une expression plutôt constitutive de la sPLA2-X humaine dans des pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïdale et la pneumonie et dans différents cancers (151, 237-238, 242).

Une étude récente suggère cependant une régulation épigénétique du gène humain de la sPLA2-X dans des cellules cancéreuses de la langue par le butyrate de sodium (243). Enfin, l'expression de la sPLA2 pourrait être augmentée dans la rétine de rat après un traitement par le kainate ou une surexposition lumineuse, bien que le niveau d'expression initial soit très faible (244-245).

Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de la sPLA2-X dans différentes pathologies ne serait que peu ou pas régulée au niveau transcriptionnel, ce qui est en opposition avec la forte régulation du gène de la sPLA2-IIA, mais aussi des sPLA2-IIID, IIE et IIF par exemple (99, 246). Cette apparente faible régulation transcriptionnelle suggère une

autre régulation de l'activité de la sPLA2-X par coupure de la proenzyme par des protéases dont l'expression serait régulée dans des conditions physiopathologiques. Une première expérience dans ce sens a été réalisée et montre que l'inflammation locale peut réguler l'activation de la sPLA2-X surexprimée dans les souris transgéniques (155).

3.2. Rôles physiologiques et physiopathologiques :

Les propriétés enzymatiques de la sPLA2-X et son expression tissulaire et cellulaire suggèrent que cette enzyme joue un rôle important dans la production de médiateurs lipidiques dans différentes pathologies inflammatoires telles que l'athérosclérose, l'asthme et dans le cancer colorectal (102, 172, 196, 198, 202).

La sPLA2-X est sécrétée par le pancréas et l'estomac d'après les résultats d'Eerola et al. (100). Elle pourrait donc participer à la digestion du bol alimentaire ou d'autres fonctions encore inconnues.

Il a également été montré que cette enzyme est exprimée dans les poumons qui représentent une source abondante de différentes sPLA2 (100, 169). La sPLA2 est impliquée dans l'asthme et potentiellement dans d'autres pathologies pulmonaires comme l'ARDS (102, 154, 169). Cette sPLA2 est aussi présente dans des organes du système immunitaire tels que le thymus et la rate (62) et particulièrement dans des cellules immunitaires comme les macrophages (86, 154, 247) et les polynucléaires neutrophiles (230, 247-248).

Dans le cas des macrophages de poumon, la sPLA2-X pourrait jouer un rôle important dans la production de certaines cytokines telles que l'interleukine IL6 et le TNF- α (86, 247), ou bien en induisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10 (154). La sPLA2-X est aussi présente dans les lésions athérosclérotiques où elle serait capable d'hydrolyser le PC à partir des membranes cellulaires ou des lipoprotéines, favorisant ainsi une action pro-inflammatoire (172, 180).

Au niveau d'autres cellules immunitaires, notamment les polynucléaires neutrophiles, la sPLA2-X pourrait jouer un rôle important dans l'activité bactéricide (230, 248), mais aussi cytotoxique pour les cardiomyocytes dans un contexte d'ischémie cardiaque (249). Il a été montré que la sPLA2-X est capable de lyser des bactéries Gram-positives (109, 211). Un rôle de la sPLA2-X dans l'activation des neutrophiles via une interaction avec le récepteur de type M exprimé par les neutrophiles est possible, mais n'a jamais été démontré (85).

De plus, la sPLA2-X, comme les sPLA2-III et V, est capable d'empêcher l'infection par un adénovirus dans les cellules de mammifères en inhibant son entrée dans les endosomes (221-222). Cette action antivirale semble dépendre de la production de

lysophosphatidylcholine (LPC) dans la cellule hôte, en accord avec le rôle inhibiteur du LPC sur la fusion membranaire de certains virus (250-251). La sPLA2-X est également capable d'inhiber l'infection par le VIH (220). Enfin, la sPLA2-X pourrait aussi être impliquée dans la malaria (cf ci dessous (252)).

La forte expression de la sPLA2-X dans les testicules (17, 100, 235) nous a conduits à étudier son rôle dans ce tissu. Nous avons observé que la sPLA2-X était présente en très grande quantité dans l'acrosome du spermatozoïde et jouait un rôle important dans le contrôle de la réaction acrosomique au cours de la capacitation in vitro, mais aussi dans l'étape de fusion avec les ovocytes (cf ci-dessous Escoffier et al., 2009).

Dans le cas du cancer colorectal humain, l'expression de la sPLA2-X serait augmentée dans le tissu tumoral (mesure par immunohistochimie), et l'expression serait corrélée à celle de la COX-2, suggérant un rôle important de la sPLA2-X dans la biosynthèse de PGE2 via l'induction de COX-2 (198). Ces premiers travaux sont en désaccord avec d'autres études montrant que l'expression de la sPLA2-X n'est pas augmentée dans plus de 50 biopsies de patients atteints de cancer colorectal humain et par mesure en PCR quantitative et en immunohistochimie (196, 200) et par l'absence de sur-expression du gène murin dans les modèles génétiques et à l'azoxyméthane chez la souris (202). Néanmoins, le niveau d'expression de la sPLA2-X est très élevé dans les tumeurs de patients, et il est donc possible que l'activation de la sPLA2-X passe par la protéolyse de la forme inactive de la sPLA2 de groupe X dans des conditions inflammatoires localisées. En accord avec la forte expression de la sPLA2-X dans le côlon, nous avons observé que cette sPLA2 pouvait induire la prolifération de cellules tumorales de cancer du côlon (cf ci-dessous Surrel et al., 2009).

4. Caractéristiques structurales

Le cDNA codant pour la sPLA2-X humaine contient un peptide signal de 21 acides aminés, un propeptide de 11 acides aminés finissant avec un doublet arginine, et une séquence de 123 résidus (environ 14 kDa) correspondant à la protéine mature (27). La sPLA2-X humaine a un pI de 5,3 et présente un site de N-glycosylation (28). La sPLA2-X est la seule sPLA2 possédant 8 ponts disulfures dont deux sont aux positions des sPLA2 des groupes I et II. La présence de ces 8 ponts pourrait être liée à sa forte résistance à la dénaturation par le DTT (36). Par contre, une étude indirecte faite avec la sPLA2-IB dans laquelle les ponts spécifiques des différentes sPLA2 ont été introduits, suggère que les ponts spécifiques à la sPLA2-X ne lui confèrent pas des propriétés enzymatiques particulières (253).

propeptide dépasse de la structure plane du domaine de liaison interfaciale et empêche vraisemblablement la liaison de l'enzyme à la membrane phospholipidique, ce qui conduit à une forte diminution de l'activité spécifique (Figure 6). Le propeptide est aussi vraisemblablement très flexible et pourrait induire une déstabilisation de l'hélice N-terminale, comme cela a aussi été montré dans le cas du propeptide de la sPLA2 pancréatique (254).

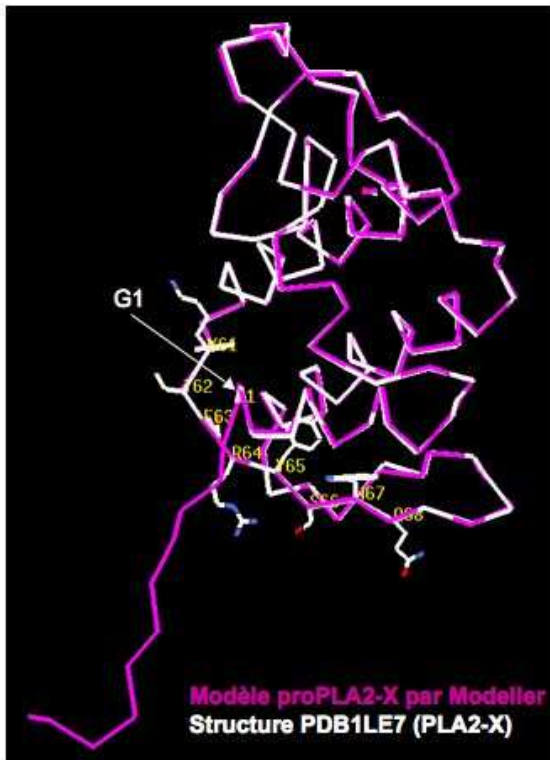


Figure 6: modèle structural de la proHGX sPLA2. Le propeptide de 11 acides aminés (en violet) est du côté N-terminale de l'enzyme.

En collaboration avec le groupe d'Ewa Ninio à Paris, nous avons observé un polymorphisme dans le gène humain conduisant à une mutation au niveau du propeptide à la position 38 de la séquence protéique totale de la sPLA2-X humaine (cf ci-dessous Gora et al., 2009). La mutation de l'arginine 38 en cystéine (R38C) conduit à une expression très faible et non fonctionnelle de la sPLA2, vraisemblablement due à un mauvais repliement de la protéine et un misappariement des ponts disulfures. Aucune activité enzymatique n'est mesurée dans le surnageant de cellules transfectées avec un plasmide codant pour la sPLA2 avec la mutation R38C.

5. Etude de la maturation de la sPLA2-X

Un élément-clé de la régulation fonctionnelle de la sPLA2-X est vraisemblablement lié à la présence du propeptide dans la partie N-terminale de la protéine (27, 62).

La sPLA2-X et la sPLA2-IB pancréatique sont les deux seules sPLA2 possédant un propeptide. Dans le cas de la sPLA2-IB, l'enzyme est sécrétée sous la forme d'une proenzyme, le propeptide est constitué de 7 acides aminés et se termine par une arginine qui est clivée par la trypsine dans le duodénum, permettant l'activation de l'enzyme (13, 255). Dans certains tissus, la maturation serait assurée par la plasmine ou d'autres protéases de type trypsine (256-257).

Pour la sPLA2-X, la présence d'un propeptide terminant par un doublet dibasique suggère soit une activation intracellulaire par des protéases de type furine, soit une activation extracellulaire par des protéases de type furine ou trypsine (27). Les travaux effectués après transfection de la sPLA2 humaine ou de souris dans des cellules comme les HEK293 (human embryonic kidney), les CHO (chinese hamster ovary), les PC12 (phéochromocytomes de rat) ou les BEAS (bronchial airway epithelial cell) montrent que l'enzyme est sécrétée soit sous forme mature, soit sous la forme d'un mélange de proenzyme et enzyme mature, et les mécanismes responsables de la conversion enzymatique restent mal déterminés (27-28, 62, 238, 242). Masuda et al. ont proposé que la maturation de la sPLA2-X pouvait plutôt se faire juste après la sécrétion de l'enzyme, au niveau de la membrane plasmique, mais cette hypothèse repose sur des arguments faibles, tels que 1) la présence des formes mature et proenzyme dans les cellules et mature seulement dans le milieu de culture, 2) l'inhibition de l'effet de la sPLA2 sur la neuritogénèse par des anticorps ajoutés dans le milieu (238). Dans leur ensemble, ces résultats ne permettent donc pas de trancher entre deux hypothèses : 1) le clivage de l'enzyme se fait préférentiellement en intracellulaire, mais l'enzyme de maturation se retrouve saturée par la sur-expression de la sPLA2, et ceci conduisant à la sécrétion d'un mélange proenzyme/enzyme mature; et 2) la sPLA2 est sécrétée sous forme de proenzyme et le clivage de l'enzyme se fait exclusivement en extracellulaire. La surexpression de la sPLA2 conduit là-aussi à une saturation de l'enzyme de conversion et les deux formes proenzyme/enzyme mature sont présentes dans le milieu de culture.

La sPLA2 de groupe X a aussi été détectée de façon endogène dans de nombreux types cellulaires ou dans des lavages bronchoalvéolaires de patients asthmatiques, mais son expression dans ces cellules ou fluides biologiques n'a pas été suffisamment caractérisée pour déterminer où et comment se faisait la maturation et sous quelle forme (proenzyme, forme

mature ou mélange) était sécrétée l'enzyme (167, 230, 232-233, 238, 248). Une des raisons expliquant la difficulté de l'analyse provient du fait du faible voire très faible expression de la sPLA2-X dans ces cellules ou extraits tissulaires.

Enfin, l'analyse des souris transgéniques surexprimant la sPLA2-X humaine montre que les deux formes proenzyme et mature sont présentes dans le sérum et la plupart des tissus, ces résultats laissant toujours ouverts la question du site de maturation protéolytique et le type de protéase impliquée (155). Les travaux avec ces souris transgéniques ont cependant permis de suggérer que la maturation protéolytique de la sPLA2-X pouvait être activée par un contexte inflammatoire, alors que l'enzyme demeurerait inactive en condition normale.

Par ailleurs, quelques études indiquent que la sPLA2-X pourrait suivre une voie de sécrétion différente des autres sPLA2 dans certaines cellules ou bien être retenue dans certains compartiments subcellulaires pendant sa sécrétion. Par exemple, la sPLA2-V et la sPLA2-X sont toutes deux exprimées par les neutrophiles humains et la lignée de granulocytes PLB, mais seule la sPLA2-V est sécrétée dans le milieu extracellulaire lors d'une stimulation par le FMLP ou d'autres agonistes (230, 248). La sPLA2-X reste stockée dans les granules azurophiles des neutrophiles sous une forme proenzyme ou mature. Dans les cellules NHPF (*normal human pulmonary fibroblasts*) transfectées avec la sPLA2-X, cette dernière semble être plus retenue au niveau du réticulum endoplasmique que les autres sPLA2 transfectées en parallèle. Ce qui pourrait être expliqué par un défaut de clivage du propeptide au cours de la sécrétion (237). Dans les cellules PC12 transfectées, la sPLA2-X semble s'accumuler au niveau de l'appareil de Golgi avant sa sécrétion et dans les cones de croissance (à partir desquels la sPLA2 pourrait être sécrétée), et ce malgré une sécrétion apparemment efficace, puisque plus de 90% de la sPLA2 se retrouve présente dans le milieu de culture (238).

Les résultats de la littérature obtenus à ce jour ne permettent donc pas de déterminer le lieu de la maturation protéolytique de la sPLA2-X, dans la cellule avant sécrétion ou à l'extérieur après sécrétion de la proenzyme. De plus, il n'existe aucune étude précisant le type de protéase permettant l'activation de la sPLA2-X et les conditions physiologiques ou physiopathologiques dans lesquelles se fait cette maturation.

Comme tenu de la présence d'un doublet dibasique dans le propeptide, le clivage protéolytique de la sPLA2-X pourrait se faire par une protéase de la famille des proconvertases composée de la furine (PC3), PC1, PC2, PACE4, PC4, PC5 et PC7. Ces protéines régulent l'activation d'un large spectre de protéines cellulaires comprenant des facteurs de croissance, des neuropeptides, des récepteurs, des enzymes et même des toxines (258). Ces

convertases sont impliquées dans des pathologies telles que le cancer (259), les maladies neurodégénératives (260) et les maladies inflammatoires.

Afin de rechercher les protéases susceptibles de couper le propeptide de la sPLA2-X au niveau du doublet dibasique RR ou KR, nous avons utilisé le site MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) qui répertorie un grand nombre de protéases et possède un moteur de recherche de prédiction de coupure. En jouant sur les paramètres de sélection, il ressort que plusieurs pro-convertases dont la furine, PC1 et PC2, ainsi que la trypsine, l'hepsine et certaines kallikréines seraient capables de cliver le propeptide des sPLA2-X humaine et murine. Bien que cette recherche reste non exhaustive, la furine semble un candidat évident. La furine est une protéase à sérine identifiée en 1990 (258, 261-262). Cette pro-convertase est présente chez tous les vertébrés et coupe après des doublets dibasiques. Le consensus de coupure proposé par le site MEROPS et retrouvé dans diverses revues est R-X-K/R-R, mais la sélectivité de la furine semble plus large. Par exemple, Krysan et al. ont montré que la furine est capable de cliver le motif Arg-X-X-Arg (263) ou Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (262). La capacité réelle de coupure dépend de l'environnement structural (264). La furine est constituée de 794 résidus, peut agir à un pH compris entre 5 et 8 et son activité protéolytique est dépendante du calcium (265). Cette protéase est présente dans la majorité des cellules. Elle est surtout présente dans le trans-Golgi (TGN), mais recycle entre les endosomes et la voie de sécrétion et est aussi retrouvée à la surface des cellules et dans le milieu de culture (261). La furine active une variété de substrats dont des facteurs de croissance, des hormones, des facteurs de coagulation (261, 266), des protéines de la matrice extracellulaire tel que l'ectodyslasin-A (RVRREKR) (267), des protéines virales et des toxines bactériennes. Il existe de nombreux inhibiteurs de la furine dont le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH₂Cl et l' α 1-antitrypsine qui inhibe non seulement la furine mais aussi les autres pro-convertases (268). La furine joue un rôle essentiel dans de multiples conditions physiologiques et physiopathologiques. La délétion du gène furine est létale au stade embryonnaire (269) et la furine joue des rôles clés dans le cancer, le diabète, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et les maladies infectieuses virales ou bactériennes (262). L'expression de la furine et des autres proconvertases est augmentée dans différentes pathologies dont plusieurs cancers (270-271).

Les autres protéases capables de cliver le propeptide de la sPLA2-X comme la trypsine, l'hepsine ou les kallikréines sont activées ou sécrétées au cours de l'inflammation dans de multiples tissus ou fluides biologiques comme la peau ou le liquide séminal, et sont

exprimées à des niveaux élevés dans différents cancers comme le cancer du côlon (259, 272-275).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

Les cellules HEK 293 (*Human Embryonal Kidney*) ont été données par le Dr. V Braud (IPMC) et proviennent de l'ATCC. Ces cellules ont été choisies pour leur absence de résistance à la zéocine.

Pour les tests de maturation de la proPLA2-X, les surnageants de différentes lignées cellulaires ont été utilisés :

- ⇒ cellules d'adénocarcinome colique humain LOVO donnés par le Dr. B. Vincent (IPMC).
- ⇒ cellules d'adénocarcinome colique murin C26 (ATCC, CRL-2638) provenant de Cell Lines Services (Heidelberg).
- ⇒ cellules d'ovaires d'hamster chinois CHO (ECACC).
- ⇒ surnageant des spermatozoïdes de souris invalidées pour la sPLA2-X (produit au laboratoire).
- ⇒ lavage broncho alvéolaire de souris saines et infectées par *P.aeruginosa* (Dr L. Touqui, Institut Pasteur) et des souris soumises à un protocole d'asthme avec l'ovalbumine comme allergène (Dr V.Julia, IPMC).

Les milieux Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) et F-12 Nutrient Mixture (Ham F-12) proviennent d'Invitrogen. Le sérum de veau fœtal et la zéocine proviennent respectivement de Perbio et d'Invivogen. L'albumine de sérum bovin (BSA) déplété en acide gras (fatty acid free, FAF) est de Sigma. La thymidine, l'acide oléique et l'acide arachidonique tritiés ont été commandés chez Perkin Elmer Life Sciences. Les anticorps polyclonaux ciblant la sPLA2-X ont été gracieusement donnés par le Dr. M.H. Gelb. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase proviennent de GE Healthcare et le substrat ECL est fourni par Pierce. Les protéines A sépharose sont fournies par Invitrogen. Le kit de dosage TR-FIA (*Time-resolved fluoroimmunoassay*) provient de Perkin Elmer Life Sciences.

Un kit d'inhibiteurs de protéases (Roche) a été utilisé. Il contient 10 inhibiteurs dirigés contre différents types de protéases à des concentrations différentes. Ces inhibiteurs sont l'antipaine, la bestatine, la chymostatine, l'E64, la leupeptine, la pepstatine, le phosphoramidon, le pefabloc, l'EDTA et l'aprotinine. Nous avons aussi utilisé des inhibiteurs spécifiques de la furine : décanoyl-RVKR-CMK et hexa-D-arginine (Merck) et des cocktails d'inhibiteurs comme indiqué dans le tableau 2.

inhibiteurs	Masse molaire (Da)	Spécificité
Antipaine	677.6	Papaine, trypsine
Bestatine	308.4	AminopeptidaseB, leucine-aminopeptidase et tripeptide aminopeptidase
Chymostatine	607.7	Chymotrypsine
E-64	357.4	Protéases à cystéine
Leupeptine	475.6	Protéases à sérine et à cystéine (plasmine, trypsine, papaine, cathepsine B...etc)
Pepstatine	6859	Protéases à aspartate (pepsine, cathepsine D, chymosin...etc)
Phosphoramidon	543.5	Métalloendopeptidases (thermolysine, collagénase, etc.)
Pefabloc	239.5	Protéases à sérine (trypsine, chymotrypsine, plasmine, thrombine.
Aprotinine	6512	Protéases à sérine
Complete (aprotinine, bestatine, calpaine I et II, chymostatine, E64, leupeptine, macroglobuline, pepstatine, PMSF pefabloc).		Thermolysine, chymotrypsine, trypsine, papaine
Set I (AEBSF, aprotinine, E64, EDTA, leupeptine)		Protéases à sérine et à cystéine.
Set III (AEBSF, aprotinine, bestatine, E64, leupeptine, pepstatine A)		Aminopeptidases, protéases à aspartate, à cystéine et à sérine, trypsine-like.
1,10 phénanthroline	198.22	Métallopeptidases à zinc
Bathophénanthroline	332.4	Métallopeptidases à zinc
Décanoyl-RVKR-CMK	744.4	Furine et autres proconvertases
Hexa-D-arginine (hexa-R)	953	Furine et autres proconvertases
Alpha1-antitrypsine	47	Furine et autres proconvertases

Tableau 2 : Spécificité des différents inhibiteurs utilisés.

Différentes protéases purifiées ont été testées pour leur capacité à couper les proPLA2-X de souris et humaine recombinantes. Ces protéases ont été choisies selon leur spécificité de coupure : plasmine, thrombine, furine, kallikreine (5, 6 et 12), cathepsine B, protéine C, UPA, tryptase, trypsine, enterokinase et l'endoprotéinase Arg-C.

II. Production recombinante des formes proenzymes humaines et murines de groupe X

1. Clonage

a) Construction du vecteur d'expression PromGX-WT/pAB3

La construction PromGX-WT/pAB3 contient la partie N-terminale de la GST suivie du site de coupure par le facteur Xa (IEGR) suivi par la séquence du propeptide et de la sPLA2-X murine mature. Pour préparer cette construction, le cDNA codant pour la proPLA2 de groupe X murine sans son peptide signal (PromGX-WT) a été obtenu par PCR sur des cDNA de côlon sain et tumoral de souris hybridés avec deux oligonucléotides de 43 bases contenant le site de coupure par le facteur Xa et les sites de coupure BamHI/ECORI permettant l'insertion dans le vecteur pAB3 (18). La PCR a été réalisée avec la polymérase *Pyrococcus Furiosus* (Pfu) avec 35 cycles d'hybridation (64°C/30sec), élongation (72°C/30sec) et dénaturation (95°C/30sec). Les fragments de PCR ont été analysés sur gel d'agarose 1%, purifiés avec le kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel) et insérés dans le vecteur pAB3 aux sites de restriction BamHI/EcoRI.

b) Construction des vecteurs d'expression ProhGX/pAB3 et ProhGX-HA/pAB3

Les gènes codant pour les proPLA2-X humaines (ProhGX et ProhGX-taggué HA) ont été construits en utilisant comme matrice la construction pRc-CMV/hGX (27). Ces gènes ont été obtenus par PCR selon le même principe que ci-dessus en utilisant la pfu, des oligonucléotides spécifiques et 25 cycles d'hybridation (68°C/30sec), élongation (72°C/30sec) et dénaturation (95°C/30sec). Les fragments de PCR ont été analysés sur gel d'agarose 1%, purifiés avec le kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel), puis ligués dans le vecteur pAB3 aux sites de restriction BamHI/EcoRI.

c) Construction des mutants ponctuels de PromGX dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 zéo+

Le cDNA codant pour la proenzyme murine (PromGX-WT) et contenant le peptide signal a été obtenu comme ci-dessus mais avec des oligonucléotides contenant les sites de coupure NotI/XbaI permettant la ligation dans le vecteur pcDNA3.1 zéo+. Trois mutations (AR, KA et AA) au niveau du site de clivage de la proPLA2-X murine ont ensuite été construites par PCR en utilisant comme matrice d'ADN la construction pcDNA3.1zéo+/PromGX-WT et comme amorces des oligonucléotides de 30 bases inverses

complémentaires portant les mutations désirées. Après purification des fragments de PCR, l'ADN et le vecteur vide pcDNA3.1 zéo+ ont été coupés par NotI/XbaI et ligués.

Toutes les constructions obtenues ont été entièrement séquencées.

sPLA2 humaine du groupe X (hGX) :

PEPTIDE SIGNAL :

MGPLPVCLPIMLLLLLPSLLLLLLLLPGPGSG

PROPEPTIDE

EASRILRVHRR

PROTÉINE MATURE

GILELAGTVGCVGPRTPIAYMKYGCFCGLGGHGQPRDAIDWCCHGHDCCYTRAEAA
GCSPKTERYSWQC VNQSVLCGPAENKCQELLCKCDQEIANCLAQTEYNLKYLFYPQF
LCEPDSPKCD

sPLA2 murine du groupe X (mGX) :

PEPTIDE SIGNAL

MLLLLLLLLLLPGPGGFS

PROPEPTIDE

EATRRSHVYKR (forme sauvage)

EATRRSHVYAR (mutant AR)

EATRRSHVYKA (mutant KA)

EATRRSHVYAA (mutant AA)

PROTÉINE MATURE

GLLELAGTLDLCVGRSPMAYMNYGCYCGLGGHGEPDAIDWCCYHHDCCYRAQD
AGCSPKLD RYPWKCMDHHILCGPAENKCQELLCRCDEELAYCLAGTEYHLKYLFPS
ILCEKDSPKCN

TAG-HA:

YPYDVPDYA

SITE FACTEUR Xa:

IEGR

2. Production des protéines recombinantes

La production recombinante des proPLA2 de groupe X murine et humaine et de la forme humaine avec un tag HA en C-terminal a été effectuée dans les bactéries *E. coli* BL21 après transformation chimique et sélection à l'ampicilline. A partir d'une colonie isolée, les bactéries sont cultivées dans 2 litres de « terrific broth » contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 0,8 l'expression est induite avec 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) pendant la nuit à 37°C. Les bactéries sont centrifugées et le culot est repris dans 100 ml de tampon de lyse avec détergent (50 mM Tris/HCl pH8.0, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 et 1% deoxycholate de sodium). La suspension est soniquée à plusieurs reprises en présence de 5 mg de lysozyme, 1,5 mg de DNase I et 10 mM MgCl₂. Après incubation d'une heure à 37°C, les corps d'inclusion sont

purifiés par une série de centrifugation (10 000 rpm, 15 min) et lavage du culot, (les deux premières fois dans le tampon de lyse avec détergent et les deux fois suivantes dans le même tampon sans détergent). Les protéines contenues dans les corps d'inclusion sont quantifiées par la technique de Bradford et par électrophorèse sur gel SDS-PAGE à partir d'un aliquot solubilisé dans 7 M guanidine/ 50 mM Tris/HCl pH 8.0. Les corps d'inclusion sont ensuite divisés en 4 aliquots de 100 mg et les culots sont conservés à -20°C. Le rendement de production est de l'ordre de 200 mg/ml de protéine de fusion.

Pour l'étape de refolding (repliement de la protéine) un aliquote de corps d'inclusion est solubilisé dans 35 ml de tampon de solubilisation (7 M guanidine, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.3 M Na₂SO₃) et les cystéines sont sulfonées dans 15 ml de réactif de Thannhauser pendant 24h à 56°C (276). Après 24 h de dialyse contre 8 litres d'acide acétique à 1% avec un changement du bain de dialyse, les protéines précipitées sont collectées par centrifugation (10 000 rpm, 10 min).

Le culot est repris dans 6 ml de 6 M guanidine, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM L-méthionine et ajouté par la dilution rapide (goutte à goutte sous agitation) dans 2 litres de tampon de renaturation (0,9 M guanidine; 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 0,8 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 5 mM L-cystéine; 5 mM SB12; 5 mM L-méthionine) puis incubé à l'abri de la lumière pendant trois jours à température ambiante.

Après concentration par ultrafiltration à l'aide d'une cellule Amicon équipée d'une membrane YM-10 et échange contre le tampon FXa (100 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 1mM CaCl₂; 5mM SB12), la quantité de protéine récupérée est quantifiée par gel SDS-PAGE. Environ 20 mg de protéine soluble ainsi obtenue sont digérés par 400 unités de Factor Xa (Amersham Biosciences). La coupure par le FXa a été suivie par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager DE Pro ABI) pour vérifier que le clivage n'aboutit pas à l'activation de la forme proPLA2. Malgré la spécificité attendue du facteur Xa, nous avons observé que ce dernier avait coupé au site attendu IEGR, mais avait aussi partiellement coupé au milieu du propeptide après le doublet RR, ce qui a conduit à une baisse du rendement de production et à l'obtention d'une forme inattendue appelée « mipromGX ». La solution est diluée dans le tampon 1% acide acétique (ACOH); 1mM L-méthionine; 10% acétonitrile (ACN) pH3.0, filtrée puis chargée sur une colonne HPLC échangeuse d'ions TSK-SP (Tosoh). L'élution est effectuée à 1 ml/min avec un tampon 0,5 M NaCl; 25 mM acétate d'ammonium (ACNH₄) pH 6.8 dans H₂O/ACN (50/50). La protéine est éluée à 360 mM NaCl. Les fractions contenant la proPLA2-X sont chargées sur une colonne HPLC analytique en phase inverse C18 (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée en H₂O/ACN/TFA (90/10/0,1%) (TFA, acide

trifluoroacétique); 1mM L-méthionine. L'éluion de la protéine est effectuée à 3ml/min en utilisant un gradient linéaire d'ACN (10-50% en 150 min). La proPLA2-X est éluée à 32% ACN. 5 mg de PromGX, 250 µg de ProhGX et 374 µg de ProhGX-HA ont pu être obtenus.

Les 3 protéines ainsi obtenues ont été quantifiées par DO₂₈₀ et par gel SDS-PAGE 14% puis analysés par spectrométrie de masse. Elles ont ensuite été lyophilisées et stockées sous forme d'aliqots secs à -20°C.

Une forme recombinante PromGX-AR dans laquelle le résidu basique en position-1 du site de coupure a été muté en alanine a aussi été produite dans E. coli de la même manière que pour PromGX-WT, mais à partir d'une construction dans le vecteur pET21a permettant la production de la protéine sous forme Met-protéine (36).

III. Etude de la maturation de la proPLA2-X

1. Etude *in vitro*

1.1 Maturation des protéines recombinantes par des protéases purifiées

Le test de maturation a été fait en présence de 500 ng de chaque proPLA2 (promGX-WT, promGX-AR et prohGX-WT) et différentes protéases purifiées tel que la trypsine, la plasmine, furine, kallikréine, tryptase, entérokinase, endoR-C...etc. La réaction de coupure a été faite dans 100 µl de tampon FXa (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0). Après 24 h d'incubation à 37°C, le test de coupure est arrêté par 50 µl de 0,1 % TFA. L'activité phospholipase A2 a été mesurée avec 5 µl de réaction de maturation et le reste de la réaction a été utilisé pour des mesures par spectrométrie de masse.

1.2 Maturation dans des cellules HEK 293 transfectées

a) Transfection dans les cellules HEK 293

Les cellules HEK 293 sontensemencées à 1 million de cellules par boîte de diamètre 35 mm. 24 heures après ensemencement, les cellules sont transfectées à la lipofectamine 2000.

4 µg d'ADN plasmidique (codant pour PromGX-WT, AR, KA, AA et ProhGX) sont mélangés avec 10 µl de lipofectamine 2000, incubés pendant 30 min à température ambiante dans du milieu DMEM, sans sérum et sans antibiotique, puis ajoutés aux cellules fraîchement lavées avec du DMEM/10% sérum.

Après 48 h d'incubation à 37°C, les surnageants cellulaires sont récupérés, les cellules sont dissociées etensemencées dans des boîtes de diamètre de 150 mm afin de sélectionner les clones stables en présence de 0,4 mg/ml de zéocine. Les différents clones ont été isolés par la technique des « confettis » qui consiste à dissocier les colonies avec des disques de papier filtre préalablement trempés dans une solution de dissociation trypsine-EDTA. Le niveau d'expression des clones est analysé par mesure de l'activité sPLA2 et TRFIA.

b) Dosage d'activité sPLA2

- ✚ Synthèse du substrat : la mesure de l'activité enzymatique sPLA2 sur les membranes d'*E.coli* consiste à mesurer la capacité des sPLA2 à libérer l'acide oléique tritié préalablement incorporé dans les phospholipides (83). Les membranes d'*E.coli* marquées à l'acide oléique ont été préparées de la façon suivante : 1 ml d'une culture saturée de bactérie *E.coli* XL1 a été dilué dans 75 ml de milieu LB contenant 500 μCi [^3H]-oléate et la culture bactérienne est incubée pendant 4 heures à 37°C. Les bactéries sont centrifugées, resuspendues dans 50 ml de milieu LB et remises en culture à 37°C pendant 30 minutes pour éliminer l'acide oléique non incorporé. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé avec 1 ml de 0,1 M Tris/HCl pH 8.0; 1 mM EDTA et 0,5% BSA délipidée (*fatty acid free* BSA, FAF, sigma), à nouveau centrifugé puis resuspendu dans 2 ml de 0,1 M Tris/HCl pH 8.0; 1 mM EDTA. La suspension est autoclavée (120°C, 15 min), lavée par centrifugation et stockée en aliquots à -20°C.
- ✚ mesure de l'activité sPLA2 : la mesure d'activité enzymatique des sPLA2 est effectuée à température ambiante, pendant des temps d'incubation variables (5 min à 1 heure) dans 300 μl de tampon d'activité (0,1 M Tris/HCl pH 8.0; 10 mM CaCl_2 ; 0,1% BSA) contenant environ 100000 dpm de membranes radiomarquées. Les réactions sont arrêtées par l'addition de 300 μl de tampon stop (0,1 M EDTA; 0,2% BSA FAF), centrifugées à 14000 rpm pendant 5 min et les surnageants contenant l'oléate radiomarké libéré sont comptés.

c) Western blot

Le surnageant concentré de cellules transfectées ou les lysats cellulaires sont dilués dans le tampon de Laemmli supplémenté en β -mercaptoéthanol puis chauffés à 95°C pendant 10 min. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel de SDS polyacrylamide 14%. Le transfert du gel sur membranes de polyvinylidene fluoride (PVDF) est effectué en présence de 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% éthanol pH 8.5. La membrane est ensuite bloquée sur la nuit dans du NETG (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,05% Triton X-100, 0,25% gélatine), et incubée pendant 1 h avec le sérum polyclonal de

lapin dirigé contre mGX (1/1000 dans NETG). Les membranes sont ensuite lavées dans le NETG puis incubées en présence d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase (1/10000 dans NETG). L'activité de la peroxydase est révélée par l'ajout du réactif ECL (*Enhanced Chemiluminescence Substrate* ECL, Pierce).

d) Immunoprécipitation

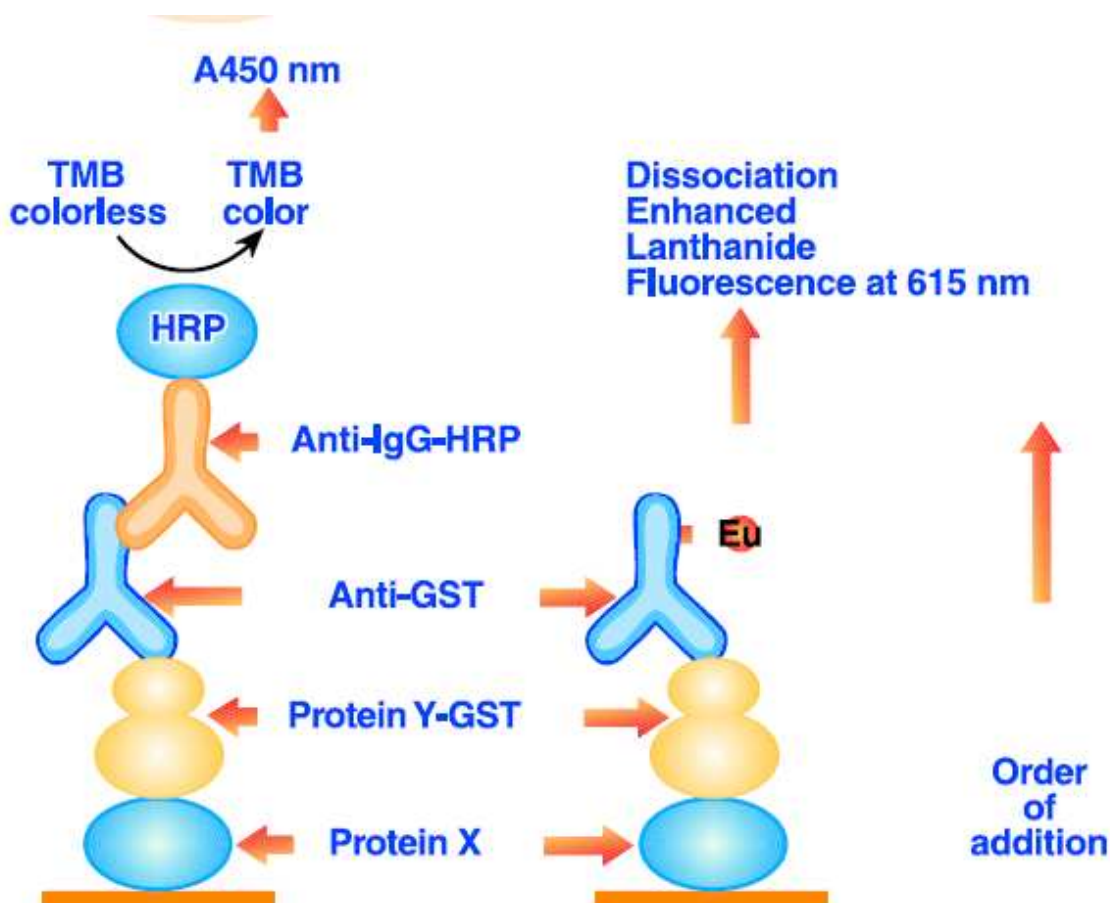
Les surnageants ou les lysats cellulaires (lyse faite dans un tampon RIPA : 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 1% Triton X-100; 0,25% DOC; 0,1% SDS; 150 mM NaCl; 5 mM NaF en présence d'inhibiteur de protéases) sont incubés pendant 4 h à 4°C et sous agitation en présence de 15 µl d'anticorps polyclonal dirigé contre la sPLA2-X mature de souris puis incubés pendant 16 h à 4°C en présence de 30 µl de protéine A-Sépharose. Le complexe immun est isolé par centrifugation pendant 10 min à 14000 rpm à 4°C, lavé à 4°C avec du PBS-tween 0,1%. Les échantillons sont analysés par Western-blot et spectrométrie de masse.

e) TR-FIA

A l'aide de l'anticorps polyclonal dirigé contre la sPLA2-X mature de souris, nous avons pu mettre au point un test de dosage quantitatif et très sensible de la sPLA2-X par TR-FIA (*Time-resolved fluoroimmunoassay*) (Figure 7) en suivant la méthode initialement développé par Eerola et al.(100). Cette méthode est environ 1000 fois plus sensible que la technique de western-blot, et permet de détecter moins de 5 pg de sPLA2-X (100). Du fait de l'anticorps utilisé, il faut noter que cette méthode détecte aussi bien la forme mature que la forme proenzyme de la sPLA2-X.

Les plaques de microtitration (Delfia yellow plate ref AAAND-0001) sont incubées sur la nuit avec 1 µg d'IgG totales de lapin dirigées contre la sPLA2-X mature (Les IgG ont été prépurifiées sur protéine A) diluées dans 100 µl de tampon 0,1 M phosphate de sodium pH 4,9. Chaque puits est ensuite saturé par un tampon de blocage (0,9% NaCl; 0,05 M Tris/HCl pH 7,8; 0,05% NaN₃; 6% D-sorbitol; 1% BSA; 1 mM CaCl₂) pendant 2 h à température ambiante et sous atmosphère humidifiée par une solution TSA (Tris-saline-azide, 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 0,9% NaCl; 0,05% NaN₃) puis lavé avec le tampon de rinçage (0,9% NaCl; 0,02% Tween 20; 0,05 M Tris/HCl pH 7,8; 0,05% NaN₃). Les extraits protéiques à doser, préalablement quantifiés par un dosage de protéine (277), sont dilués dans le tampon « Assay buffer » 0,9% NaCl; 0,05 M Tris/HCl pH 7,8; 0,05% NaN₃; 0,5% BSA; 0,01% Tween 40; 20 µM DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) et incubés pendant 1 h à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec le tampon de rinçage. Ils sont ensuite incubés pendant 1 h avec 100 µl d'une solution à 0,1 µg/ml des mêmes IgG de lapin, mais préalablement marqués à l'euporium (kit de marquage Delfia Perkin Elmer #1244-302).

Après lavage, la révélation se fait par ajout de l'Enhancement Solution (Perkin Elmer #1244-105) qui va permettre de libérer l'euporium chélaté lié aux anticorps marqués. Après 10 minutes de réaction, la fluorescence de l'euporium est lue avec un lecteur de microplaque à fluorescence en temps résolu (modèle Envision Perkin Elmer).



The simplest DELFIA format uses a generic europium labeled antibody to replace HRP labeled antibodies in ELISA based assays.

Figure 7: Principe de la technique de TR-FIA (*Time-Resolved Fluoroimmunoassay*). Dans notre cas, les anticorps spécifiques de la sPLA2 sont adsorbés sur la phase solide à la place de la protéine X, les sPLA2 et les anticorps marqués à l'euporium forment un complexe. L'euporium chélaté devient très fluorescent ce qui donne un dosage sensible des sPLA2.

f) Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par les Dr. Sabine Scarzello et Anne-Sophie Dabert-Gay au sein du plateau de protéomique de l'institut. Dans la plupart des cas, les échantillons fournis ont été dessalés par purification en phase solide sur support Zip-Tip C18 (Millipore) en suivant le protocole du fabricant et en éluant la sPLA2 avec une

solution H₂O/ACN/TFA (20/80/0,1). La sPLA2 éluée est co-cristallisée avec la matrice organique (acide sinnapinique) sur des plaques d'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*) et les mesures sont effectuées en utilisant une méthode optimisée pour la mesure de masse moléculaire des sPLA2 (36).

g) Profil d'inhibition de la maturation dans les clones stables des cellules HEK

Les clones des cellules HEK-293 PromGX-WT, et ProhGX sont ensemencées en plaques 48 puits (28.000 cellules/puits) et incubées pendant quatre jours en milieu complet en présence de 0,2 mg/ml de zéocine. Les cellules sous-confluentes sont ensuite lavées en milieu DMEM sans sérum et incubées pendant 24 heures dans du milieu DMEM supplémenté avec 0,02% BSA FAF et différents inhibiteurs spécifiques des protéases (orthophenanthroline, bathophenanthroline, deux inhibiteurs spécifiques de la furine : hexa-R et Décanoyl-RVKR-CMK, antipaine, alpha1-PDX, chymostatine, E64, leupeptine, pepstatine, phosphoramidon, pefabloc, aprotinine, complete et STI). Les surnageants et les lysats cellulaires sont ensuite récupérés pour dosage d'activité PLA2.

h) Prolifération cellulaire par incorporation de la thymidine tritiée

Les cellules HEK-293 (5000 cellules/puits) sont ensemencées en plaques 48 puits et incubées pendant 72 heures en milieu complet. Les cellules sont ensuite lavées en milieu sans sérum et rendues quiescentes par incubation pendant 24 heures dans du milieu sans sérum supplémenté avec 0,02% BSA FAF. Les cellules sont ensuite traitées en triplicat avec les différents effecteurs dans 200 µl de milieu sans sérum contenant 0,02% BSA FAF et incubées 24h à 37°C. Pendant les 4 dernières heures d'incubation, les cellules sont traitées avec un mélange de [³H]-thymidine/thymidine froide (1µM, 1µCi/ml). Chaque puits est ensuite lavé 2 fois avec du PBS et incubé pendant 30 min dans de l'acide trichloroacétique 10% froid. Les cellules sont lysées dans NaOH 0,2 N, les lysats sont récupérés et comptés après ajout de liquide scintillant afin de déterminer le taux d'incorporation de [³H]-thymidine dans l'ADN cellulaire.

i) Libération d'acide arachidonique

Les HEK-293 sont ensemencées à 5000 cellules par puits en plaque 48 puits pendant 72h, puis incubées pendant 24 h dans du milieu complet (DMEM/10% sérum) avec 0,1 µCi/puits d'acide arachidonique tritié (Perkin Elmer). Les cellules sont lavées deux fois avec du DMEM complet et incubées pendant 6 heures en présence des sPLA2 ou autres effecteurs. Le surnageant est récupéré, centrifugé à 14000 rpm pendant 5 min et compté en présence de liquide scintillant. Les cellules sont aussi récupérées et comptées pour déterminer le

pourcentage d'acide arachidonique libéré dans le milieu par rapport à la quantité incorporé ($\% = 100 * \text{dpm (sgt)} / (\text{dpm (sgt)} + \text{dpm (lys)})$).

1.3 Maturation des protéines recombinantes par différents surnageants conditionnés

🚩 Surnageant conditionné des cellules HEK 293 et LOVO :

Pour produire les surnageants conditionnés des cellules, HEK et LOVO, 80 boîtes de Pétri de diamètre 150 mm ont étéensemencées avec environ 2 millions de cellules par boîte en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% SVF (sérum de veau foetal). Les cellules ont été cultivées dans le milieu complet pendant 3 à 4 jours jusqu'à 80% de confluence. Le milieu de culture a alors été remplacé par un milieu DMEM avec 0.1% BSA pendant 6 jours. Le surnageant cellulaire (2 litres) a été récupéré, centrifugé et concentré sur cellule amicon avec une membrane YM10 (seuil de coupure de 10 kDa). Un test de maturation typique est réalisé avec quelques microlitres de surnageant concentré en présence de 500 ng de proPLA2 recombinante dans 100 μ l de tampon facteur Xa (cf ci-dessus). Le mélange surnageant-proenzyme est incubé à 37°C pendant 24 h, puis analysé pour son activité enzymatique et par spectrométrie de masse.

D'autres surnageants de cellules CHO ou de fibroblastes embryonnaires de souris ont été obtenus de la même façon, mais en petite quantité. Ces surnageants n'ont pas été concentrés sur cellule Amicon.

🚩 Lavages bronchoalvéolaires (bronchoalveolar, BAL) et spermatozoïdes de souris

Les différents BAL de souris asthmatiques ou de souris infectées par instillation intratrachéale avec la bactérie *P.aeruginosa* ont été préparés dans les laboratoires des Dr. Valérie Julia (asthme) et Dr. Lhousseine Touqui (*P.aeruginosa*). Ces surnageants proviennent de souris Balb/C (asthme) ou C57/Bl6 (*P.aeruginosa*). Le test de maturation a été fait avec quelques microlitres de BAL en présence de 500 ng de proPLA2 recombinante. Le mélange surnageant-proenzyme est incubé à 37°C pendant 24 h, puis analysé pour son activité enzymatique et par spectrométrie de masse.

L'extraction de spermatozoïdes a été faite comme décrit dans l'article Escoffier et al à partir d'épididymes de souris. Les spermatozoïdes sont extraits des épидидymes dilacérés dans le milieu M2 par nage pendant 10 minutes à 37°C dans un incubateur avec 5% CO₂. L'étape de capacitation se fait après centrifugation douce dans un autre milieu de culture appelé M16 en ajoutant 2% de BSA-FAF à 37°C avec 5% CO₂ à différents temps d'incubation (jusqu'à 90 minutes dans nos conditions de capacitation). Après chaque incubation, les spermatozoïdes

sont centrifugés, et les surnageants et les culots sont récupérés puis congelés à -20°C (cf Escoffier et al. 2009).

✚ Maturation et purification sur HPLC

Pour certaines expériences de maturation, des quantités plus importantes de proenzyme ont été coupées par les protéases puis les sPLA2 ont été purifiées par HPLC en phase inverse. Dans ce cas, 10 μg de proPLA2 ont été coupés par 25 ng de trypsine ou 10 μl de surnageant de culture conditionné ou de BAL, pendant 24 h à 37°C dans 100 μl de tampon facteur Xa. La solution est ensuite diluée dans 50 μl de 20% acétonitrile et 0,1% TFA, puis chargée sur une colonne de phase inverse C18, POROSHELL, (2,7x75 mm) préalablement équilibrée dans 90% du tampon A ($\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA) et 10% du tampon B (ACN/0,1 % TFA). L'élution de la protéine maturée est effectuée à 1 ml/min en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile (10-50% en 40 min).

1.4 Profil d'inhibition de la maturation par des inhibiteurs spécifiques de protéases

Les différents surnageants conditionnés ou BAL ont été préincubés dans 100 μl de tampon Facteur Xa avec différents inhibiteurs spécifiques de protéases (Antipaine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; bestatine 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$; chymostatine 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; E64 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; leupeptine 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; pepstaine 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; phosphoramidon 100 $\mu\text{g}/\text{m}$; pefabloc 1mg/ml; aprotinine 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; EDTA 2 mM) pendant 20 min à température ambiante, puis incubés avec 500 ng de promGX pendant 24 h à 37°C . La réaction de coupure ont ensuite été analysées par un test d'activité sPLA2 et par spectrométrie de masse.

1.5 Maturation dans les kératinocytes humaines : HACAT

Les cellules HACAT expriment la sPLA2-X humaine de façon endogène (233). Ces cellules sontensemencées à 1 million de cellules par boîte de Pétri (diamètre 100 mm) en milieu DMEM/10% SVF et cultivées pendant 3 à 4 jours jusqu'à 80% de confluence. Le milieu est remplacé par du DMEM/0.1% BSA pendant 3 jours. Le surnageant cellulaire (80 ml) est récupéré, centrifugé et concentré sur cellule amicon avec une membrane YM10 (seuil de coupure de 10 kDa) jusqu'à 4 ml. Le surnageant concentré a été analysé par mesure de l'activité sPLA2 et une immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

2. Etude in vivo de la maturation des différents tissus de souris

Afin de déterminer si la sPLA2 de groupe X est présente sous forme proenzyme ou mature dans différents tissus de souris exprimant l'enzyme de façon endogène et si celle-ci est sécrétée dans la lumière gastro-intestinale, nous avons effectué une extraction acide à partir de

l'estomac, du contenu stomacal, du côlon distal et des selles. Pour cela, 4 souris C57/B16 mGX^{+/+} et 4 souris C57/B16 mGX^{-/-} ont été sacrifiées et les différents tissus ont été lysés au polytron pendant quelques minutes dans un tampon acide (0.1 N HCl; 50 mM NaCl; inhibiteurs de protéases). Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré après centrifugation à 14 000 rpm pendant 15 min à 4°C, puis stocké à -20°C pour analyse par activité sPLA2, analyse TRFIA et immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

Dans d'autres expériences du même type, des extractions ont été faites à partir de spermatozoïdes extraits de l'épididyme. Les expériences de capacitation ont été faites comme décrit dans l'article Escoffier et al.

RESULTATS

Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée à identifier comment pouvait se faire la maturation de la sPLA2-X à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule? Et par quel type de protéase? Et dans quel contexte physiologique ou physiopathologique?

Nous avons choisi de travailler sur la sPLA2-X de souris, ce qui a priori, devait permettre d'aborder ces questions depuis des mesures *in vitro* en tube à essai jusqu'à des mesures *in vivo* chez l'animal. De plus, contrairement à la sPLA2-X humaine, la sPLA2 de souris n'est pas glycosylée, ce qui facilitera l'analyse par western-blot et spectrométrie de masse. Cette étude de maturation a donc été réalisée principalement chez la souris en développant différents outils et méthodes d'analyse *in vitro* et *in vivo*. Certains des objectifs tels que l'obtention d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiquement dirigés contre le propeptide n'ont pas abouti et ont largement affecté notre capacité à détecter spécifiquement la forme proenzyme dans les cellules ou les tissus de souris.

Ces études sur la maturation de la sPLA2-X sont à replacer dans le contexte des fonctions physiologiques ou physiopathologiques de cette enzyme. De façon complémentaire, je me suis donc retrouvée impliquée dans diverses études fonctionnelles de la sPLA2-X (4 articles), dans lesquelles nous avons essayé de déterminer comment pouvait se faire la maturation de l'enzyme.

A. ETUDE DE LA MATURATION DE LA sPLA2-X

La régulation de l'activité d'une protéine peut se faire à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Les quelques études comparatives sur la régulation transcriptionnelle de la sPLA2 de groupe X et d'autres sPLA2 dont IIA et V indiquent que la sPLA2-X est peu régulée au niveau transcriptionnelle, que ce soit dans des conditions inflammatoires chez la souris et le rat (99) ou dans des lignées de cellules cancéreuses et des biopsies de cancer de côlon humain (25, 189, 196-197, 200). En association avec le fait que la sPLA2-X est l'une des seules sPLA2 à posséder un propeptide, ces travaux suggèrent que la régulation fonctionnelle principale de la sPLA2-X pourrait se faire par le contrôle de sa maturation protéolytique, *ie* par conversion de la proenzyme en enzyme active. La présence de la sPLA2-X sous forme proenzyme et en grande quantité dans quasiment tous les tissus des souris transgéniques la surexprimant est une autre indication que les protéases contrôlant sa maturation sont en

quantité limitante dans des conditions physiologiques, et qu'une augmentation de leur taux dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques spécifiques pourrait activer la proenzyme (155). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, seule l'enzyme mature possède une forte activité enzymatique et des propriétés de liaison au récepteur M (73, 278).

Le programme de travail concernant l'étude de la maturation de la sPLA2-X s'est déroulé en trois parties principales :

1. Etudes *in vitro* sur les proenzymes recombinantes purifiées et coupure par des protéases purifiées. Ces études ont été complétées par des expériences de coupure des proenzymes recombinantes avec des extraits cellulaires riches en protéases (milieux conditionnés, lavages bronchoalvéolaires de tissus sains et pathologiques,...) qui sont incluses dans les 2 parties ci-dessous.
2. Etudes *in vitro* en cellules transfectées et approche par mutagenèse dirigée du propeptide. Coupure de la proenzyme exogène par des surnageants conditionnés de différentes cellules.
3. Etudes *in vitro* sur cellules en culture et *in vivo* dans des tissus ou extraits exprimant la sPLA2-X de façon endogène. Coupure de la proenzyme exogène par des extraits protéolytiques issus de tissus de souris.

I. Etude *in vitro*

1. Maturation des proenzymes recombinantes par des protéases purifiées

En utilisant différentes données bibliographiques et celles trouvées sur le site MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), nous avons sélectionné une panoplie de protéases potentiellement capables d'activer la sPLA2-X. Les protéases candidates purifiées ont été achetées ou obtenues auprès de différents laboratoires académiques, puis testées pour leur capacité à cliver les proPLA2-X recombinantes murines (promGX-WT et promGX-AR) et humaine (prohGX). Ce travail a été fait en partie par une stagiaire tunisienne, Khaoula Chargui, lors de son projet de fin d'étude de l'INSAT de Tunis. Khaoula a notamment produit la forme promGX-AR.

Un premier test de coupure a été fait avec la trypsine. L'analyse des protéines recombinantes par HPLC et spectrométrie de masse avant et après activation par la trypsine montre que les protéines sont pures et fonctionnelles. La mesure de leur activité enzymatique

sur les membranes d'E.coli est indiquée dans la Figure 8 et montre une forte activation par la trypsine. La promGX coupée par la trypsine est 235 fois plus active que la forme proenzyme. La prohGX coupée par la trypsine est quant à elle 288 fois plus active. La promGX-AR est aussi activée par la trypsine.

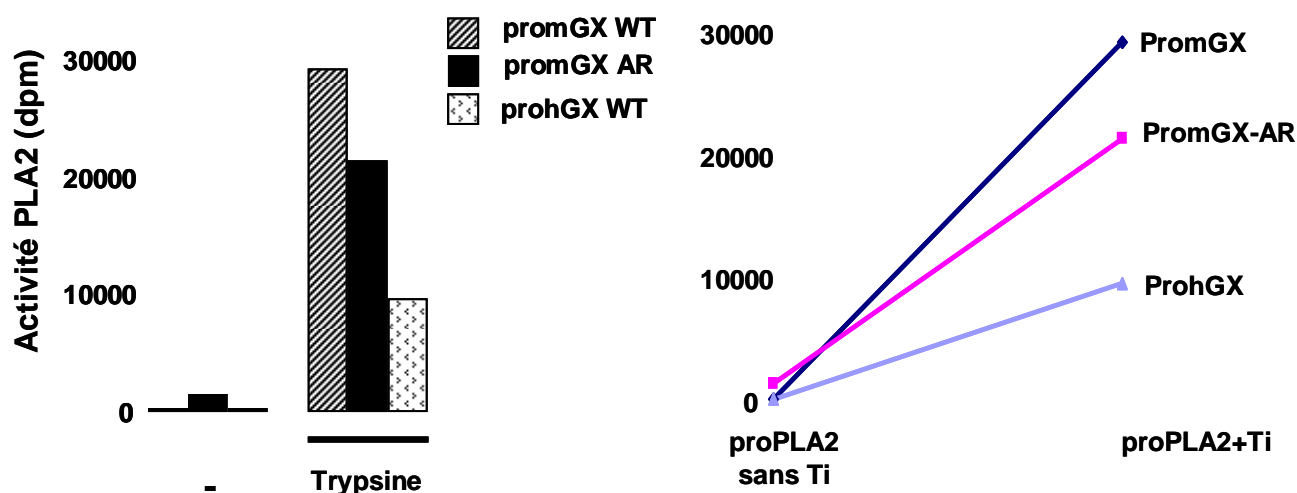


Figure 8: Test d'activation des proPLA2 par la trypsine. Les proPLA2 (500 ng) ont été incubées en présence de 50 ng de Trypsine à 37°C pendant 16 h dans le tampon Facteur Xa, puis l'activité enzymatique a été dosée en utilisant comme substrat des membranes d'E.coli radioactives (cf-méthodes).

L'analyse par spectrométrie de masse ou par un gel de SDS (Figure 9) montre que les trois protéines sont coupées exactement au site attendu et que la trypsine ne dégrade pas les protéines à d'autres sites.

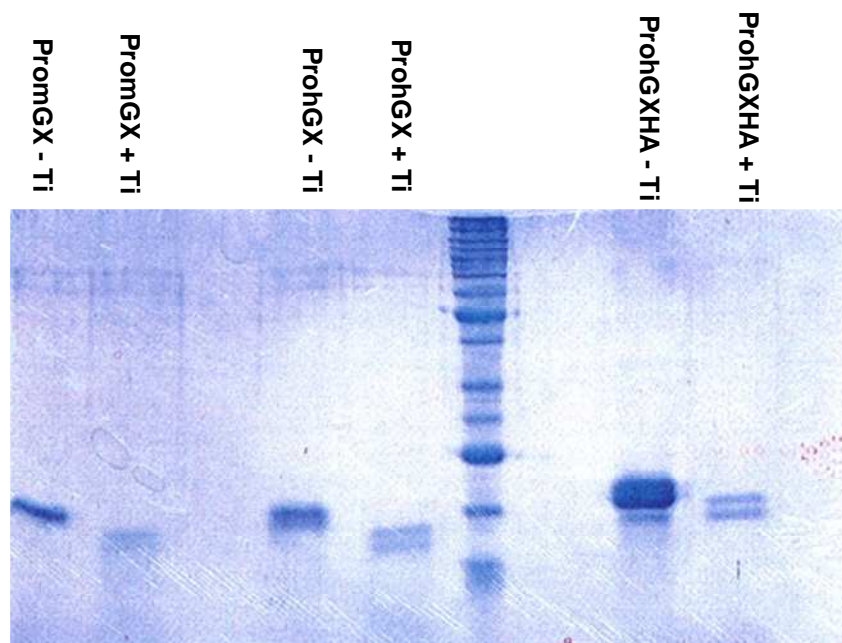


Figure 9 : Analyse de la coupure par la trypsine avec un gel de SDS-PAGE 14%.

Il est important de noter qu'une coupure laissant une partie du propeptide d'un ou plusieurs acides aminés ne permet pas d'obtenir une enzyme active. En effet, nous avons observé : 1) que l'activité enzymatique de la forme mipromGX (SHVYKR-GLL..., obtenue lors de la production recombinante après coupure par le facteur Xa) est aussi faible que celle de la proenzyme complète et 2) que l'activité enzymatique de la sPLA2 recombinante purifiée Met-hGX (MGLL...) est au moins 30 fois inférieure à celle de la sPLA2 hGX mature (GLL...). Cette forme Met-hGX a été obtenue lors d'une précédente production recombinante à partir d'une construction dans le vecteur pET21a codant pour la sPLA2 hGX mature précédée de la methionine initiatrice. Par comparaison, les formes mGV et Met-mGV produites de façon identique ont des activités très voisines (Résultats de master précédemment obtenus au laboratoire par Alexander Fürst). Ces résultats illustrent donc l'importance d'avoir une extrémité N-terminale libre, dans ce cas au niveau de la glycine de la sPLA2-X, pour obtenir une activité enzymatique maximale. Ces résultats sont sans doute à rapprocher de ceux obtenus il y a longtemps pour la sPLA2 pancréatique où la simple amidation du résidu alanine NH₂-terminal conduisait à une diminution de l'activité spécifique (279).

Nous avons ensuite testé l'effet des protéases suivantes : plasmine, thrombine, furine, kallikréine (purifiée à partir de plasma humain), kallikréine 5 (protéine recombinante avec

Tag His), kallikréine 6, kallikréine 12, cathepsine B (testée à pH 8,0 et pH 5,0), protéine C, UPA, tryptase, entérokinase, endo-arg-C, aminopeptidase B.

Suite à l'incubation des proPLA2 avec ces protéases, nous avons effectué un dosage d'activité sPLA2 (Figure 10) et une analyse par spectrométrie de masse pour vérifier si la coupure par les différentes protéases permettait bien d'obtenir la sPLA2-X sous la forme mature attendue ou bien sous d'autres formes partiellement clivées ou dégradées, ou bien encore si la protéase n'attaquait pas la proenzyme.

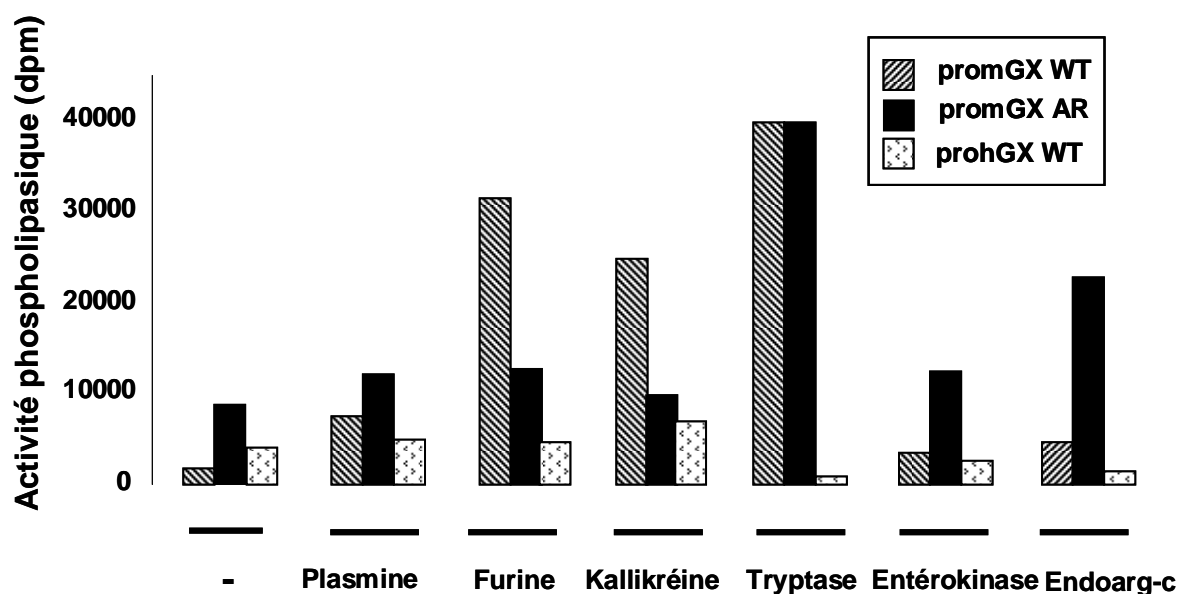


Figure 10: Maturation des trois proPLA2-X recombinantes murines (promGX-WT et promGX AR) et humaine (prohGX). Les séquences des trois propeptides sont les suivants : EA**TRRSHVYKR**, EA**TRRSHVYAR** et EA**SRILRVHRR** qui correspondent respectivement à promGX-WT, promGX-AR et prohGX. L'incubation des différentes proPLA2-X a été faite avec des quantités de protéases candidates déterminées en fonction des données fournies par les fournisseurs et pendant 24 h à 37°C dans un même tampon (tampon facteur Xa 50 mM Tris/HCl pH 8.0 contenant 100 mM NaCl et 10 mM CaCl₂). Les différentes protéases sont d'origine humaine.

D'après les tests de mesure d'activité sPLA2, il apparaît que les protéases thrombine, kallikréines 5, 6 et 12, cathepsine B, protéine C, UPA, entérokinase et aminopeptidase B sont incapables de couper ou d'activer par coupure au niveau du doublet arginine les trois types de sPLA2 d'après les tests de mesure d'activité sPLA2. Les analyses par spectrométrie de masse indiquent que ces enzymes ne coupent pas du tout les proenzymes, sauf dans le cas de la plasmine qui coupe le propeptide mais laisse les sPLA2 murine et humaine respectivement sous forme « R-mGX » et « R-hGX »; 2) l'entérokinase qui coupe le propeptide de la prohGX au milieu pour donner la forme miprohGX (données non montrées et tableau 3).

Cette dernière coupure correspond à la coupure déjà obtenue avec le facteur Xa lors de la production recombinante (cf méthodes). Ces résultats montrent donc que ces enzymes sont actives dans le tampon choisi, mais sont incapables d'effectuer la coupure jusqu'au résidu glycine de la sPLA2 et cela empêche l'activation fonctionnelle de la sPLA2-X.

La figure 10 montre les protéases qui sont capables de maturer les différentes protéines recombinantes sous forme enzymatiquement active. L'efficacité d'activation apparaît variable. La furine, la kallikréine et la tryptase activent efficacement les formes promGX sauvage et promGX-AR, mais de façon assez surprenante, semblent incapables d'activer prohGX. Ces différences pourraient être expliquées par la relative faible homologie de séquence des propeptides murin et humain (Figure 5). Le cas de l'endo-arg-C est aussi assez surprenant puisque cette protéase semble capable d'activer la forme murine mutée (promGX-AR) mais pas la forme sauvage (promGX-WT).

Les résultats donnés par spectrométrie de masse pour ces différentes protéases sont résumés dans le tableau 3.

Protéase	PromGX WT (15239 Da)	PromGX AR (15317 Da)	ProhGX (15124 Da)
Plasmine	R-mGX (14011 Da)	mGX (13854 Da) + formes dégradées	R-hGX (13772 Da)
Furine	mGX + R-mGX	mGX + mipromGX	ProhGX (<i>ie</i> Pas de coupure)
Kallikréine	mGX + R-mGX	mGX (13854 Da)	R-hGX
Tryptase	mGX + R-mGX	mGX	R-hGX
Entérokinase	PromGX	promGX AR	ProhGX+miprohGX
Endoarg-C	R-mGX	mGX	R-hGX

Tableau 3: ce tableau indique les différents produits sPLA2 majeurs mesurés par spectrométrie de masse MALDI-TOF après coupure des trois proPLA2 par les protéases (R-mGX pour arginine-mGX).

Ce tableau montre une nette corrélation entre les résultats d'activité enzymatique (Figure 10) et l'analyse de masse. En effet, nous avons observé une activité importante pour la promGX-WT coupée par la furine, la kallikréine ou la tryptase (et à un moindre niveau pour la forme mutée AR) qui correspond à la détection forte par spectrométrie de masse de la

forme mature (mGX). A l'inverse, une faible activité enzymatique est associée à une forte détection des formes inactives R-mGX, mipromGX et proenzyme.

Par ailleurs, nous avons aussi observé que la plasmine ne coupe pas les formes WT murine et humaine, tandis qu'elle coupe et surtout dégrade la forme AR puisque l'analyse par spectrométrie de masse montre la présence de plusieurs formes dégradées et quelques traces de forme mature mGX.

Dans le cas de l'endoarg-C, et toujours en accord avec le dosage d'activité enzymatique, nous avons observé que la forme mutée AR, mais pas la forme WT de promGX était convertie en forme mGX active. L'absence d'activation de la proPLA2 humaine confirme ce type de résultat assez surprenant.

De façon assez inattendue, la mutation au niveau du site de clivage de la proPLA2 semblerait conduire à une activation préférentielle et plus complète de la sPLA2. Bien que nous n'ayons pas exploré plus loin la raison conduisant à ces résultats. Ces derniers sont peut-être à rapprocher d'autres résultats très récents et eux aussi inattendus, suggérant un mécanisme d'auto-activation de la proPLA2 humaine de groupe IB, qui elle-aussi, possède un propeptide avec une arginine en position N-terminale (280). Dans ce cas, le propeptide occupe le centre actif et la proenzyme serait auto-activée à 37°C par un mécanisme de type sérine-protéase. De plus, les mêmes auteurs ont montré que la présence du propeptide pourrait faciliter la renaturation de la sPLA2 (281). De façon intéressante, nous avons pu produire des quantités de promGX-WT plus grandes que pour la sPLA2 mature mGX à partir de constructions dans les mêmes vecteurs.

Cette première approche, purement in vitro, nous a donc permis de pré-sélectionner une liste de protéases candidates produites naturellement par différentes cellules et pouvant cliver la proPLA2-X. Bien sûr, cette liste de protéases est non exhaustive et bien d'autres protéases candidates présentes sur le site MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) auraient pu être testées. Les meilleures protéases possibles semblent être la furine, la kallikréine plasmatique et la tryptase, bien que celles-ci coupent mieux la forme murine que la forme humaine, alors que ces protéases sont d'origine humaine. Nos résultats ont aussi clairement montré qu'il fallait couper le propeptide dans sa totalité pour libérer l'extrémité N-terminale de la sPLA2-X et obtenir la pleine activité catalytique. Enfin, nos résultats indiquent que le propeptide est coupé à plusieurs endroits, et que si cela se produisait aussi in vivo, il serait donc vain de chercher à détecter le propeptide de pleine longueur avec des anticorps spécifiques.

2. Maturation dans des cellules transfectées (HEK293)

Nous avons choisi d'analyser dans un deuxième temps la maturation de la sPLA2-X dans des cellules HEK transfectées de façon stable. Nous avons pour cela transfecté la proPLA2-X WT humaine, proPLA2-X sauvage de souris et trois mutants du propeptide au site de clivage remplaçant l'un, l'autre ou les deux résidus basiques par une alanine (AA, KA et AR). Nous avons aussi transfecté les cellules avec une construction codant pour la sPLA2 hGX mature précédée du peptide signal de la sPLA2 hGIIA (construction pshGIIA-hGX), donc sans le propeptide de hGX. Enfin, nous avons transfecté les cellules avec le vecteur vide (Mock).

Nous avons choisi les cellules HEK293 car celles-ci n'expriment pas de sPLA2 endogènes et ont été largement utilisées pour étudier le rôle de différentes sPLA2 dont la sPLA2-X dans la libération d'acide arachidonique (37, 92, 124). Il a notamment été suggéré que la sPLA2-IIA et X pouvaient être actives soit depuis l'extérieur de la cellule ou hydrolysant la phosphatidylcholine à la membrane plasmique, soit pendant leur sécrétion en libérant de l'acide arachidonique depuis certains compartiments intracellulaires encore mal définis (124). Cependant, la maturation de la sPLA2-X n'a pas été étudiée dans ces cellules.

A partir de nos cellules transfectées, nous avons donc réalisé une série d'expérience qui a conduit aux résultats résumés ci-dessous :

1. Sur les cellules non transfectées ou Mock, l'ajout exogène des sPLA2 matures mGX et hGX pendant 6 h induit une libération d'acide arachidonique. L'ajout des formes proenzymes induit très peu de libération d'acide arachidonique. De plus, la mesure de l'activité enzymatique des surnageants cellulaires contenant les proenzymes après les 6 h d'incubation indiquent une faible activité enzymatique. Ceci montre que la conversion des proenzymes depuis l'extérieur de la cellule est lente voire nulle dans ces cellules.

2. Sur les mêmes cellules MOCK, et comme attendu, des inhibiteurs de la sPLA2-X non perméants (46) inhibent complètement l'effet des sPLA2 matures sur la libération d'acide arachidonique.

3. Sur les cellules transfectées avec les constructions promGX-WT, prohGX-WT et pshGIIA-hGX, la libération d'acide arachidonique est fortement augmentée par rapport aux cellules MOCK, et cette libération est proportionnelle au niveau d'expression des sPLA2 mesuré par TRFIA. Cette fois, les inhibiteurs sPLA2 non perméants n'ont que très peu d'effet sur la libération d'acide arachidonique, que ce soit pour les constructions pshGIIA-hGX ou pour les constructions avec les propeptides (prohGX et promGX WT). Ces résultats indiquent que la sPLA2-X est active à l'intérieur des cellules, et constituent donc un premier argument

pour dire que la coupure du propeptide permettant d'obtenir l'enzyme active s'est produite dans la cellule et pendant la sécrétion, probablement au niveau de l'appareil de Golgi.

4. Sur les cellules transfectées avec les trois formes mutées du propeptide KR -> AR, KR -> KA et KR-> AA, nous avons observé une forte libération d'acide arachidonique pour la forme AR, mais de très faibles libérations pour les deux autres formes. Nous avons vérifié par TRFIA et western-blot que les différentes cellules expriment des quantités comparables de sPLA2. Associé au point 5 ci-dessous, ces résultats indiquent que le clivage du propeptide de la sPLA2-X est nécessaire pour la libération d'acide arachidonique, et que le motif AR est suffisant pour que la protéase intracellulaire responsable de l'activation de l'enzyme coupe de façon efficace.

5. L'analyse par western-blot des lysats cellulaires et des surnageants des cellules transfectées prohGX et promGX WT montre la présence des formes proenzymes et matures dans les lysats cellulaires et seulement la présence de la forme mature dans le surnageant cellulaire. En accord avec ces résultats, l'analyse des surnageants cellulaires par immunoprécipitation puis spectrométrie de masse montre par ordre d'abondance relative : a) uniquement la présence de la forme mature pour la transfection avec la promGX-WT; b) la présence des formes mature et mipromGX pour la mutation AR; c) la présence des formes A-mGX, mipro(KA)-mGX et pro(KA)-mGX pour la mutation KA; et d) la présence à niveau égal des formes pro(AA)-mGX, mipro(AA)-mGX et AA-mGX pour la mutation AA. Ces résultats sont de nouveaux arguments en faveur d'une maturation majeure de la sPLA2-X dans les cellules pendant la sécrétion. Ils indiquent aussi que la (ou les) protéase(s) responsable(s) de cette maturation reconnaît(aissent) quasiment aussi bien le propeptide de mGX sous forme KR et AR, mais est(sont) sélective(s) pour un acide aminé basique en C-terminal du propeptide. Ces résultats indiquent aussi que la (les) protéase(s) sont capables de couper le propeptide à plusieurs sites, mais que seule la coupure au dernier résidu basique permet d'obtenir une sPLA2-X fonctionnellement active et capable de libérer de fortes quantités d'acide arachidonique.

6. Nous avons ensuite analysé l'effet de 15 inhibiteurs différents de protéases sur les cellules transfectées par les constructions promGX et prohGX WT en traitant les cellules pendant 24 h avec les inhibiteurs et en mesurant la maturation des sPLA2 par dosage enzymatique et par western-blot. Nous avons observé que seuls deux inhibiteurs de la furine et des autres proconvertases sont actifs. De façon intéressante, l'inhibiteur furin I perméant « décanoyl-RVKR-CMK » apparaît plus actif que l'inhibiteur furin II « Hexa-D-arginine » non perméant. Ces résultats suggèrent qu'une (ou plusieurs) protéase(s) de la famille furine

(une des 7 proconvertases connues) est(sont) impliquée(s) dans la maturation de la sPLA2-X dans les cellules HEK, et que cette ou ces protéase(s) agit(ssent) depuis l'intérieur des cellules.

7. Enfin, nous avons analysé l'effet de 15 inhibiteurs de protéases sur la maturation de la promGX-WT recombinante ajoutée dans le milieu de culture des cellules HEK MOCK pendant 24 h. Ces conditions permettent d'observer une faible maturation de la sPLA2-X depuis le milieu extracellulaire par une protéase sécrétée. Dans ces conditions, nous avons observé que l'activation de la proenzyme était bloquée par les deux inhibiteurs furines perméant et non perméant, mais pas par les autres inhibiteurs. Ces résultats indiquent que la(les) même(s) protéase(s) qui activent la sPLA2-X à l'intérieur de la cellule est(sont) aussi faiblement présente(s) dans le milieu de culture.

La caractérisation des sPLA2 recombinantes, leur activation par certaines protéases purifiées et les résultats résumés ci-dessus font l'objet de l'article Jemel et al. qui est en préparation et sera soumis à JBC (Journal of Biological Chemistry). Dans certains cas, des expériences complémentaires, notamment avec la sPLA2 humaine de groupe X, ont été effectuées par le Dr Hiromi Li, une jeune post-doctorante travaillant dans le laboratoire du Pr. Michael Gelb.

Article 1

Group X secreted phospholipase A₂ proenzyme is matured by a furin-like convertase and releases arachidonic acid inside of mammalian HEK293 cells

Running title: intracellular proenzyme conversion of group X sPLA2

Ikram Jemel¹, Hiromi Ii¹, Rob Oslund, Anne-Sophie Dabert-Gay, Khaoula Chargui, Sabine Scarzello, Michael H. Gelb* and Gérard Lambeau*

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis et Centre National de la Recherche Scientifique, Valbonne 06560, France (I.J., A.S.D.J, K.C., S.S., G.L.)

Departments of Chemistry and Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA (H.L., R.O., M.H.G.)

¹contributed equally to the work

*Corresponding authors

Abstract

Among mammalian secreted phospholipases A₂ (sPLA2s), sPLA2-X has the most potent hydrolyzing activity toward phosphatidylcholine and is involved in arachidonic acid (AA) release. sPLA2-X is produced as a proenzyme and exhibits a propeptide of 11 amino acids ending with a dibasic motif, suggesting cleavage by subtilisin-like proteases. While the removal of this propeptide is clearly required for sPLA2-X enzymatic activity, the cellular location and the protease(s) involved in proenzyme conversion have remained unclear. Here, we have analyzed the maturation of sPLA2-X in HEK293 cells, which have been extensively used to analyze sPLA2-induced AA release. Using recombinant mouse (promGX) and human (prohGX) proenzymes, HEK293 cells transfected with cDNAs coding for full-length prohGX, promGX and propeptide mutants, and various permeant and non-permeant sPLA2 inhibitors and protease inhibitors, we demonstrate that sPLA2-X is essentially converted intracellularly. Most strikingly, the exogenous proenzyme does not elicit AA release while the transfected proenzyme does elicit AA release in a way insensitive to non permeant sPLA2 inhibitors. In transfected cells, a permeant furin inhibitor, but not a non permeant one nor other protease inhibitors, prevents sPLA2-X maturation and partially blocks AA release. Mutations at the dibasic motif of the propeptide indicate that a single basic residue is required but sufficient for efficient maturation and AA release. All together, these results argue for the intracellular maturation of group X proenzyme in HEK293 cells by a furin-like convertase, leading to intracellular release of AA during secretion.

3. Etude de la maturation par différents surnageants et milieux extracellulaires

Nous venons de voir que la maturation de la sPLA2-X pouvait se faire dans un compartiment intracellulaire dans les cellules HEK par une protéase de type furine. Néanmoins, nous avons observé que le milieu extracellulaire conditionné des cellules HEK contenait une faible activité protéase capable de maturer la proPLA2-X recombinante dans des tests *in vitro*. Nous avons donc émis l'hypothèse que la maturation des proenzymes pouvait aussi se faire dans le milieu extracellulaire par des protéases sécrétées et dont le niveau de sécrétion pourrait dépendre du type cellulaire.

Pour tester cette hypothèse, nous avons donc analysé en détail la maturation de nos proenzymes recombinantes par des milieux conditionnés (surnageants 24-72 h) issus de différentes cellules de mammifères telles que les cellules HEK293 utilisées ci-dessus, mais aussi les cellules CHO utilisées par Hanasaki et al (28, 62), d'autres fibroblastes (COS, fibroblastes embryonnaires de souris) et les cellules LOVO déficientes en furine (282).

Nous avons aussi analysé la maturation par des surnageants de spermatozoïdes capacités de souris et des lavages broncho-alvéolaires (BAL) de souris asthmatiques ou infectées par *P. aeruginosa* versus contrôles pour tester l'hypothèse d'une surexpression de ces protéases dans des conditions physiologiques et physiopathologiques.

a) Surnageant de culture cellulaire des HEK293 sauvages

Pour compléter la partie maturation avec les clones stables de HEK293, nous avons réalisé des tests de maturation de la proPLA2-X en utilisant le milieu extracellulaire des cellules non transfectées afin de savoir si la maturation pouvait aussi se faire dans le milieu extracellulaire par des protéases sécrétées. Pour cela, les surnageants de culture des cellules HEK293 ont été concentrés puis utilisés pour faire des tests de clivage des proenzymes *in vitro* en présence ou en absence de certains inhibiteurs spécifiques de protéases. Les tests d'activation de la promGX-WT en utilisant différents volumes de ce surnageants HEK293 avant et après concentration sont indiqués dans la Figure 11.

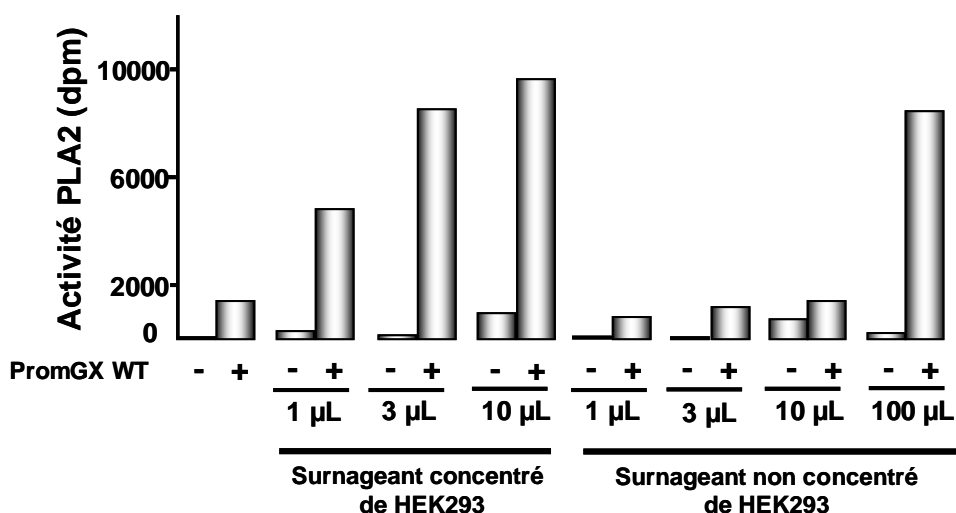


Figure 11: Dosage d'activité sPLA2 de la promGX-WT après coupure en présence de 500 ng de promGX par différents volumes de surnageants conditionnés des cellules HEK293 à 37°C pendant 16 h.

Cette figure montre que le milieu extracellulaire des HEK293 contient, comme à l'intérieur de ces cellules, une activité protéolytique capable d'activer la proPLA2-X murine (promGX). Cette activité protéolytique peut être concentré sur membrane d'ultrafiltration avec un cut-off de 10 kDa et devient plus importante en augmentant le volume du surnageant cellulaire, soit la quantité de protéase. Un volume de 3µl du surnageant concentré permet une maturation importante de la promGX.

L'analyse par spectrométrie de masse (voir ci-dessous) de la maturation de la promGX-WT par ce surnageant HEK293 nous a montré des résultats intéressants mais surprenants. En effet, le traitement de promGX-WT par le surnageant HEK ne conduit pas à une formation massive de mGX sous forme mature à la masse moléculaire attendue (13854 Da), mais à la production de plusieurs peptides de tailles inférieures. Il ne reste cependant que relativement peu de promGX recombinante, suggérant que les protéases présentes dans le surnageant des cellules HEK sont en quantités suffisantes pour couper la quasi-totalité de la proenzyme ajoutée. Il semble donc que dans nos conditions de coupure, deux types de protéases soient actives dans le milieu HEK, les unes sont responsables de la maturation tandis que d'autres sont responsables de la dégradation de la promGX ou de la mGX produite. L'augmentation d'activité enzymatique mesurée serait alors due à la présence d'une très faible quantité de sPLA2 sous forme mGX, mais non détectable par spectrométrie de masse. Les peptides de tailles inférieures sont vraisemblablement enzymatiquement inactifs. Cette hypothèse a été confortée par l'analyse par HPLC présentée plus bas.

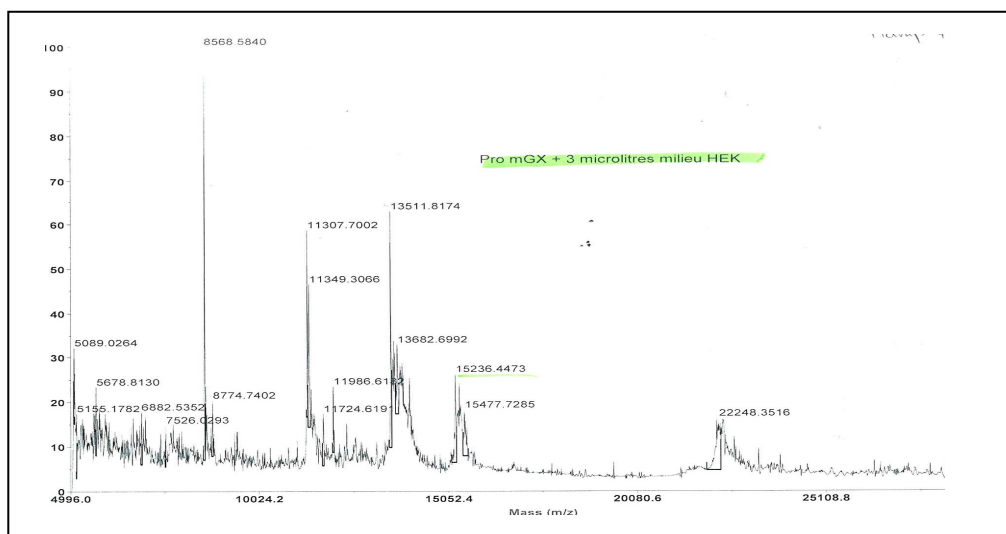


Figure 12: Spectrométrie de masse de la promGX-WT traitée par le surnageant concentré des cellules HEK293.

Nous avons également testé le surnageant concentré HEK293 sur la forme mutée de la proPLA2-X murine (Figure 13).

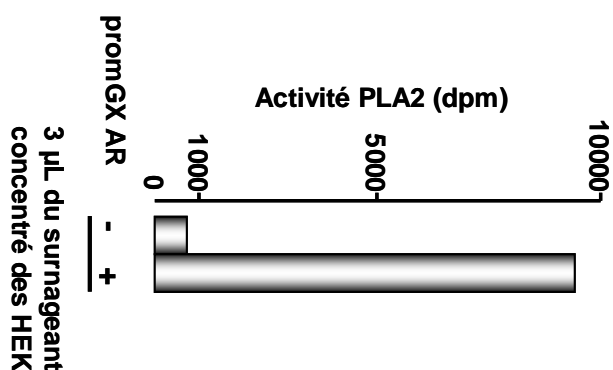


Figure 13: Dosage d'activité sPLA2 de la promGX AR après un test de maturation en présence de 500 ng de promGX AR et 3 µl de surnageant concentré des cellules HEK293, incubé 24 h à 37°C.

De façon similaire, le surnageant HEK est capable d'activer la forme mutée de la proPLA2 murine (promGX AR), indiquant que la protéase responsable de cette activation reconnaît le propeptide sous forme KR et AR. Ces résultats apparaissent similaires à ceux observés avec les cellules transfectées (cf ci-dessus).

Afin de mieux caractériser la ou les protéases du surnageant cellulaire de HEK293 qui sont responsables de l'activation des proenzymes, un profil d'inhibition de cette maturation a été réalisé en présence de différents inhibiteurs spécifiques de protéases (Figure 14).

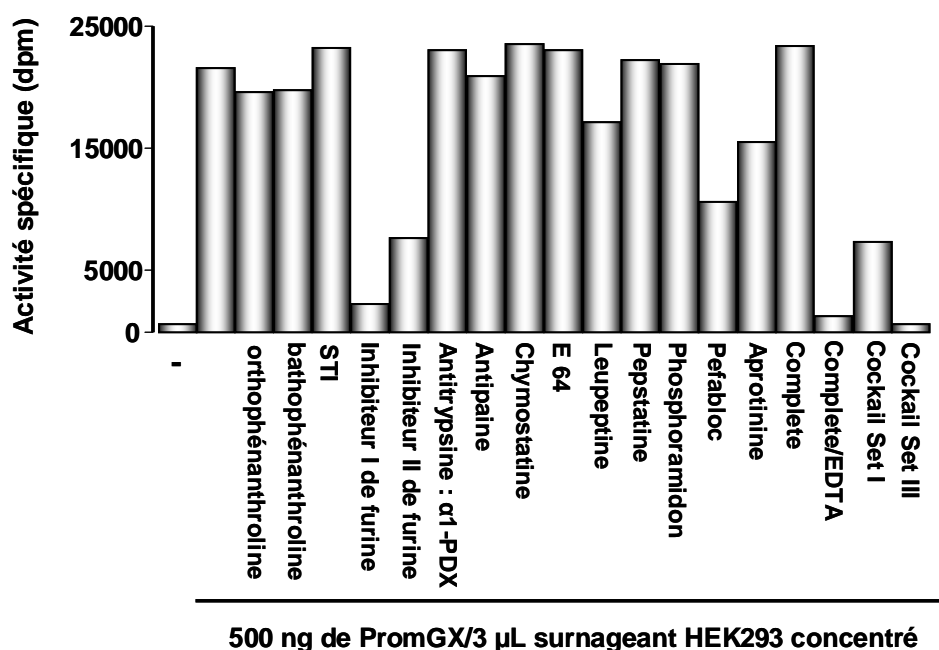


Figure 14: Profil d'inhibition de la maturation de promGX-WT par différents inhibiteurs spécifiques de protéases : orthophénanthroline (1 mM), bathophénanthroline (1 mM), STI (10 μ g/ml), inhibiteur de furine I (décanoyl-RVKR-CMK, 25 μ M) et II (hexa-D-R, 25 μ M), α 1-PDX (0,6 nM), antipaine (50 μ g/mL), chymostatine (30 μ g/mL), E64 (3 μ g/mL), leupeptine (10 μ g/mL), pepstatine (5 μ g/mL), phosphoramidon (20 μ g/mL), pefabloc (0,5 mg/mL), aprotinine (10 μ g/mL), EDTA (2mM). Le surnageant a été préincubé pendant 20 minutes avec les inhibiteurs avant l'ajout de 500 ng de PromGX. La solution a été incubée à 37°C pendant 24 h avant dosage de l'activité sPLA2.

Ces résultats indiquent que les protéases présentes dans le surnageant HEK sont clairement inhibées par l'inhibiteur I de furine, appelé décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CMK (25 μ M), l'inhibiteur II de furine ou hexa-arg (25 μ M), le pefabloc (0,5mg/ml), le complete/EDTA de Roche (2mM) et les deux autres cocktails d'inhibiteurs de protéases Set I et Set III de chez Calbiochem. L'inhibition par les deux inhibiteurs de furine, le pefabloc (inhibiteur de protéases à sérine) et l'EDTA (chélateur de cations divalents), présent dans les trois cocktails d'inhibiteurs, suggère assez clairement la présence d'une protéase de type furine dans le surnageant HEK293. En effet, les protéases de la famille furine sont des protéases à sérine dont l'activité est dépendante du calcium (262).

Le test ci-dessous a confirmé la dépendance de la protéase de maturation au calcium et aux autres cations bivalents (Figure 15).

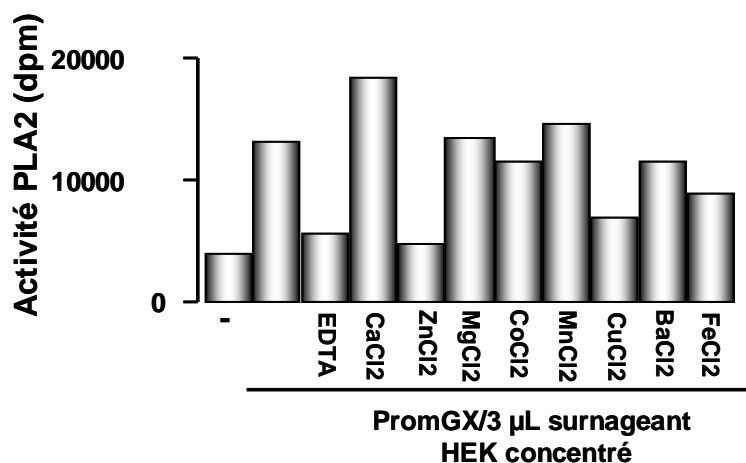


Figure 15: Maturation de la promGX-WT par le surnageant concentré de HEK293 en présence de différents cations bivalents.

Ces résultats confirment que la protéase impliquée dans la maturation est dépendante du calcium, et que d'autres cations divalents ne peuvent remplacer ce dernier, comme dans le cas de la furine ou des proconvertases (262).

Enfin, afin de mieux déterminer les produits de coupure et l'activité enzymatique associée, nous avons essayé de séparer par chromatographie en phase inverse (C18) les différentes formes coupées après une maturation de 5 μg de promGX-WT avec 3 μL de surnageant HEK293 (Figure 16).

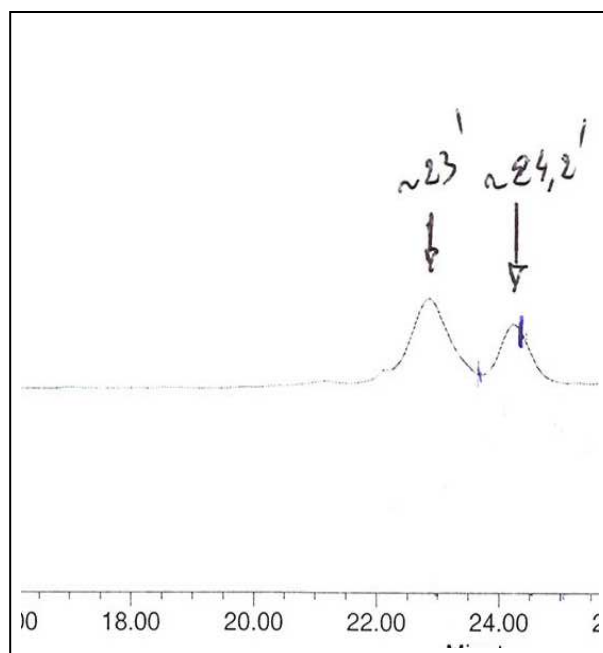


Figure 16: Profil de séparation sur une colonne de HPLC (C18), des produits de coupure de la promGX-WT par le surnageant concentré des cellules HEK293.

Les différentes fractions collectées ont été analysées par spectrométrie de masse et dosage d'activité sPLA2 (Tableau 4).

Fractions	Activité PLA2 (dpm)	Masse (Da)	sPLA2
F1	5000	15245	PromGX WT
F2	2400	Signal trop faible	
F3	43000	13862	mGX (+ R-mGX)
F4	1000	13861	mGX (+ R-mGX)

Tableau 4: Analyse par dosage d'activité sPLA2 et spectrométrie de masse des différentes fractions récupérées après purification sur une colonne de phase inverse C18. La forme majoritaire détectée par spectrométrie de masse est indiquée. La forme R-mGX semble être détectée en faible quantité dans les fractions F3 et F4.

Ce tableau montre que l'étape de purification sur colonne C18 (phase inverse) a permis de séparer la forme non coupée (promGX) qui est éluée en premier, de la forme mature (mGX) et d'autres formes intermédiaires. Dans ces conditions de coupure avec un rapport surnageant HEK/promGX plus faible, nous n'avons pas pu observer les formes dégradées de la sPLA2.

Les résultats de maturation obtenus avec le milieu extracellulaire des cellules HEK293 montrent que ce dernier contient une protéase capable de libérer la forme active de la proenzyme, et qu'il s'agit probablement d'une protéase de type furine, mais pas nécessairement de la furine elle-même. Le milieu de ces cellules semble aussi contenir d'autres protéases capables de dégrader la promGX ou la mGX maturée par cette activité de type furine.

b) Surnageant de culture cellulaire des LOVO sauvages

Dans le but de déterminer le rôle possible de la furine dans la maturation cellulaire de nos proenzymes, nous avons utilisé les cellules tumorales de côlon humain LOVO qui n'expriment pas la furine (282-283). La transfection transitoire des constructions promGX et prohGX WT dans ces cellules montrent que les deux sPLA2 sont produites sous forme mature dans le surnageant de ces cellules (données non montrés). Ceci indique clairement que la maturation de nos sPLA2 ne dépend pas uniquement de la furine, mais probablement d'une ou plusieurs proconvertases de cette famille. A la vue des résultats ci-dessus obtenus avec le surnageant des cellules HEK293, nous avons testé si le surnageant (milieu conditionné) de cellules LOVO était capable d'activer la proPLA2-X. Pour cela, nous avons fait comme précédemment des tests d'activation de la promGX-WT avec différents volumes de surnageant LOVO après concentration par ultrafiltration avec la cellule Amicon et une membrane de cut-off 10 kDa (Figure 17).

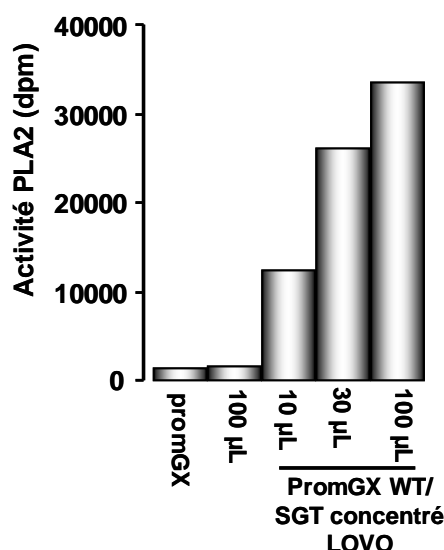


Figure 17: Dosage d'activité sPLA2 après un test de coupure à 37°C pendant 24h en présence de 500 ng de promGX et différents volumes de surnageant de culture des cellules LOVO après concentration par ultrafiltration. Un volume de 10 µl de surnageant concentré est suffisant pour une maturation significative de la promGX.

Cette figure montre que le milieu extracellulaire des cellules LOVO contient au moins une protéase capable d'activer la promGX.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse (Figure 18) montrent cette fois la présence majoritaire de la forme mGX mature avec une masse de 13854,94 Da, quasi identique à la masse théorique de mGX (13854 Da). Il n'existe pas dans ce cas de formes intermédiaires de type mipro-mGX ni de produits de dégradation. Ces résultats indiquent que le milieu extracellulaire des cellules LOVO contient une protéase sécrétée par ces cellules qui est capable d'activer la proPLA2-X sans la dégrader.

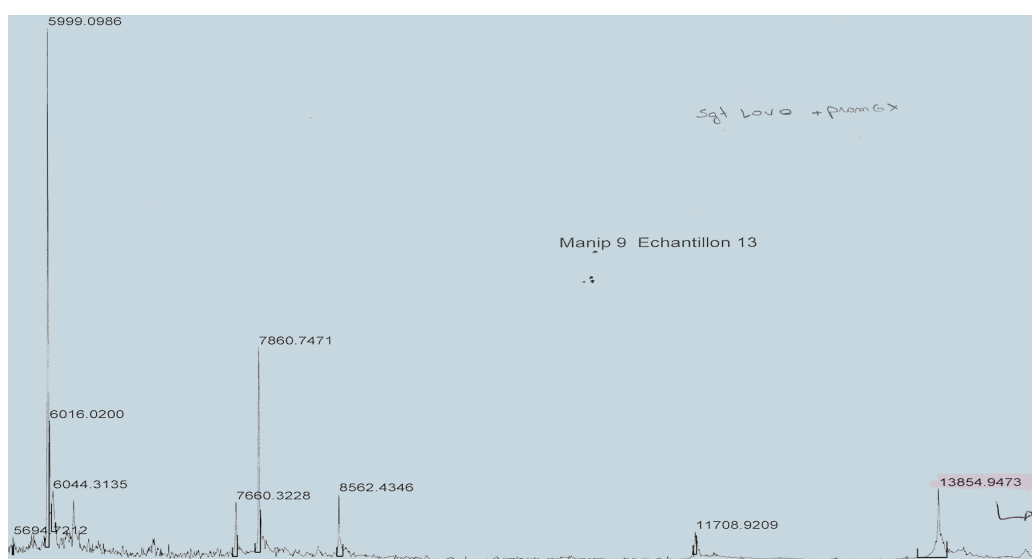


Figure 18: Analyse par spectrométrie de masse de la promGX-WT coupée par le surnageant des cellules LOVO.

Afin de vérifier la spécificité de cette protéase vis-à-vis du site de clivage du propeptide murin, nous avons testé le surnageant LOVO avec la forme mutée promGX-AR (Figure 19).

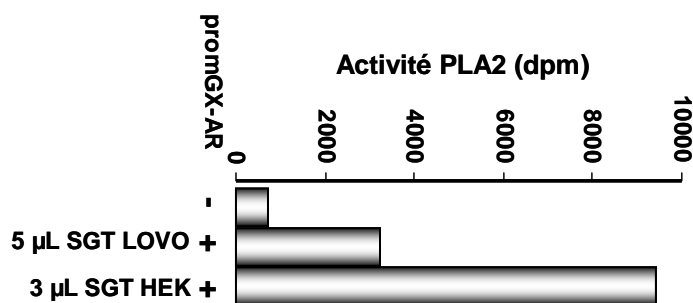


Figure 19: Dosage d'activité sPLA2 de la promGX-AR après un test de maturation avec 500 ng de promGX-AR et 3 µl de surnageant concentré des cellules HEK293 ou 5 µl de surnageant concentré LOVO (incubation 24 h à 37°C).

Ces résultats indiquent que la promGX-AR est plus faiblement activée par la protéase présente dans le surnageant LOVO que par celle du surnageant HEK. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la présence d'un pic majoritaire de 15328 Da correspondant à la forme promGX-AR et donc l'absence de mGX mature en grande quantité. La protéase présente dans le surnageant HEK était capable d'activer les formes promGX-WT et AR (Figure 11 et 13) alors que celle des LOVO semble mieux activer la promGX-WT que la forme AR. Cette différence suggère que les deux protéases pourraient être de natures différentes.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons comparé les profils d'inhibition de la maturation induite par les surnageants cellulaires LOVO et HEK vis-à-vis des mêmes inhibiteurs de protéases (Figure 20).

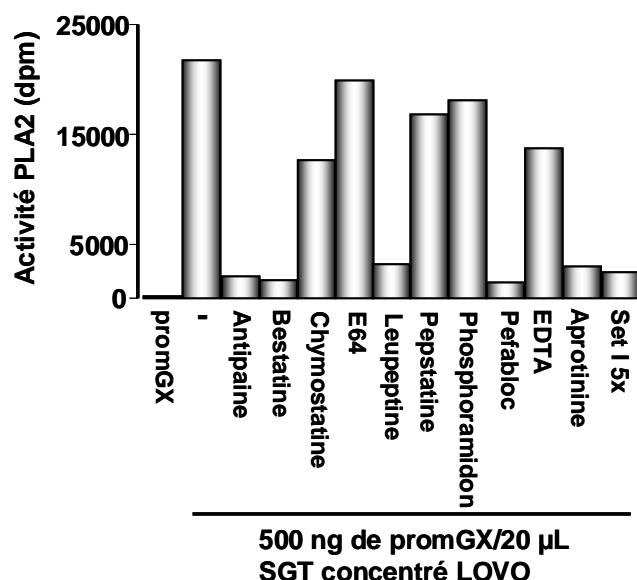


Figure 20: Profil d'inhibition de la maturation de promGX-WT par différents inhibiteurs spécifiques de protéases : antipaine (100 μ g/mL), bestatine (120 μ g/mL), chymostatine (30 μ g/mL), E64 (10 μ g/mL), leupeptine (30 μ g/mL), pepstatine (5 μ g/mL), phosphoramidon (100 μ g/mL), pefabloc (1 mg/mL), aprotinine (10 μ g/mL), EDTA (2mM), le cocktail d'inhibiteur Set I (5x). Les surnageants LOVO et HEK ont été préincubés pendant 20 minutes avec les inhibiteurs. 500 ng de PromGX ont été ajoutés, incubés à 37°C pendant 24 h puis l'activité sPLA2 a été dosée.

La maturation par le surnageant LOVO est inhibée par l'antipaine, la bestatine, la leupeptine, le pefabloc et l'aprotinine, mais pas par l'EDTA. Ce profil suggère la présence d'une ou plusieurs protéases de type protéase à sérine dont l'activité est peu ou pas dépendante des cations divalents. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec le surnageant HEK, et suggèrent que les protéases impliquées dans la maturation de la promGX sont différentes dans les deux types de surnageants.

Enfin, de façon similaire aux études faites avec le surnageant HEK293, nous avons essayé de séparer par HPLC les différentes formes coupées après maturation de promGX-WT par le surnageant LOVO (Figure 21).

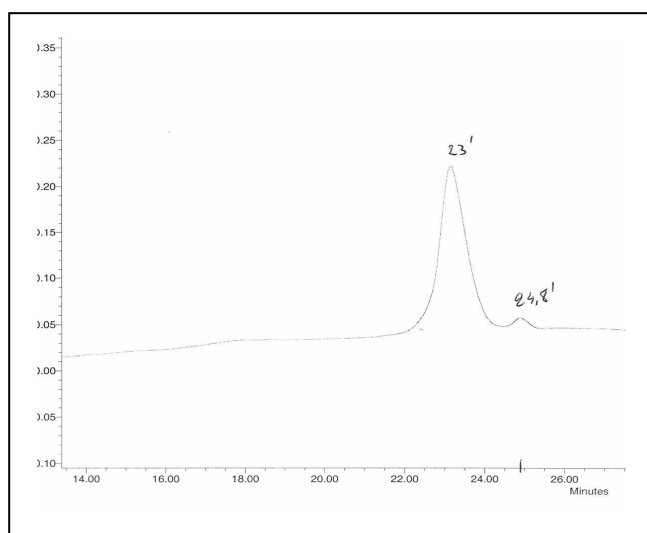


Figure 21: Profil de séparation sur colonne C18 par HPLC des produits de coupure de la promGX-WT par le surnageant concentré des cellules LOVO.

Les différentes fractions ont été analysées par une spectrométrie de masse et par dosage d'activité sPLA2 (Tableau 5).

Fractions	Activité PLA2 (dpm)	Masse (Da)	sPLA2
L1	1900	15245	promGX
L2	3600	15245; 14014; 14629	promGX; R-mGX; mipromGX
L3	7950	Signal trop faible	mGX?
L4	13800	Signal trop faible	mGX?

Tableau 5: Analyse par dosage d'activité sPLA2 et spectrométrie de masse des différentes fractions après une étape de purification sur une colonne de phase inverse C18/HPLC du test de maturation de la promGX-WT par le surnageant LOVO.

Ce tableau montre que l'étape de purification sur colonne C18 a permis d'obtenir deux pics de protéines dont le premier correspond aux formes inactives (promGX, R-mGX et mipromGX) et le second correspondant vraisemblablement à la forme active et mature (mGX). La colonne utilisée est légèrement différente de celle utilisée pour les cellules HEK et explique les différences de résolution.

En conclusion, les résultats de maturation obtenus avec le surnageant des cellules LOVO montrent la présence d'une protéase capable de maturer la proenzyme sauvage mais

peu ou pas la protéine mutée AR avec un profil d'inhibition différent de celui des cellules HEK. Bien que nous n'ayons pas pu réaliser des tests avec les inhibiteurs plus sélectifs des protéases de type furine, il semble probable que les protéases présentes dans les deux types de surnageants sont distinctes.

Les résultats ci-dessus nous ont conduit à tester la capacité de maturation d'autres surnageants cellulaires pour déterminer s'ils sont eux-aussi pourvus d'une activité protéolytique, semblable ou non à celle des cellules HEK293 et LOVO.

Nous avons ainsi testé le surnageant de cellules CHO (chinese hamster ovary), de cellules de côlon 26, de cellules COS, de fibroblastes embryonnaires de souris et d'une lignée de neutrophiles humains, les cellules PLB (Figure 22).

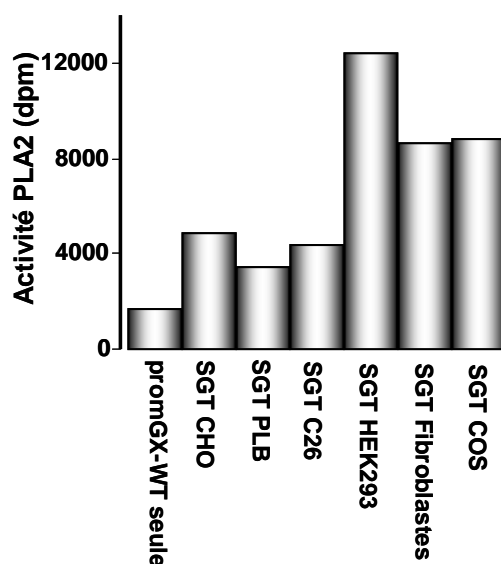


Figure 22: Mesure de l'activité enzymatique de la promGX-WT en présence de différents surnageants cellulaires.

Cette figure montre que seuls les surnageants des fibroblastes embryonnaires et des cellules COS présentent une activité protéolytique du même ordre que celle du surnageant HEK293. Les résultats de spectrométrie de masse indiquent que les surnageants des cellules CHO, C26 et PLB ne contiennent pas ou très peu de protéases capables d'activer la promGX.

c) Surnageants des lavages broncho-alvéolaires (BAL) et des spermatozoïdes de souris

Dans cette partie, nous avons étudié la maturation de la proPLA2-X par des lavages broncho-alvéolaires et par un surnageant de spermatozoïdes de souris obtenu après capacitation (cf article Escoffier et al). Le but de ces études est de déterminer si l'activation de la sPLA2 de groupe X peut se faire dans le milieu extracellulaire dans différents contextes physiologiques ou physiopathologiques. Nous avons donc réalisé des expériences de maturation similaires à celles faites pour les surnageants HEK293 et LOVO.

La sPLA2 de groupe X apparaît jouer un rôle important dans l'asthme (102). Nous avons donc obtenu deux lavages-bronchoalvéolaires de souris asthmatiques qui ont été préparés par l'équipe du Dr. Valérie Julia au sein de notre institut. Un lavage BAL-PBS de souris contrôles non asthmatiques et un lavage BAL-E1 de souris très asthmatiques ont été comparés.

La sPLA2 de groupe X pourrait jouer un rôle dans la défense antibactérienne et le syndrome de détresse respiratoire aigu (98, 109). Nous avons donc obtenu de l'équipe de Dr. Lhousseine Touqui des lavages de souris non infectées (BAL-PBS) et de souris infectées par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (BAL-PAK) pour tester la présence de protéases de maturation dans un lavage bronchoalvéolaire suite à une infection bactérienne.

Enfin, la sPLA2 de groupe X est présente dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris et joue vraisemblablement un rôle dans la capacitation et la fécondation (Escoffier et al, article 5). La forme de l'enzyme stockée dans l'acrosome et le mécanisme d'activation dans ces cellules hautement différenciées sont inconnus.

Les différents extraits protéiques ont donc été incubés avec la promGX recombinante et les coupures analysées par mesure de l'activité sPLA2 (Figure 23) et spectrométrie de masse. Dans ce cas, les extraits n'ont pas été concentrés.

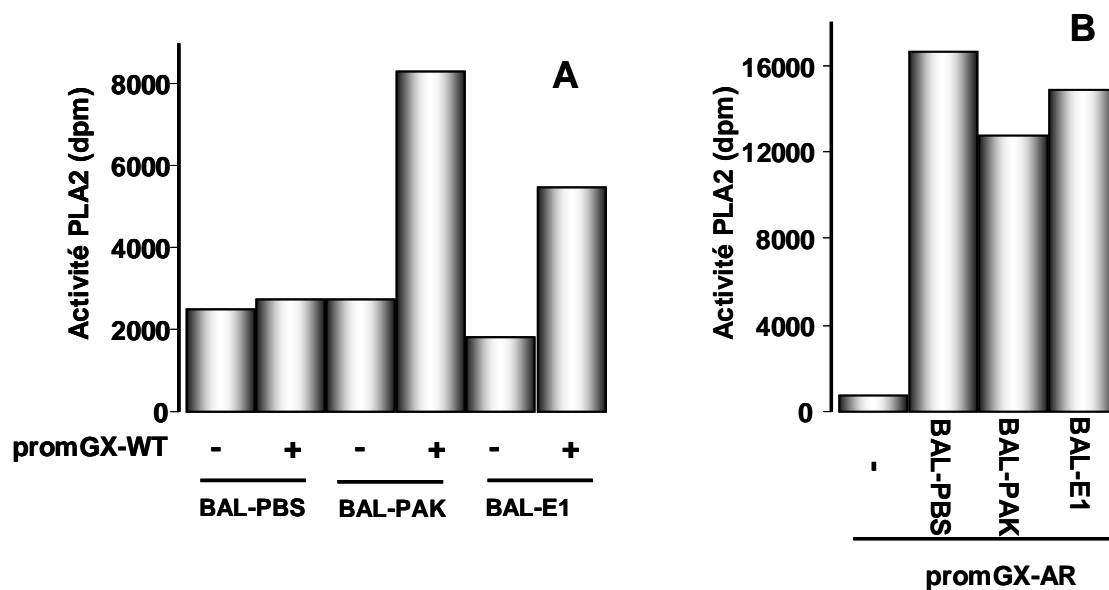


Figure 23: Dosage d'activité sPLA2 des proenzymes promGX-WT (A) et promGX-AR (B).

A volume égal de lavage, la promGX-WT est plus activée dans les deux conditions BAL-PAK et BAL-E1. Cependant, la maturation de la promGX-AR est comparable avec les trois lavages. Vraisemblablement lié à la concentration protéique trop forte des lavages, l'analyse par spectrométrie de masse n'a pas fonctionné et nous n'avons donc pas pu déterminer la masse des différentes protéines générées dans ces conditions. Bien que ces résultats restent préliminaires, ils vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle les protéases induisant la maturation de la sPLA2-X sont présentes en plus grande quantité dans un contexte inflammatoire (155).

La figure 24 présente les résultats de maturation en utilisant les surnageants de spermatozoïdes de souris avant (T0') et après une capacitation de 90 minutes en absence (T90') ou en présence de l'ionophore à calcium A23187 pendant les 30 dernières minutes (T90'**) permettant d'induire une forte réaction acrosomique (cf article 5 Escoffier et al.).

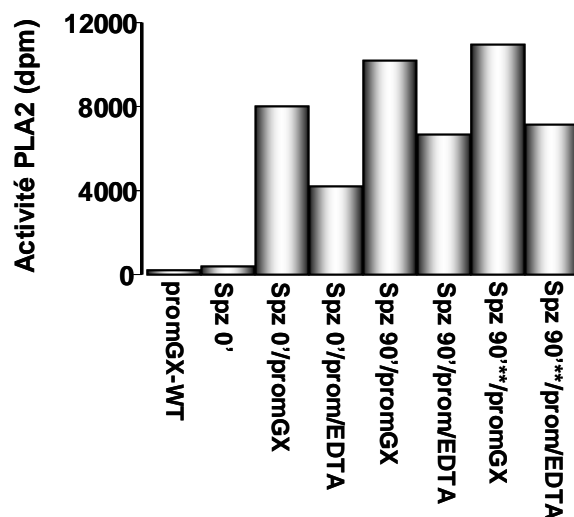


Figure 24: Dosage d'activité sPLA2 de la promGX-WT traitée avec les surnageants de spermatozoïdes. Le test d'activité est précédé par une étape de maturation de la promGX WT (500 ng) avec différents surnageants de spermatozoïdes à T0, T90 minutes et T90'** en présence du ionophore à calcium A23187 (2 μ M).

Cette figure montre une activation de la promGX-WT aux différents temps de capacitation des spermatozoïdes, notamment dans le surnageant de 90 minutes en présence du A23187. L'activation de la promGX est ralentie par une incubation en présence d'EDTA, suggérant l'action d'une protéase dépendante de calcium. L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence des formes mature et proenzyme dans les différents surnageants de spermatozoïdes : T0' (13854 Da et 15235 Da), T90' (13839 Da et 15238 Da) et T90'** (13625 Da et 15237 Da).

Bien que très préliminaires, ces résultats pourraient être compatibles avec l'idée selon laquelle la sPLA2-X pourrait être stockée dans l'acrosome des spermatozoïdes sous forme inactive, puis sécrétée pendant la réaction acrosomique et immédiatement activée dans le milieu extracellulaire par une ou plusieurs protéases (article 5).

Comme pour les surnageants HEK ou LOVO, nous avons essayé d'inhiber l'activation de promGX par les lavages BAL-PAK et BAL-E1 et le surnageant de spermatozoïdes avec les mêmes inhibiteurs de protéases (Figure 25 et 26).

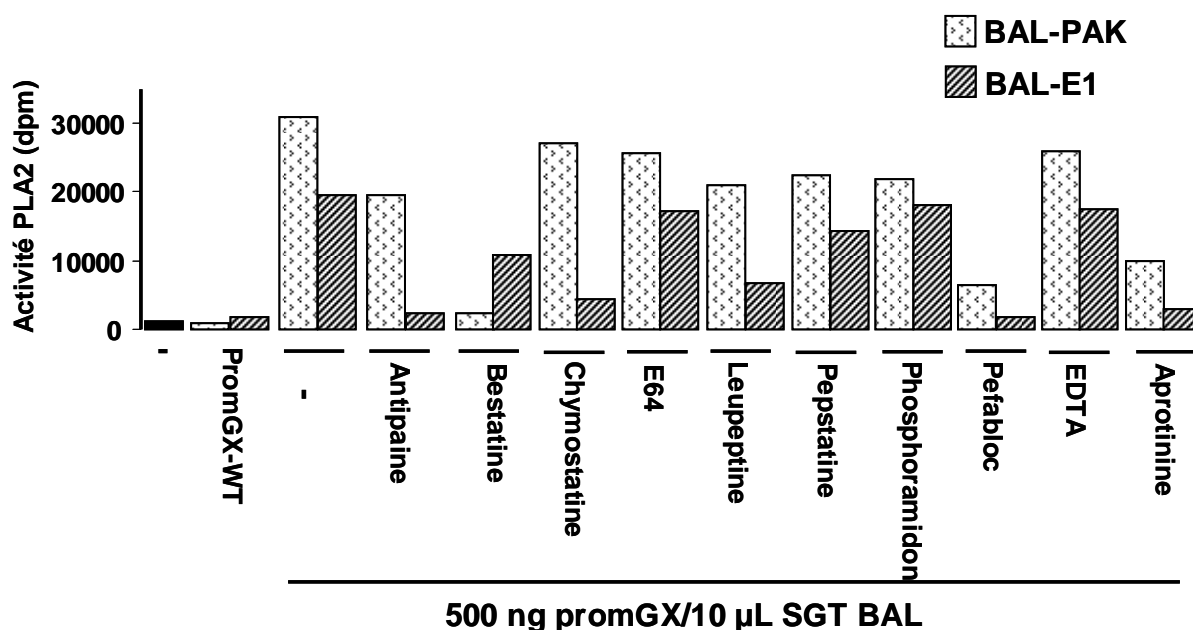


Figure 25: Profil d'inhibition de la maturation de promGX WT par différents inhibiteurs spécifiques de protéases : antipaine (100 µg/mL), bestatine (120 µg/mL), chymostatine (30 µg/mL), E64 (10 µg/mL), leupeptine (30 µg/mL), pepstatine (5 µg/mL), phosphoramidon (100 µg/mL), pefabloc (1 mg/mL), aprotinine (10 µg/mL), EDTA (2mM). Les lavages sont préincubés pendant 20 minutes avec les inhibiteurs avant l'ajout des 500 ng de PromGX. Le test d'inhibition est ensuite incubé à 37°C pendant 24 h avant de doser l'activité sPLA2.

Les protéases présentes dans les lavages BAL-PAK sont inhibées par la bestatine, le pefabloc et l'aprotinine. La maturation dans le lavage E1 est aussi inhibée par le pefabloc et l'aprotinine, mais d'autres inhibiteurs comme l'antipaine ou la chymostatine et la leupeptine sont efficaces. Ces résultats suggèrent la présence de différentes protéases à l'origine de la maturation de la sPLA2-X dans les deux types de lavages. De façon intéressante, *P. aeruginosa* sécrète une protéase qui pourrait être capable de participer à la maturation du propeptide de promGX (284). Par ailleurs, *P. aeruginosa* est capable d'activer l'expression de différentes sPLA2, en particulier IB et IIA (285-286).

Les protéases présentes dans le surnageant de spermatozoïdes de souris sont inhibées par l'antipaine, la bestatine, la leupeptine et le pefabloc. Certains de ces inhibiteurs sont les mêmes que ceux qui inhibent les protéases d'autres surnageants ou lavages, suggérant la présence d'une ou plusieurs protéases de la même famille toutes capables d'activer la promGX.

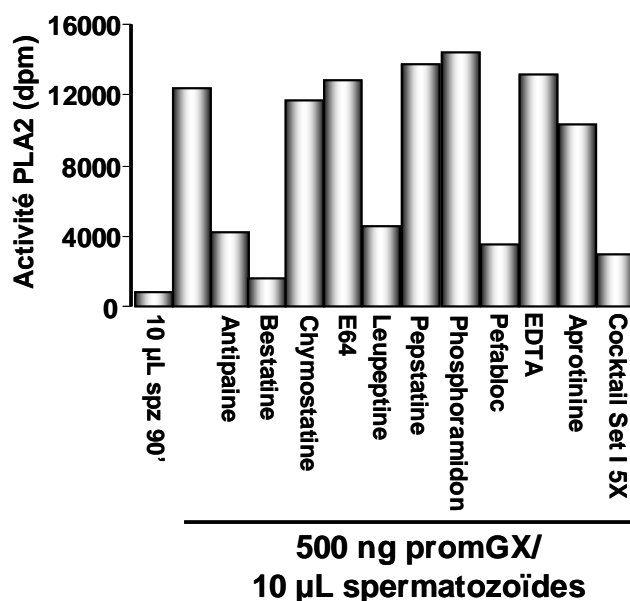


Figure 26: Profil d'inhibition de la maturation de promGX WT par les surnageants de spermatozoïdes de souris avec différents inhibiteurs de protéases.

Enfin, nous avons aussi essayé de fractionner les surnageants BAL pour séparer les différentes formes protéolysées et pouvoir effectuer une analyse par spectrométrie de masse (Tableau 6).

Fractions	Activité (dpm)	Masse (Da)	Forme
PBS1	2000	15270*	promGX
PBS2	2900	15242*	promGX
PBS3	5200	14634	mipromGX
PBS4	9500	-	mGX
E1	1300	14016	R-mGX
E2	4000	14014; 14630	R-mGX+mipromGX
E3	24000	-	mGX
E4	6000	-	-
PAK1	1200	14670*	mipromGX
PAK2	4900	14015; 15244	R-mGX+promGX
PAK3	10000	-	mGX
PAK4	35000	13867	mGX

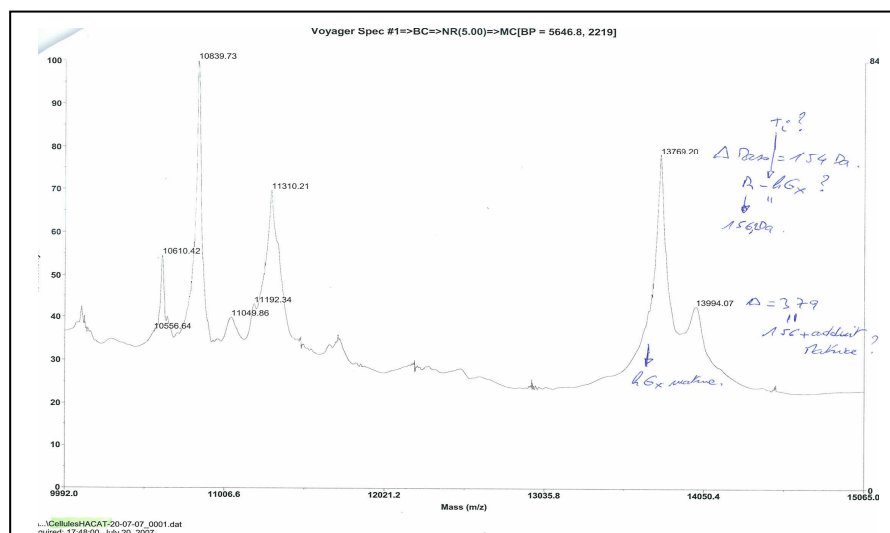
*masse majoritaire

Tableau 6 : Analyse des différentes fractions par dosage d'activité sPLA2 et spectrométrie de masse après purification par phase inverse C18 du test de maturation de la promGX-WT par les lavages bronchoalvéolaires.

Ce tableau montre que la purification sur C18 permet d'obtenir deux pics de protéines séparant les formes inactives (promGX, mipromGX et R-mGX) et la forme mature (mGX) plus hydrophobe. L'absence d'une forte activité sPLA2 dans le premier pic contenant différentes formes dont R-mGX montre qu'aucune de ces formes de mGX n'a une forte activité spécifique. A l'inverse, nous avons détecté une forte activité enzymatique dans le deuxième pic alors que celui-ci représente peu de matériel en termes de densité optique à 280 nm.

4. Maturation dans des cellules exprimant la sPLA2-X de façon endogène (HACAT)

Différentes cellules comme les kératinocytes humains HACAT expriment la sPLA2-X de façon endogène (229, 233). Lorsque ces cellules sont en phase de prolifération, une forte activité sPLA2 est mesurée dans le milieu extracellulaire, indiquant que la forme mature de la sPLA2-X est présente dans le milieu. Ces résultats ne permettent cependant pas de dire si l'enzyme est sécrétée sous forme mature ou bien maturée dans le milieu extracellulaire, ou encore si des formes proenzymes résiduelles sont présentes dans ce milieu. Nous avons donc essayé de déterminer sous quelle(s) forme(s) est présente la sPLA2-X dans le milieu extracellulaire des cellules HACAT. Un surnageant de culture de cette lignée a été récupéré, concentré et analysé par dosage d'activité sPLA2 et immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Dans nos conditions de culture et avec des HACAT provenant d'un autre laboratoire que celui de Schadow et al. nous avons mesuré une activité sPLA2 très faible dans le surnageant concentré HACAT. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse, après immunoprécipitation avec un anticorps polyclonal dirigé contre la sPLA2-X humaine recombinante (capable d'immunoprécipiter toutes les formes de sPLA2) indique la présence d'une forme majoritaire Arg-hGX qui est probablement non active.



Nous n'avons pas eu le temps d'analyser plus en détail les raisons conduisant à la formation de cette forme R-hGX dans nos cellules HACAT alors que les autres cellules HACAT de Schadow et al. 2001 conduisent très probablement à la formation de la sPLA2-X sous une forme complètement mature hGX. Nos résultats suggèrent cependant que le clivage du propeptide pourrait se faire en plusieurs étapes pour conduire à la forme mature hGX, que ce soit à l'intérieur de la cellule, au cours de la sécrétion ou dans le milieu extracellulaire. Il apparaît que nos cellules HACAT possèdent la ou les protéases permettant de couper le propeptide jusqu'au résidu arginine, sans pouvoir enlever ce dernier. Cette forme R-hGX est aussi retrouvée dans certaines de nos coupures ci-dessus, et notamment par des protéases purifiées, suggérant qu'une seule activité protéase suffit pour aller jusqu'à cette forme. Il apparaît donc que la capacité réelle d'une protéase (ou de plusieurs en séquence) à activer la sPLA2-X réside dans la capacité à couper le dernier acide aminé N-terminal (arginine) précédant la glycine de la forme mature. Il faut aussi noter que cette coupure N-terminale correspond à l'attaque d'une arginine dans le contexte particulier d'une sPLA2 avec une surface hydrophobe et relativement plane, et une structure rigide. Au-delà de la spécificité pour un ou deux résidus basiques, il est probable que seules certaines protéases sont capables de reconnaître une arginine dans un tel contexte. Le mécanisme de maturation dans les cellules HACAT (et d'autres cellules ?) pourrait donc se faire en deux étapes de clivage, la première libérant la forme R-hGX, la seconde enlevant l'arginine par une activité de type aminopeptidase.

II. Etude in vivo de la maturation de la sPLA2-X dans les tissus de souris

Nous avons vu ci-dessus que la maturation de la sPLA2-X pouvait se faire par différentes protéases qui sont présentes dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire. Dans le cas des cellules HEK, la maturation se fait clairement en intracellulaire et on ne voit que la forme mGX mature dans le milieu extracellulaire. Dans le cas des cellules LOVO, il semble possible que l'enzyme soit sécrétée sous forme proenzyme et que celle-ci soit maturée dans le milieu de culture. D'autres exemples de la littérature montre que l'on peut trouver un mélange de formes proenzyme et enzyme mature dans le milieu de culture après transfection dans d'autres cellules HEK, des cellules CHO ou des cellules PC12 et BEAS (27-28, 62, 238, 242). Dans ces derniers exemples, il est difficile de savoir si la présence des deux formes est due à la surexpression de la sPLA2 associée à un niveau faible de protéase de maturation. Il est

aussi difficile de conclure si la présence des deux formes dans le milieu est due à une maturation incomplète de la sPLA2 en intracellulaire suivie de la co-sécrétion des deux formes ou bien si la sPLA2 est entièrement sécrétée sous forme proenzyme puis partiellement activée dans le milieu extracellulaire. Les résultats obtenus avec les souris transgéniques surexprimant la sPLA2-X humaine indiquent la présence des deux formes proenzyme et mature dans différents tissus (155). Cependant, la forme proenzyme semble être majoritaire car le niveau d'activité sPLA2 n'est pas fortement augmenté dans les mêmes tissus par rapport à la souris parentale. Ceci suggère que les protéases chargées de la maturation de la sPLA2-X sont exprimées *in vivo* en relative faible quantité. Ces travaux ne permettent cependant toujours pas de savoir où se fait la maturation de la sPLA2-X, et souffrent des mêmes problèmes de surexpression de la sPLA2, avec le risque de saturation des protéases de conversion.

Nous avons donc cherché à savoir si la sPLA2-X exprimée de façon naturelle (sans surexpression) était présente dans différents tissus et milieux extracellulaires sous forme proenzyme ou mature. La présence de la sPLA2 sous forme mature dans un tissu complet serait la preuve d'une maturation efficace tandis que la présence de la sPLA2 sous forme proenzyme indiquerait une maturation finement régulée, avec par exemple une activation dans une condition « stimulée » telle que l'inflammation, etc. De façon plus pointue encore, la présence de la sPLA2 sous forme proenzyme dans le milieu extracellulaire serait un indice fort indiquant que la sPLA2 est sécrétée sous forme proenzyme puis activée « à la demande » dans le milieu extracellulaire.

La sPLA2 de groupe X murine est la plus fortement exprimée dans l'estomac, le côlon et les testicules (100). Le poumon pourrait aussi être intéressant du fait du rôle de cette sPLA2 dans l'asthme ou d'autres pathologies pulmonaires. Nous avons donc successivement travaillé sur des extraits tissulaires de côlon distal et des selles coliques (CC) représentant le contenu présent dans la lumière du côlon, l'estomac et le contenu stomacal (EN) représentant la lumière de l'estomac, les testicules et les épидидymes. Ces extractions ont été faites à partir des souris sauvages ou invalidées pour la sPLA2 mGX afin de déterminer la part relative d'activité sPLA2 due à cette enzyme et obtenir les contrôles adéquats pour nos différentes analyses. L'extraction des protéines a été faite dans une solution très acide (HCl) et en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases afin d'éviter une maturation artéfactuelle de la sPLA2 lors de l'extraction et pouvoir conclure sous quelle forme était présente la sPLA2-X dans le tissu *in vivo*. L'extrait protéique de chaque tissu a été analysé par dosage de la quantité de mGX par la technique de TRFIA, mesure de l'activité sPLA2 et

immunoprécipitation suivie d'un western blot et/ou d'une mesure par spectrométrie de masse pour déterminer la présence des formes proenzyme ou mature.

Au début de notre étude, une immunoprécipitation avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la sPLA2-X murine suivie d'une analyse par spectrométrie de masse nous a permis de détecter dans le côlon distal et les selles de souris normales la présence de la forme mature de mGX (Figure 27). D'après ces premiers résultats, mGX serait donc uniquement présente sous forme active. Il faut noter que cette analyse ne constitue pas une identification formelle de mGX, et qu'il faudrait faire une analyse par MS/MS par exemple pour confirmer ce résultat.

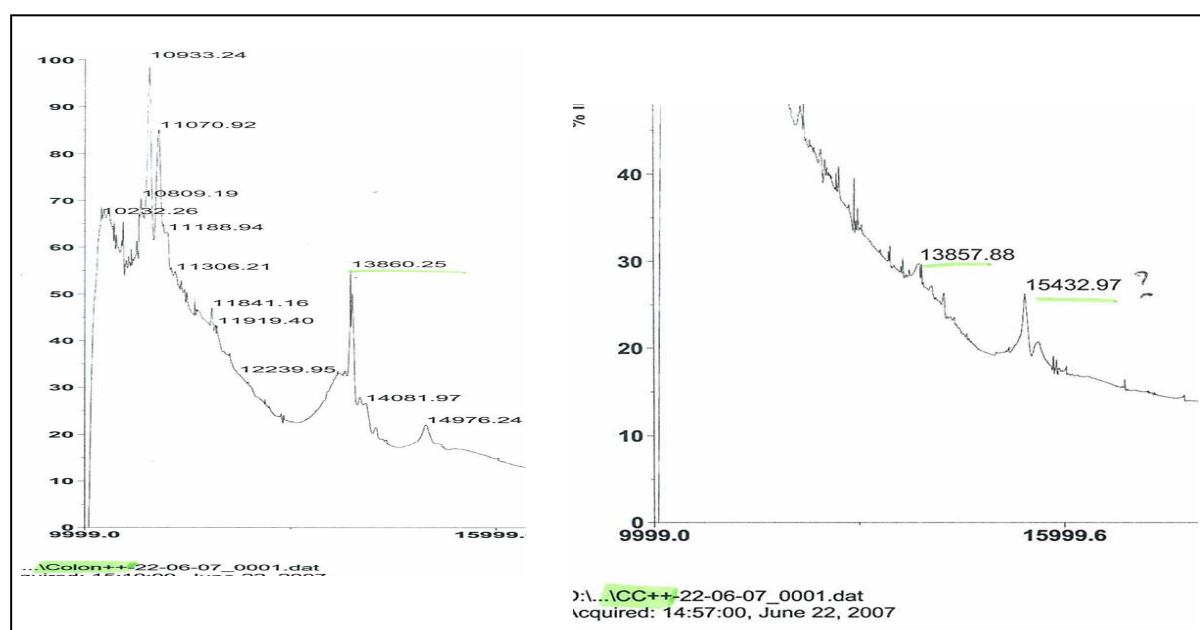


Figure 27: Mesure de la masse moléculaire de la sPLA2-X dans le côlon distal sain et dans les selles (CC) après immunoprécipitation.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons prélevé différents tissus à partir de souris WT et KO. Les tissus de souris KO ont été séparés en deux, et nous avons ajouté une quantité significative de promGX sPLA2 recombinante (500 ng, condition « spikée ») dans une moitié, ceci afin de vérifier que la maturation de cette sPLA2 ne se fait pas dans nos conditions d'extraction.

La figure 28 montre la présence d'une activité sPLA2 importante dans l'estomac, le contenu stomacal et les selles pour les trois groupes de tissus. Cependant, une plus forte activité est observée dans le côlon WT versus KO, suggérant la détection spécifique de la

mGX dans ce tissu. L'activité est aussi plus forte dans le côlon « spiké », cette activité pouvant être due à une maturation incontrôlée de la promGX spikée. Une plus forte activité n'est pas retrouvée dans les autres tissus pour la condition « spikée ». Enfin, les testicules et les épидидymes présentent une faible activité sPLA2, sans différence majeure entre les trois groupes de tissus.

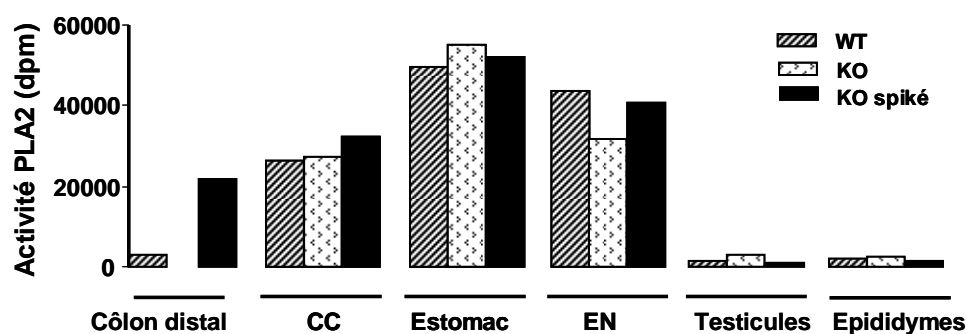


Figure 28: Mesure de l'activité enzymatique dans les différents tissus de souris. EN : contenu stomacal, CC : selles du côlon.

La présence d'une forte activité sPLA2 dans les tissus de souris KO mGX indique la présence d'une autre sPLA2. Sachant que la sPLA2 de groupe IB est fortement exprimée dans l'estomac, nous avons re-dosé l'activité sPLA2 dans les tissus WT du côlon et de l'estomac en présence d'un anticorps spécifique de la sPLA2-IB murine (Figure 29).

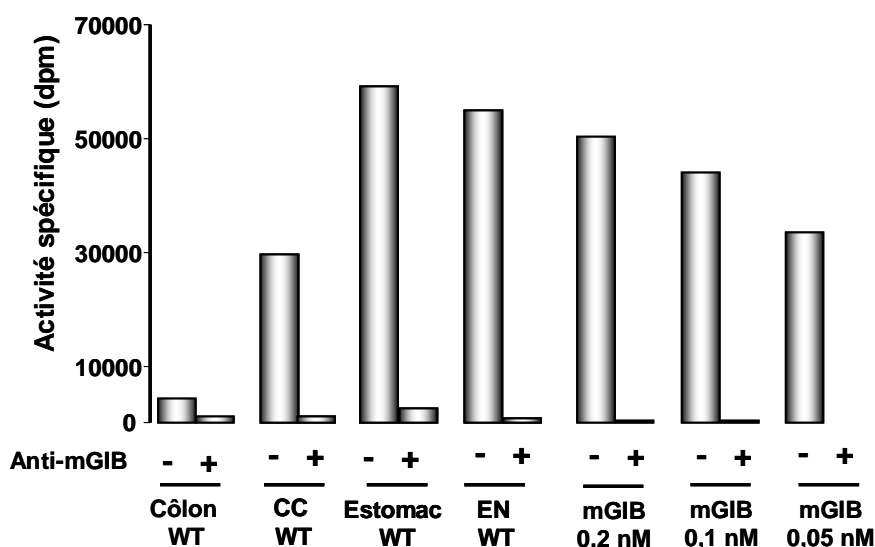


Figure 29: Inhibition de l'activité sPLA2 par la pré-incubation des différents échantillons avec l'anticorps polyclonal de mGIB. La majorité de l'activité sPLA2 est due à la sPLA2-IB.

Il apparaît clairement que la majorité de l'activité sPLA2 dans l'estomac, le contenu stomacal, le côlon et les selles est due à la sPLA2-IB de souris (mGIB). L'activité résiduelle après inhibition par l'anticorps est très faible dans les différents tissus, notamment dans le côlon, et ceci malgré le fait que la sPLA2-X est exprimée dans le côlon à des niveaux proches de mGIB (100). Nous n'avons pas eu le temps de remesurer l'activité sPLA2 entre les conditions WT et KO en présence de l'anticorps anti-mGIB pour observer une différence d'activité entre WT et KO.

Nous avons ensuite déterminé la quantité totale de mGX présente dans les différents échantillons en utilisant la technique de TR-FIA (Figure 30).

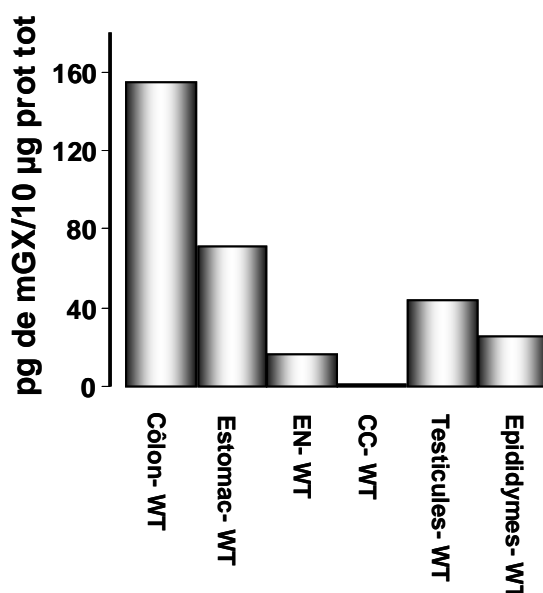


Figure 30: Détermination de la quantité de mGX totale (forme proenzyme et mature) à partir de 10 µg de protéines totales pour chaque tissu. Aucun signal n'est détecté avec les tissus de souris KO.

Comme attendu ces résultats montrent la présence d'une quantité importante de mGX sous ses différentes formes, notamment le côlon. mGX est également présente dans l'estomac, les testicules, l'épididyme et aussi dans le contenu stomacal. Il existe également des traces de cette protéine dans les selles de l'ordre de 8 pg de mGX par 10 µg de protéines totales, ce qui pourrait être en accord avec les premiers résultats de spectrométrie de masse (voir ci-dessus).

Ces dosages de mGX par la masse s'opposent aux dosages d'activité sPLA2 après inhibition par l'anticorps de mGIB, et suggèrent que mGX pourrait être présente dans ces tissus sous forme inactive (proenzyme) ou sous d'autres formes comme la forme mipromGX (coupure après le premier doublet arginine du propeptide) ou la forme R-mGX. Nous n'avons

malheureusement pas encore pu réaliser d'expériences d'immunoprécipitation permettant de déterminer sous quelles formes se trouve mGX dans ces tissus. L'un des problèmes majeurs pour effectuer une analyse par spectrométrie de masse est lié à la faible quantité de mGX présente dans ces échantillons, même si ce sont des tissus « réputés » riches en mGX.

Nous avons aussi essayé de mesurer la présence de mGX dans des lavages bronchoalvéolaires de souris asthmatiques par mesure de l'activité sPLA2 et par TRFIA (données non montrées). Nous avons pu observer que la sPLA2 était présente par TRFIA à hauteur de quelques ng par ml de lavages. De telles quantités sont insuffisantes pour une analyse plus poussée par spectrométrie de masse.

Ces résultats *in vivo* ont montré que la sPLA2-X est présente dans plusieurs tissus de souris et qu'elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire peut être sous forme inactive. La manière dont se fait la maturation de promGX dans ces différents tissus dans des conditions physiologiques reste inconnue. Nous pouvons aussi attendre que certaines conditions physiopathologiques (cancer, inflammation, infection bactérienne...) puissent contribuer à l'activation de cette enzyme.

III. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du polymorphisme pour la phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Article 2

Article 2 : publié à J. Mol. Med : (287)

Cet article a été publié par l'équipe de Sonia Karabina (INSERM, Paris) en collaboration avec notre équipe. Il a permis de mettre en évidence un polymorphisme présent dans le propeptide de la sPLA2 de groupe X humaine qui conduit à la formation d'une protéine mal repliée, inactive et rapidement dégradée.

Le but de ces travaux était de rechercher une relation entre les différents polymorphismes du gène de la sPLA2-X et le développement de pathologies cardiovasculaires dans lesquelles la sPLA2-X humaine semble être impliquée (cf introduction).

Huit polymorphismes ont été trouvés dans le gène de la sPLA2-X. Seul le polymorphisme T-512 détecté dans une région 5' non codante apparaît associé à une diminution du risque cardiovasculaire.

Le seul polymorphisme « non silencieux » conduit à une mutation R38C dans le propeptide de la sPLA2-X humaine. L'analyse fonctionnelle de ce polymorphisme à laquelle j'ai participé a montré que la mutation R38C conduit à une forte diminution de l'expression et de l'activité sPLA2 après transfection dans des cellules COS. Ceci est probablement dû à la modification structurale de la sPLA2-X humaine lors des étapes de repliement au niveau du réticulum endoplasmique.

Ce polymorphisme R38C n'apparaît cependant pas associé à la maladie cardiovasculaire, au moins dans le cas de la cohorte « Athérogène ». Il reste cependant possible que ce polymorphisme soit associé à d'autres pathologies inflammatoires ou infectieuses impliquant la sPLA2.

Molecular and functional characterization of polymorphisms in the secreted phospholipase A2 group X gene: relevance to coronary artery disease

Sarah Gora · Claire Perret · Ikram Jemel · Viviane Nicaud · Gérard Lambeau · François Cambien · Ewa Ninio · Stefan Blankenberg · Laurence Tiret · Sonia-Athina Karabina

Received: 27 January 2009 / Revised: 17 April 2009 / Accepted: 29 April 2009
© The Author(s) 2009. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Among secreted phospholipases A2 (sPLA2s), human group X sPLA2 (hGX sPLA2) is emerging as a novel attractive therapeutic target due to its implication in inflammatory diseases. To elucidate whether hGX sPLA2 plays a causative role in coronary artery disease (CAD), we screened the human *PLA2G10* gene to identify polymorphisms and possible associations with CAD end-points in a prospective study, *AtheroGene*. We identified eight polymorphisms, among which, one non-synonymous polymorphism R38C in the propeptide region of the sPLA2. The T-512C polymorphism located in the 5' untranslated region was associated with a decreased risk of recurrent cardiovascular events during follow-up. The functional analysis of the R38C polymorphism showed that it leads to a profound change in expression and activity of hGX sPLA2, although there was no detectable impact on CAD risk. Due to the potential role of hGX sPLA2 in

inflammatory processes, these polymorphisms should be investigated in other inflammatory diseases.

Keywords Secreted phospholipase A2 · hGX sPLA2 · PLA2G10 · Polymorphisms · CAD

Introduction

Secreted phospholipases A2 (sPLA2) form a growing family of enzymes that hydrolyze the *sn*-2 position of glycerophospholipids to generate proinflammatory lipid mediators, lysophospholipids, and free fatty acids. Ten enzymatically active sPLA2s have been identified in mammals. Increased sPLA2 activity has been shown to be an independent risk factor for coronary artery disease (CAD) [1], and group IIA, III, V, and X sPLA2s have been detected in human atherosclerotic lesions [2–5]. The tissue-specific expression pattern and the enzymatic properties of the various sPLA2s suggest that the cellular role of each of these enzymes is different [6]. Studies with transgenic and knockout mice for different sPLA2s support the above hypothesis [4, 7–10].

Among sPLA2s, the role of human group X sPLA2 (hGX sPLA2) is emerging as several studies show its implication in various inflammatory diseases [8, 9, 11–13]. The gene encoding hGX sPLA2 (*PLA2G10*) maps to human chromosome 16p13.1-p12. A 1.5-Kb transcript was found in the thymus, spleen, and leukocytes, indicating a possible role for hGX sPLA2 in immunity and/or inflammation [14]. One of the key features of hGX sPLA2 is its high catalytic activity towards phosphatidylcholine (PC), the major phospholipid of cell membranes and

Claire Perret and Ikram Jemel contributed equally to this paper.

S. Gora · C. Perret · V. Nicaud · F. Cambien · E. Ninio · L. Tiret · S.-A. Karabina (✉)
INSERM, UMRS937,
UPMC Université Paris 06 and Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie,
91, Boulevard de l'Hôpital,
75634 Paris, France
e-mail: akarampi@chups.jussieu.fr

I. Jemel · G. Lambeau
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire,
CNRS and Université de Nice Sophia-Antipolis,
Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France

S. Blankenberg
Department of Medicine II, Johannes Gutenberg University,
Mainz, Germany

lipoproteins. This substrate preference is due to the presence of a tryptophan residue on the interfacial binding surface of the enzyme [15]. On the basis of the structural similarities between platelet-activating factor (PAF) and PC, we demonstrated that hGX sPLA2, but not other sPLA2s, can efficiently hydrolyze PAF when it is incorporated into large unilamellar PC phospholipid vesicles and when it is present in PC-rich lipoproteins [16]. This suggests that hGX sPLA2 may be a novel player in PAF regulation during inflammatory processes. hGX sPLA2 can also efficiently hydrolyze lipoproteins (low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL)), preferentially releasing arachidonic and linoleic acids [17, 18]. Finally, we have recently shown that hGX sPLA2 is present in human atherosclerotic lesions and that the hydrolysis of LDL by hGX sPLA2 results in a modified LDL particle that induces lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages [2].

Recent studies using *PLA2G10*-deficient mice in a model of ischemia reperfusion showed that deficiency in GX sPLA2 leads to a reduction in myocardial ischemia reperfusion injury as neutrophil functions were suppressed [11]. Several studies implicated hGX sPLA2 in the pathogenesis of inflammatory diseases such as asthma [9], and recent data support the idea that hGX sPLA2 may be an important therapeutic target in diseases where inflammation plays an important role, including atherosclerosis.

The aim of the present study was to examine the variability of the *PLA2G10* gene and to determine whether it plays a role in CAD and its complications. In addition, we examined the potential functional impact of the non-synonymous R38C polymorphism on the expression and activity of the enzyme.

Materials and methods

Study populations

The SIPLAC study The SIPLAC study was specifically designed to investigate the variability of candidate genes for myocardial infarction (MI) in groups highly contrasted for disease risk and to further characterize the structure of linkage disequilibrium (LD) within these genes in order to select the polymorphisms that will be genotyped in larger studies. It is derived from *Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde* (ECTIM), a case-control study of MI based on the multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease project registers in the UK and France [19]. The entire ECTIM study comprised 1,332 MI patients and 1,490 controls (62% from UK, 21% female). For the SIPLAC sub-study, cases with MI and a parental history of MI ($n=312$, 35% females, mean age: $56\pm$

16 years) and controls without CAD and without parental history of MI ($n=317$, 42% females, mean age: 59 ± 15 years) were selected from the samples recruited in Belfast and Glasgow. All participants were of European descent and gave an informed consent.

The AtheroGene study Baseline characteristics are provided in Table 1; whereas, detailed description of the study has been provided elsewhere [20, 21]. Briefly, between November 1996 and June 2000, 1,303 CAD patients (75% males, mean age: 61.7 ± 0.3 years) were recruited at the Department of Medicine II of the Johannes Gutenberg University Mainz and the Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz at the occasion of a diagnostic coronary angiography. A priori inclusion criterion was the presence of a diameter stenosis $>30\%$ in at least one major coronary artery. Exclusion criteria were evidence of significant concomitant diseases, in particular, hemodynamically significant valvular heart disease, known cardiomyopathy, and malignant diseases, as well as febrile conditions. Patients were followed-up during a median period of 6.2 years. Follow-up information was obtained about death from cardiovascular causes and non-fatal MI ($n=235$). Informa-

Table 1 Baseline characteristics of patients with coronary artery disease in the *AtheroGene* study according to occurrence of cardiovascular event (cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction) during follow-up

	Cardiovascular event		
	No ($n=1,039$)	Yes ($n=235$)	<i>p</i> value
Age, years	61.0 (0.3)	63.8 (0.6)	<0.0001
Females, %	25.1	25.5	0.90
Body mass index	27.2 (0.1)	27.3 (0.2)	0.68
Current smoker, %	12.3	16.6	0.08
Diabetes, %	14.6	22.1	0.005
Hypertension, %	72.6	74.0	0.65
Statin, %	36.5	29.4	0.04
Beta-blocker, %	59.9	54.5	0.13
Angiotensin-converting enzyme inhibitors, %	45.9	53.2	0.04
Total cholesterol, mg/dL	220.9 (1.4)	214.5 (2.9)	0.05
LDL cholesterol, mg/dL	141.6 (1.2)	138.3 (2.6)	0.27
HDL cholesterol, mg/dL	49.0 (0.4)	45.1 (0.9)	0.0002
Triglyceride, mg/dL ^a	167.8 (3.2)	172.7 (6.9)	0.15
Fibrinogen, mg/dL ^a	354.2 (3.8)	386.1 (8.0)	0.0002
hs-CRP, mg/L ^a	13.8 (1.0)	19.5 (2.1)	0.01

Categorical variables are presented as percentages; continuous variables are presented as age- and sex-adjusted mean (SEM)

^a Test performed on log-transformed variable

tion about the cause of death or clinical events was obtained by hospital or general practitioner. Healthy control subjects ($n=484$, 73% males, mean age 60.0 ± 0.4 years) were recruited either from general practitioners' offices in the course of a routine check-up or by newspaper announcement. Study participants had German nationality, were inhabitants of the Rhein-Main area, and were of Caucasian origin. The study was approved by the ethics committee of the University of Mainz. Each participant gave written informed consent.

Molecular screening of the *PLA2G10* gene and genotyping of the polymorphisms

We screened the *PLA2G10* gene using the genomic sequences retrieved from public depositories. The screening of the gene was performed using genomic DNA from 62 unrelated MI patients selected from the ECTIM study (<http://www.genecanvas.org>). Using polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing, we explored 1 kb of the promoter, the entire exonic sequences with their corresponding flanking intronic sequences, and 1 kb of the 3' region after the codon stop. The sequences were aligned and analyzed with the SeqScape software (Applied Biosystems) to determine the potential polymorphisms. The genotyping of the polymorphisms was performed using a modified PCR-restriction fragment length polymorphism method or the TaqMan (5' nuclease assay) technology. The description of polymorphisms and genotyping conditions can be found at our web site (<http://www.genecanvas.org>, genes: *PLA2G10*).

Statistical analysis

Differences in genotype frequencies between cases and controls were tested by a χ^2 test with 2 degrees of freedom (*df*), adjusted for center in the SIPLAC study (Mantel–Haenszel test). Allele frequencies were deduced from genotype frequencies. Departure from Hardy–Weinberg equilibrium was tested for each polymorphism in controls by χ^2 testing with 1 *df*. *P* values < 0.05 were taken as significant.

LD and haplotype analyses were performed using the Testing Haplotype EffectS In Association Studies (THESIAS) program available online (<http://www.genecanvas.org>) [22]. Differences in haplotypic frequency distributions between cases and controls in the *AtheroGene* study were tested by means of the likelihood ratio test. Associations between polymorphisms and cardiovascular risk factors (lipids and inflammatory markers) were tested by a general linear model adjusted for age and sex. Association of genotypes with prospective cardiovascular outcome was tested by a Cox

proportional hazards regression analysis adjusted for age and sex.

Functional analysis of the *PLA2G10*/R38C polymorphism

DNA construct

Active human GX sPLA2 complementary DNA (cDNA) starting at the second methionine initiator site, containing additional nucleotide sequences for expressing the hemagglutinin epitope tag (HA tag, nine amino acids YPYDVP-DYA) at the C terminus of human GX sPLA2 protein, were generated by PCR, using the forward oligonucleotide (5' *TGTCGAATTCTGCAGATATCCCGCCATGCTGCTCCTGCTACTGCC*_3') with EcoRI and EcoRV sites (*italics*), and reverse oligonucleotide (5' *CTTAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA GATATCGTCACACTTGGGCGAGTC*_3') with EcoRI and NotI sites (*italics*), stop codon (underlined), and additional nucleotide sequences (**bold**) coding for the HA tag sequence. The amplified fragments were purified, digested with EcoRI and NotI, and inserted into the EcoRI and NotI sites of pcDNA3 vector to generate the expression plasmid pcDNA-hGX-HA. All constructs were confirmed by sequencing. Inserting the HA tag at the C terminus of hGX sPLA2 protein has no effect on hGX sPLA2 activity (data not shown).

Site-directed mutagenesis

The pcDNA-hGX-HA construct was used as a template in the Quick-change site-directed mutagenesis procedure according to manufacturer's instructions. Forward mutagenic primer used to create the R38C point mutation was 5' *GGCGAGGCCTCCAGGATATTA***tGTGTGCACCGGCGTGGGATCC** -3'. Text in bolded lowercase represents the mismatch base introduced to obtain the desired mutation. Reverse mutagenic primer was of the same length and complementary to the forward mutagenic primer. Following amplification, the reaction mixture was treated with DpnI to eliminate the template DNA. Each of the mutated amplification products were transformed into max efficiency DH5 α *Escherichia coli* strain (Invitrogen), and mutations were confirmed by DNA sequencing of the resulting constructs.

Constructs containing the R38 or the C38 allele

COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified essential medium containing 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin. Confluent cells (75%) were harvested with trypsin and transfected with the above-described constructs containing the R38 or C38 harboring cDNA and pmax green fluorescent protein

(GFP; Amaxa) using the Cell line nucleofector kit V and Amaxa nucleofector (Amaxa Inc.) according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency was estimated 24 h after electroporation by fluorescence activated cell sorter analysis. The number of GFP positive cells in a sample of pmaxGFP (Amaxa)-transfected cells varied between 75% and 79%. After transfection, cells were cultured in 6-well plates for 24 h additionally at 37°C. Selected experiments were performed at both 37°C and 30°C.

Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FLA) and phospholipase A2 activity

Cell lysates extracted in radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer and cell supernatants were directly used for time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) to detect hGX sPLA2 protein concentration as described [23]. hGX sPLA2 enzymatic activity was determined using radiolabeled *E. coli* membranes as previously described [24].

Fluorescence immunocytochemistry and confocal microscopy

COS-7 cells were transiently transfected with HA-tagged either wild-type or mutant hGX sPLA2 as described below. 24 h after transfection, the phosphate buffer solution (PBS)-washed cells were fixed in 4% paraformaldehyde. Cells were permeabilized with methanol for 10 min. Washed cells were incubated in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA; PBS/BSA) for 1 h. Incubation with primary antibodies (rabbit polyclonal hGX sPLA2, mouse monoclonal protein disulphide isomerase (PDI; Stressgen) for endoplasmic reticulum (ER) staining, and mouse monoclonal Golgi 58 K protein (Sigma) for Golgi apparatus) were carried out in PBS/BSA for 1 h at reverse transcription (RT). Cover slips were subsequently washed four times in PBS/BSA and incubated with secondary antibodies (fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse, Cy5-conjugated anti-rabbit (Dako)) and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.5 mg/ml) for 1 h at RT. Cover slips were washed in PBS and mounted in Moviol. Confocal analysis was performed on a Leica SP2-AOBS confocal microscope, and the images were taken using alternating mode to minimize the channel interference (Leica confocal software).

Results

Screening of the gene

The organization of the *PLA2G10* gene is shown in Fig. 1. It consists of four exons (537, 151, 107, and 143 bp, respectively) and three introns (3,488, 2,223, and

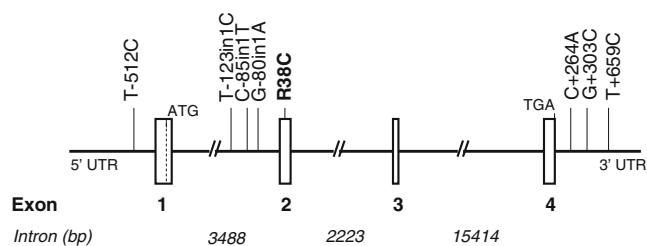


Fig. 1 Schematic representation of the human *PLA2G10* gene and the position of SNPs. Exons are shown as vertical bars. Intron size is indicated. Exons 1–4 encode for the 123 amino acid hGX sPLA2 protein. The polymorphism that resulted in arginine to cysteine substitution is shown in bold

15,414 bp, respectively). We screened all exonic sequences with their corresponding flanking intronic sequences, as well as 1 kb in the putative promoter region and 1 kb after the stop codon. From our molecular screening in 124 chromosomes from 62 unrelated subjects, we identified eight polymorphisms (Table 2) which were first genotyped in the SIPLAC study in order to determine their allelic and haplotypic frequencies. Their description can be found at our web site (<http://www.genecanvas.org>, genes: *PLA2G10*).

PLA2G10 polymorphisms in the SIPLAC study

Seven polymorphisms were investigated in SIPLAC. C-85/in1T was not typed because of technical difficulties. The T+659C substitution, which had been found in a single chromosome among the 124 chromosomes screened, was not observed among the SIPLAC subjects. Accordingly, pairwise LD coefficients were estimated among the six remaining polymorphisms. All polymorphisms exhibited strong LD one with each other, and the six polymorphisms generated eight common haplotypes (frequency > 0.01). Genotype frequencies did not significantly differ between cases and controls for any polymorphism in the SIPLAC study (Table 3). The LD coefficients and haplotypic frequencies estimated in the SIPLAC study are accessible at (<http://www.genecanvas.org>, genes: *PLA2G10*).

Association of the *PLA2G10* polymorphisms with CAD risk in the AtheroGene study

The AtheroGene study was genotyped for five polymorphisms: T-512C, T-123/in1C, R38C, C+264A, and G+303C. There was no significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium in controls. In single-locus analysis, none of the polymorphisms was significantly associated with CAD risk (Table 4). Haplotype frequencies did not differ between cases and controls (Table 5). Further subdivision of CAD cases into patients with stable angina pectoris and those with an acute coronary syndrome did not provide significant associations.

Table 2 Polymorphisms identified in the *PLA2G10* gene (chromosome 16)

Polymorphism	SNP ID	Base substitution on reverse strand	Gene location	Chromosomal position
T-123/in1C	rs#4003232	T/c	Intron 1	14692126
C-85/in1T ^a	rs#35822154	C/t	Intron 1	14692088
G-80/in1A	rs#34782548	G/a	Intron 1	14692083
R38C	rs#4003228	C/t	Exon 2	14691989
C+264A	ss#105111473	C/a	3'	14673705
G+303C	ss#105111474	G/c	3'	14673666
T+659C	ss#105111475	T/c	3'	14673310

^aNot genotyped owing to technical difficulties

Association of polymorphisms with cardiovascular risk factors and prospective cardiovascular outcome in the AtheroGene study

No significant association was found with baseline lipids or inflammatory markers (data not shown). In CAD patients, the minor allele of T-512C was associated with a decreased risk of death from cardiovascular causes and non-fatal MI during the follow-up (hazard ratio [95% CI] for one copy of

Table 3 Genotype and minor allele frequencies in myocardial infarction cases (*n*=312) and controls (*n*=317) of the SIPLAC study (Belfast and Glasgow pooled, UK)

		Genotype frequency (%)			<i>p</i> value adjusted for center	Minor allele frequency
		11	12	22		
T-512C	Cases	36.2%	48.3%	15.5%	0.31	0.40
	Controls	41.8%	46.6%	11.6%		
T-123/in1C	Cases	61.0%	34.2%	4.8%	0.55	0.22
	Controls	57.6%	35.5%	6.9%		
G-80/in1A ^a	Cases	54.9%	38.5%	6.6%	0.40	0.26
	Controls	49.3%	41.5%	9.2%		
R38C	Cases	97.0%	3.0%	0.0%	0.30	0.02
	Controls	95.2%	4.8%	0.0%		
C+264A	Cases	87.5%	12.1%	0.4%	0.82	0.06
	Controls	89.3%	10.3%	0.4%		
G+303C	Cases	92.1%	7.9%	0.0%	0.97	0.04
	Controls	92.3%	7.7%	0.0%		

11 homozygotes for the major allele, 12 heterozygotes, 22 homozygotes for the minor allele

^aNearly complete concordance with T-123/in1C (85% of subjects concordant for the 2 polymorphisms)

Table 4 Genotype and minor allele frequencies in coronary artery disease cases (*n*=1,299) and controls (*n*=484) of the AtheroGene study (Mainz, Germany)

		Genotype frequency (%)			<i>p</i> value	Minor allele frequency
		11	12	22		
		T-512C	Cases	46.6%		
Controls	46.0%	43.4%	10.6%			
T-123/in1C	Cases	60.4%	33.9%	5.7%	0.50	0.23
	Controls	57.7%	36.9%	5.4%		
R38C	Cases	96.4%	3.5%	0.1%	0.50	0.02
	Controls	95.4%	4.6%	0.0%		
C+264A	Cases	90.0%	9.8%	0.2%	0.68	0.05
	Controls	90.4%	9.6%	0.0%		
G+303C	Cases	96.0%	4.0%	0.0%	0.29	0.02
	Controls	94.8%	5.2%	0.0%		

11 homozygotes for the major allele, 12 heterozygotes, 22 homozygotes for the minor allele

the C allele assuming an additive allele effect: 0.76 [0.62–0.94] *p*<0.01) and Table 6.

Functional study of the R38C polymorphism

Because of the potential role of hGX sPLA2 in inflammatory processes, we investigated whether the non-synonymous R38C polymorphism might have a functional impact on the protein. The R38C polymorphism, by substituting an arginine to a cysteine at codon 38 (Fig. 2a), leads to an odd number of cysteines in the hGX sPLA2 protein, which may result in misfolding and/or mistargeting and subsequent protein degradation. To analyze the effect of the mutation, we prepared plasmid constructs for HA-tagged hGX sPLA2 with R38 or C38

Table 5 Main haplotypic frequencies estimated in coronary artery disease cases and controls of the AtheroGene study

Haplotypes					Frequency	
T-512C	T-123/in1C	R38C	C+264A	G+303C	Cases (2,426 alleles)	Controls (940 alleles)
T	T	R	C	G	0.399	0.390
c	T	R	C	G	0.297	0.293
T	c	R	C	G	0.208	0.217
T	T	R	a	G	0.054	0.048
c	T	R	C	c	0.018	0.026
T	c	C	C	G	0.014	0.017

Global difference between cases and controls: *p*=0.72

Table 6 Hazard ratio for cardiovascular event at follow-up associated with the -512C allele

Cardiovascular event		T-512C genotype		
		TT	TC	CC
No	Number	469	461	109
	Percent	45.1%	44.4%	10.5%
Yes	Number	125	94	16
	Percent	53.2%	40.0%	6.8%
Hazard ratio (95% CI)		0.76 [0.62–0.94] $p < 0.01$		

Cardiovascular event: cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction

Median time at follow-up: 6.2 years

Hazard ratio for one copy of the C allele, assuming an additive allele effect adjusted on age and sex

in the propeptide segment by site-directed mutagenesis and analyzed their expression after transient transfection into COS-7 cells. Fluorescence immunocytochemistry performed 24 h after transfection showed that both R38 and

C38 proteins are present intracellularly (Fig. 2b). To determine the subcellular location of the C38 protein, cells were fixed and immunostained with antibodies to PDI and 58 K Golgi proteins, which are well established markers of the ER and the Golgi apparatus, respectively. No difference was observed in their subcellular localization as both R38 and C38 proteins colocalized with ER and Golgi apparatus (Fig. 3a, b).

We next determined the level of expression of hGX sPLA2 in cell lysates and cell supernatants by measuring catalytic activity with the sensitive *E. coli* assay [25] and total protein amount by TR-FIA [23]. In both cell lysate and supernatant, the level of sPLA2 catalytic activity measured for the C38 protein was dramatically lower than that measured for the R38 protein (Fig. 4a). TR-FIA analyses confirmed the lower expression of the C38 sPLA2 protein as compared to R38 (Fig. 4b). Together, our results indicate that the R38C polymorphism has a profound impact on protein activity and expression. In order to test whether the mutation has an impact on the expression of hGX sPLA2 at the messenger RNA (mRNA) level, we performed real-time quantitative PCR (RT-QPCR) analysis

Fig. 2 a Schematic representation of the hGX sPLA2 protein containing the R38C polymorphism in the propeptide region. The arginine doublet preceding the mature protein sequence is indicated in *bold*. The *arrow* indicates the allelic substitution, and the amino acid change (arginine R to cysteine C) is indicated in *red*. **b** Immunofluorescence localization of hGX sPLA2 in COS-7 cells transfected with vectors encoding the R38 and the C38 proteins. The hGX sPLA2 protein is labeled with *red*. Nucleus is labeled in *blue* with DAPI. Confocal analysis was performed on a Leica SP2-AOBS confocal microscope as described in “Materials and methods”. Magnification: 50

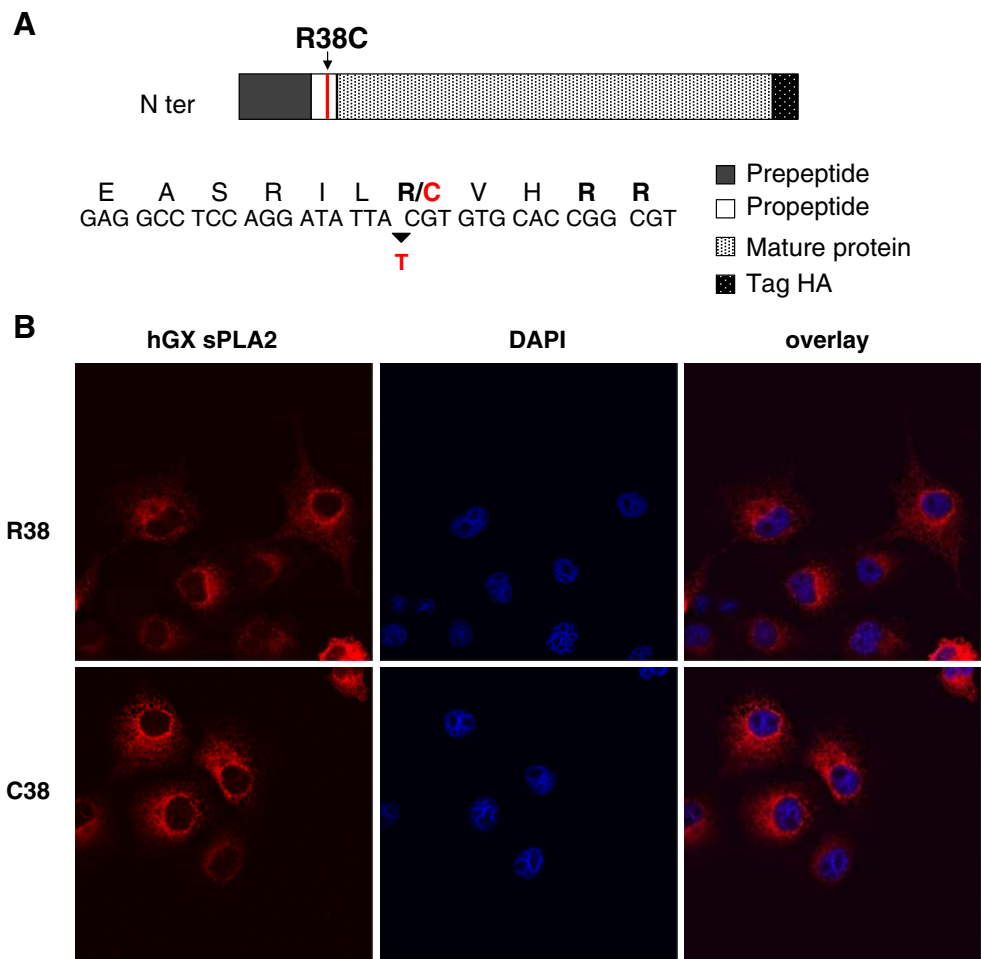
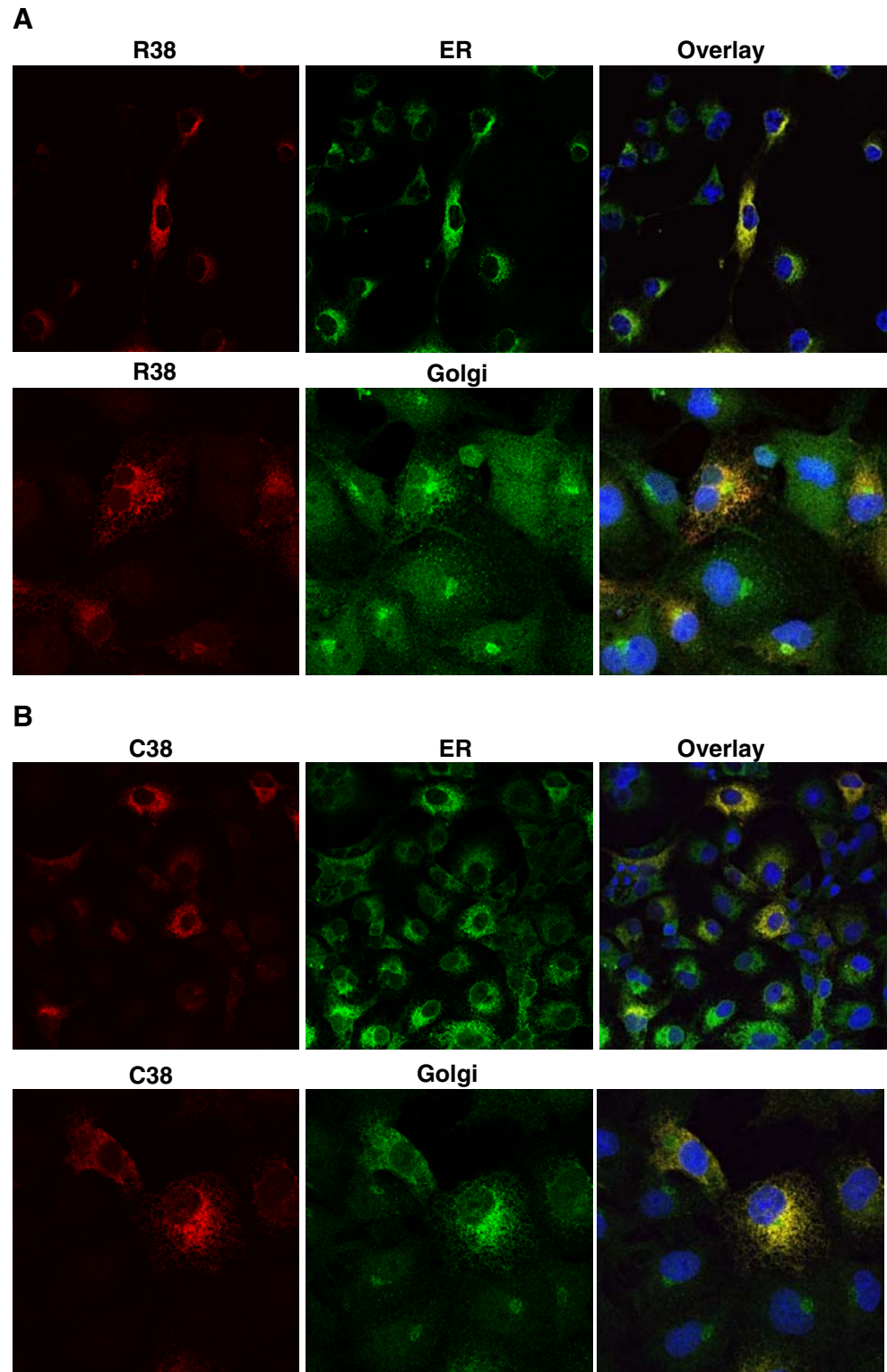


Fig. 3 Subcellular immunofluorescence localization of hGX sPLA2 in COS-7 cells transiently transfected with vectors encoding either (a) R38 or (b) C38 hGX sPLA2. Twenty hours after transfection cells were fixed and stained with rabbit polyclonal against hGX sPLA2 (red) and either a mouse monoclonal against the ER marker PDI (green), or a mouse monoclonal against the Golgi apparatus marker 58 K protein (green). Nucleus is labelled in blue with DAPI. Confocal analysis was performed on a Leica SP2-AOBS confocal microscope as described in “Materials and methods”. Magnification 50 for ER and 100 for Golgi



of COS-7 transfected cells with either the mutant or the wild type protein. The expression of hGX sPLA2 mRNA in cells transfected with the two expression plasmids was similar (data not shown), suggesting that the polymorphism has no effect on the mRNA production and stability.

Reduction of cell growth temperature to 30°C has been shown to rescue protein expression and folding of different proteins [26]. To validate our hypothesis that the mutation affects the folding of the hGX sPLA2, we performed parallel transfections of COS-7 cells with the C38 and R38

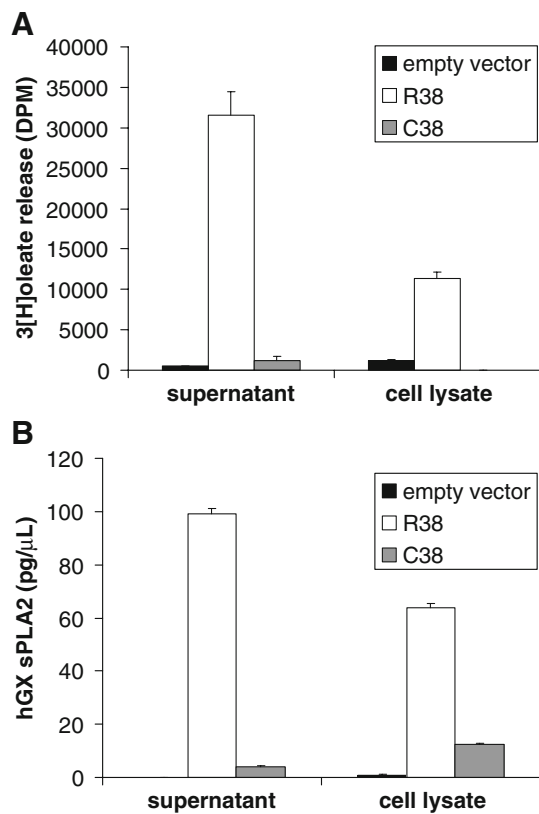


Fig. 4 **a** hGX sPLA2 enzymatic activity measured with radiolabeled *Escherichia coli* membranes in supernatant and cell lysates of COS-7 cells transfected either with an empty vector or with vectors encoding the R38 or C38 proteins as described in “Materials and methods”. A representative experiment of at least three experiments with similar results is shown. **b** Concentration of hGX sPLA2 protein quantified in supernatant and cell lysates of COS-7 cells transfected either with an empty vector or with vectors encoding the R38 or C38 proteins using TR-FIA assay as described in “Materials and methods”. A representative experiment of at least three experiments with similar results is shown

expression constructs and then incubated the cells at either 30°C or 37°C. Results of TRF-IA assays showed that incubation of cells at 30°C dramatically increased the amount of the C38 protein in both cell lysate and supernatant when compared to cells incubated at 37°C (Fig. 5a, b). As expected, no major effect was observed for the R38 construct (Fig. 5a, b). However, the increased amount of C38 protein was not accompanied by an increased level of sPLA2 activity in the cell supernatant (Fig. 5c), indicating that the overexpressed protein produced at 30°C is not catalytically active. Together, these results suggest that the C38 mutation results in the production of a defective enzyme, which is likely to be misfolded and rapidly degraded.

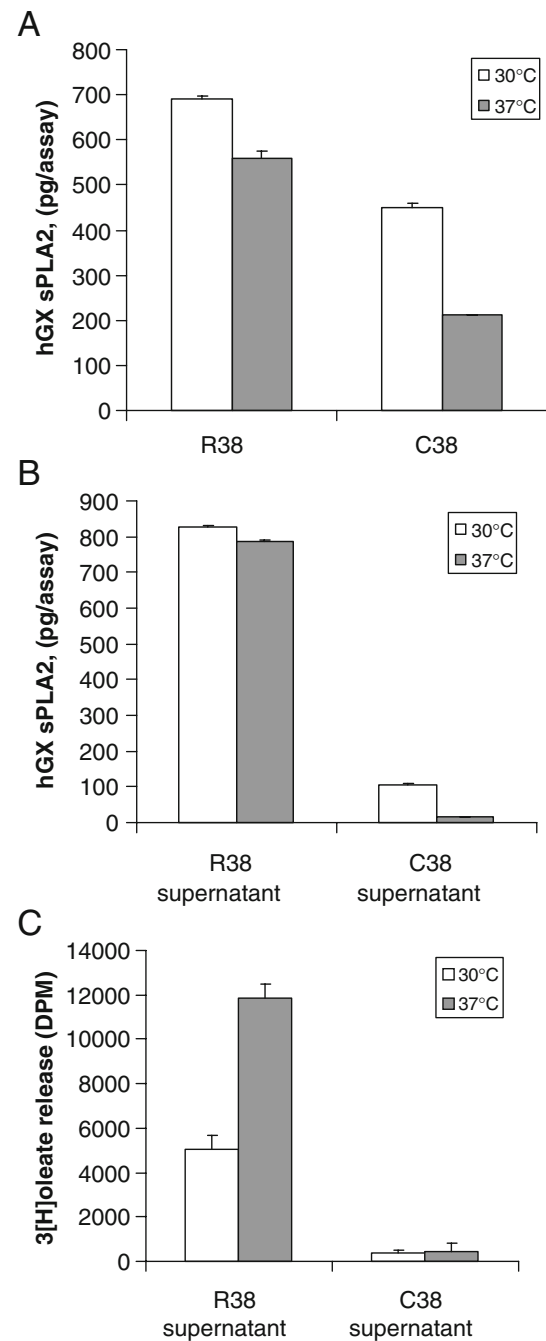


Fig. 5 Effect of temperature cell growth on the expression of hGX sPLA2. COS-7 cells transfected with either R38- or C38-containing expression vectors were grown at 30°C or 37°C for 72 h. The total amount of hGX sPLA2 protein was then quantified in the cell lysate (**a**) and supernatant (**b**) using the TR-FIA assay as described in “Materials and methods”. **c** COS-7 cells transfected with either the R38- or C38-containing or empty expression vectors were grown at 30°C or 37°C for 72 h, and hGX sPLA2 activity was measured in cell supernatants as described in “Materials and methods”. Cells transfected with the empty vector showed no detectable hGX sPLA2 protein or enzyme activity (not shown)

Discussion

Growing evidence suggests that sPLA2s IIA, III, V, and X are involved in various inflammatory diseases including CAD and cancer [6, 27]. Circulating levels of sPLA2 activity is an independent predictor of death and new or recurrent MI in patients with acute coronary syndrome [28]. Serum levels of sPLA2 GIIA are linked to variations in the *PLA2G2A* gene while tagging single nucleotide haplotypes reveal a strong association of the *PLA2G5* gene with lipid levels (LDL and oxidized LDL) [29, 30]. Considering the simultaneous expression of IIA, III, V, and X enzymes in the atherosclerotic plaque, it becomes challenging to elucidate the pathophysiological roles of each enzyme in the arterial wall. Using a genetic approach, we identified polymorphisms in the gene coding for hGX sPLA2 and examined whether these polymorphisms play an etiological role in CAD. Our study identified eight polymorphisms, one of which results in the substitution of arginine 38 to cysteine (R38C) in the propeptide sequence of the sPLA2. The full open-reading frame of the hGX cDNA encodes for a signal peptide of 21 amino acids followed by a propeptide sequence of 11 amino acids ending with an arginine doublet and a mature acidic protein of 123 amino acids [14]. The R38C polymorphism is located in the propeptide region of the protein near the putative arginine doublet cleavage site. Overexpression of GX sPLA2 in transgenic mice showed that the zymogen form of the enzyme predominates in most tissues, and that certain inflammation-associated proteases may play a role in activating the enzyme [10]. Conversely, recombinant expression of hGX sPLA2 in various eukaryotic cells leads to the predominant release of the active enzyme, making unclear whether the enzyme is secreted in an active form after propeptide removal before secretion or whether the enzyme is secreted as a proenzyme and then matured extracellularly [8, 31]. The fact that R38C mutation may alter the formation of disulfide bonds and thus the folding of hGX sPLA2, led us to examine its impact on sPLA2 protein expression. Fluorescence immunocytochemistry experiments in COS-7 cells transiently transfected with wild-type and mutant hGX sPLA2 cDNAs showed that both proteins are present in ER and Golgi compartments. Analysis of protein expression and enzymatic activity to reveal an active secretion clearly showed that the mutation lowered the total amount of protein produced by COS-7 cells, prevented its efficient secretion, and resulted in low or no detectable enzymatic activity. When transfected cells were grown at 30°C, a temperature that rescue the folding of various mutated proteins [26], we observed an increased production of the C38 protein in cell lysate and supernatant of transfected

cells, but no increase in sPLA2 enzymatic activity. Together, these results support our hypothesis that the R38C mutation produces a misfolded protein that is catalytically inactive and rapidly degraded.

Despite the functional effects observed for the R38C polymorphism at the protein level, no association was observed between this polymorphism and CAD risk or cardiovascular risk factors in the *AtheroGene* study and the SIPLAC study. This lack of association might be explained by the low frequency of the C38 allele (approximately 3%) and, consequently, the low power of the present studies to detect an association. Furthermore, due to the unavailability of suitable substrates to distinguish between different sPLA2s, the circulating level of GX sPLA2 could not be investigated as an intermediate phenotype in the *AtheroGene* study. In addition to the R38C polymorphism, we identified other polymorphisms in the putative regulatory region of the *PLA2G10* gene. The T-512C was associated with the risk of future cardiovascular event during the prospective follow-up of the *AtheroGene* cohort. However, this polymorphism was not associated with CAD or MI risk in a case/control setting and did not correlate with any cardiovascular risk factor. This result has thus to be taken with caution and requires further replication in other cohorts. As this polymorphism is located in the putative promoter region of the gene, it might influence the expression level of the enzyme; however, the promoter of the *PLA2G10* is still unknown, and thus will be interesting to explore.

Recent studies implicate GX sPLA2 in myocardial ischemia reperfusion injury [11], in allergen-induced airway inflammation [9], and in lung diseases [8]. A possible role of hGX sPLA2 was also suggested in lung and colon carcinogenesis [12, 13]. In this context, functional genetic mutations leading to an alteration of protein expression and/or enzymatic activity may have a profound impact on the pathophysiological role of the enzyme, in particular, by modulating the concentration of lipid mediators produced locally and thus modifying the inflammatory process in diseases like atherosclerosis and cancer.

Acknowledgements This study was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale and by the fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20080512033) to SAK and (FDT2000910244) to SG. The study was also supported by an ANR program (ANR 2006 Physiopathologie des maladies humaines: sPLA2/ATHEROSCLEROSE) to GL and EN, and in part by the CNRS and the Association pour la Recherche sur le Cancer to GL. EN and GL are directors of research of the Centre National de la Recherche Scientifique. We also thank the “Plate-forme d’Imagerie Cellulaire Pitié Salpêtrière” for confocal imaging, and the “Plate-forme Postgénomique P3S”.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H (1999) Circulating levels of secretory type II phospholipase A (2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100:1280–1284
- Karabina SA, Brocheriou I, Le Naour G, Agrapart M, Durand H, Gelb M, Lambeau G, Ninio E (2006) Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB J* 20:2547–2549
- Rosengren B, Jonsson-Rylander AC, Peilot H, Camejo G, Hurt-Camejo E (2006) Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1761:1301–1308
- Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka GI, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M (2008) Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem* 283:33483–33497
- Wooton-Kee CR, Boyanovsky BB, Nasser MS, de Villiers WJ, Webb NR (2004) Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:762–767
- Lambeau G, Gelb MH (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 77:495–520
- Bostrom MA, Boyanovsky BB, Jordan CT, Wadsworth MP, Taatjes DJ, de Beer FC, Webb NR (2007) Group V secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis: evidence from genetically altered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:600–606
- Curfs DM, Ghesquiere SA, Vergouwe MN, van der Made I, Gijbels MJ, Greaves DR, Verbeek JS, Hofker MH, de Winther MP (2008) Macrophage secretory phospholipase A2 group X enhances anti-inflammatory responses, promotes lipid accumulation, and contributes to aberrant lung pathology. *J Biol Chem* 283:21640–21648
- Henderson WR Jr, Chi EY, Bollinger JG, Tien YT, Ye X, Castelli L, Rubtsov YP, Singer AG, Chiang GK, Nevalainen T, Rudensky AY, Gelb MH (2007) Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med* 204:865–877
- Ohtsuki M, Taketomi Y, Arata S, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Yamamoto K, Kudo I, Murakami M (2006) Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J Biol Chem* 281:36420–36433
- Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Yano T, Tezuka H, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokota Y, Nakamura T, Obata JE, Kanazawa M, Kawabata K, Hanasaki K, Kugiyama K (2008) Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation* 117:2977–2985
- Masuda S, Murakami M, Mitsuishi M, Komiyama K, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I (2005) Expression of secretory phospholipase A2 enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells. *Biochem J* 387:27–38
- Morioka Y, Ikeda M, Saiga A, Fujii N, Ishimoto Y, Arita H, Hanasaki K (2000) Potential role of group X secretory phospholipase A(2) in cyclooxygenase-2-dependent PGE(2) formation during colon tumorigenesis. *FEBS Lett* 487:262–266
- Cupillard L, Koumanov K, Mattei MG, Lazdunski M, Lambeau G (1997) Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* 272:15745–15752
- Bezzine S, Bollinger JG, Singer AG, Veatch SL, Keller SL, Gelb MH (2002) On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids. *J Biol Chem* 277:48523–48534
- Gora S, Lambeau G, Bollinger JG, Gelb M, Ninio E, Karabina SA (2006) The proinflammatory mediator platelet activating factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1761:1093–1099
- Hanasaki K, Yamada K, Yamamoto S, Ishimoto Y, Saiga A, Ono T, Ikeda M, Notoya M, Kamitani S, Arita H (2002) Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* 277:29116–29124
- Pruzanski W, Lambeau L, Lazdunsky M, Cho W, Kopilov J, Kuksis A (2005) Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A(2). *Biochim Biophys Acta* 1736:38–50
- Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G et al (1992) A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM study. *Arterioscler Thromb* 12:701–707
- Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Rippin G, Hafner G, Prellwitz W, Schlumberger W, Meyer J (2001) Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:25–31
- Tiret L, Godefroy T, Lubos E, Nicaud V, Tregouet DA, Barbaux S, Schnabel R, Bickel C, Espinola-Klein C, Poirier O, Perret C, Munzel T, Rupprecht HJ, Lackner K, Cambien F, Blankenberg S (2005) Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease. *Circulation* 112:643–650
- Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Tahri N, Golmard JL, Tiret L, Cambien F (2002) Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 11:2015–2023
- Nevalainen TJ, Eerola LI, Rintala E, Laine VJ, Lambeau G, Gelb MH (2005) Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim Biophys Acta* 1733:210–223
- Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH, Lambeau G (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 46:1647–1662
- Rouault M, Rash LD, Escoubas P, Boilard E, Bollinger J, Lomonte B, Maurin T, Guillaume C, Canaan S, Deregnaucourt C, Schrevel J, Doglio A, Gutierrez JM, Lazdunski M, Gelb MH, Lambeau G (2006) Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry* 45:5800–5816
- Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M (2004) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab* 15:222–228

27. Mounier CM, Wendum D, Greenspan E, Flejou JF, Rosenberg DW, Lambeau G (2008) Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate. *Br J Cancer* 98:587–595
28. Mallat Z, Steg PG, Benessiano J, Tanguy ML, Fox KA, Collet JP, Dabbous OH, Henry P, Carruthers KF, Dauphin A, Arguelles CS, Masliah J, Hugel B, Montalescot G, Freyssinet JM, Asselain B, Tedgui A (2005) Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 46:1249–1257
29. Wootton PT, Arora NL, Drenos F, Thompson SR, Cooper JA, Stephens JW, Hurel SJ, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Humphries SE, Talmud PJ (2007) Tagging SNP haplotype analysis of the secretory PLA2-V gene, PLA2G5, shows strong association with LDL and oxLDL levels, suggesting functional distinction from sPLA2-IIA: results from the UDACS study. *Hum Mol Genet* 16:1437–1444
30. Wootton PT, Drenos F, Cooper JA, Thompson SR, Stephens JW, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Humphries SE, Talmud PJ (2006) Tagging-SNP haplotype analysis of the secretory PLA2IIa gene PLA2G2A shows strong association with serum levels of sPLA2IIa: results from the UDACS study. *Hum Mol Genet* 15:355–361
31. Masuda S, Murakami M, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Ishikawa Y, Ishii T, Arioka M, Kudo I (2005) Neuronal expression and neurotogenic action of group X secreted phospholipase A2. *J Biol Chem* 280:23203–23214

B. ETUDE FONCTIONNELLE DE LA sPLA2-X ET MATURATION

Parallèlement aux travaux sur la maturation de la sPLA2-X, j'ai participé à diverses études concernant son rôle dans la prolifération cellulaire dans un contexte de cancer colorectal, dans la défense innée contre le parasite de la malaria et dans la reproduction, plus particulièrement dans la maturation terminale des spermatozoïdes et la fécondation in vitro.

I. Rôle de la sPLA2-X dans la prolifération des cellules d'adénome colique murin C26 via la production de différents médiateurs lipidiques : Article 3

Le cancer colorectal est un cancer multifactoriel, touchant de nombreuses personnes chaque année (1^{ère} ou 2^{ème} cause de mortalité par cancer en France).

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la sPLA2-X est fortement exprimée dans des biopsies de cancer du côlon humain (196, 199-200) et pourrait participer à la production de médiateurs lipidiques comme le PGE2 qui joue des rôles multiples dans le cancer colorectal (198). Aucune étude n'a cependant montré un rôle direct de cette sPLA2 sur la prolifération cellulaire in vitro et/ou sur son rôle in vivo dans des modèles de cancer du côlon ou chez l'homme. L'équipe s'est donc intéressée, en particulier au cours de la thèse de Fanny Surrel, au rôle de la sPLA2-X dans le cancer colorectal.

L'étude in vitro décrite dans l'article 3 montre que la sPLA2 de groupe X recombinante stimule la prolifération cellulaire faite de la lignée côlon-26 provenant d'un adénocarcinome de cancer du côlon murin. Cet effet prolifératif ne dépend pas de la capacité de liaison de la sPLA2 de groupe X au récepteur de type M mais dépend de son activité enzymatique et de sa capacité à libérer à la fois l'acide arachidonique et des lysophospholipides. De façon inattendue, la PGE2 et les autres icosanoïdes dérivés des voies cyclooxygénases et lipoxygénases ne sont pas impliqués dans la prolifération des cellules induite par la sPLA2-X. L'effet prolifératif de la sPLA2-X semble dû à l'acide arachidonique non métabolisé et à la production de LPC et de LPA qui pourraient agir en synergie.

Sur ces cellules côlon-26, j'ai observé que la forme promGX n'induisait pas d'effet prolifératif. Ceci confirme que cette sPLA2 agit uniquement sous forme active sur la prolifération. Comme indiqué plus haut, nous avons aussi vu que le surnageant de cellules côlon-26 avait une très faible capacité de maturation de la forme promGX.

Ce travail mené in vitro sur ces cellules cancéreuses suggère un rôle de la sPLA2-X dans le cancer colorectal in vivo. L'équipe a tenté de montrer un effet de la sPLA2-X dans deux modèles murins de cancer colorectal (Apc et AOM) en utilisant des souris invalidées pour la sPLA2-X. Au cours de ma thèse, j'ai participé à ces études en injectant de l'azoxyméthane (AOM) aux souris WT et KO et en comptant les tumeurs dans le côlon et l'intestin dans les deux groupes. Les résultats obtenus à ce jour n'ont malheureusement pas encore permis de mettre en évidence de différences entre les animaux sauvages et KO.

Group X Phospholipase A₂ Stimulates the Proliferation of Colon Cancer Cells by Producing Various Lipid Mediators^S

Fanny Surrel, Ikram Jemel, Eric Boilard, James G. Bollinger, Christine Payré, Carine M. Mounier, Kati A. Talvinen, Veli J. O. Laine, Timo J. Nevalainen, Michael H. Gelb, and Gérard Lambeau

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis et Centre National de la Recherche Scientifique, Valbonne, France (F.S., I.J., E.B., C.P., C.M.M., G.L.); Departments of Chemistry and Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington (J.G.B., M.H.G.); and Department of Pathology, University of Turku, Turku, Finland (K.A.T., V.J.O.L., T.J.N.)

Received November 7, 2008; accepted July 14, 2009

ABSTRACT

Among mammalian secreted phospholipases A₂ (sPLA₂s), the group X enzyme has the most potent hydrolyzing capacity toward phosphatidylcholine, the major phospholipid of cell membrane and lipoproteins. This enzyme has recently been implicated in chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis and asthma and may also play a role in colon tumorigenesis. We show here that group X sPLA₂ [mouse (m)GX] is one of the most highly expressed PLA₂ in the mouse colon and that recombinant mouse and human enzymes stimulate proliferation and mitogen-activated protein kinase activation of various colon cell lines, including Colon-26 cancer cells. Among various recombinant sPLA₂s, mGX is the most potent enzyme to stimulate cell proliferation. Based on the use of sPLA₂ inhibitors, catalytic site mutants, and small interfering RNA silencing

of cytosolic PLA₂α and M-type sPLA₂ receptor, we demonstrate that mGX promotes cell proliferation independently of the receptor and via its intrinsic catalytic activity and production of free arachidonic acid and lysophospholipids, which are mitogenic by themselves. mGX can also elicit the production of large amounts of prostaglandin E₂ and other eicosanoids from Colon-26 cells, but these lipid mediators do not play a role in mGX-induced cell proliferation because inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases do not prevent sPLA₂ mitogenic effects. Together, our results indicate that group X sPLA₂ may play an important role in colon tumorigenesis by promoting cancer cell proliferation and releasing various lipid mediators involved in other key events in cancer progression.

Phospholipases A₂ (PLA₂s) catalyze the hydrolysis of the *sn*-2 ester bond of glycerophospholipids to generate free fatty acids and lysophospholipids (Schaloske and Dennis, 2006; Lambeau and Gelb, 2008). Over the past few years, it has

been realized that PLA₂s constitute a superfamily of enzymes comprising several intracellular enzymes and secreted PLA₂s (sPLA₂s).

The group IVA cytosolic PLA₂ (cPLA₂α) is the best known intracellular PLA₂, and it clearly plays an important, yet not exclusive role in the release of arachidonic acid (AA) and subsequent production of eicosanoids in various biological settings (Kita et al., 2006). In contrast, the biological functions of the different sPLA₂s are slowly being unraveled. sPLA₂s have been implicated in lipid digestion and obesity; activation of immune cells; asthma; atherosclerosis; acute respiratory distress syndrome; and host defense against bac-

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Association pour la Recherche sur le Cancer [Grant 3977] (to G.L.) and the National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute [Grants HL36235, HL50040] (to M.H.G.).

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/mol.108.053371.

^S The online version of this article (available at <http://molpharm.aspetjournals.org>) contains supplemental material.

ABBREVIATIONS: PLA₂, phospholipase A₂; sPLA₂, secreted phospholipase A₂; cPLA₂, cytosolic phospholipase A₂; Apc, adenomatous polyposis coli; AA, arachidonic acid; m, mouse; MAP, mitogen-activated protein; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; PGE₂, prostaglandin E₂; FAF BSA, fatty acid-free bovine serum albumin; ITS, insulin, transferrin, selenious acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MK886, 3-[1-(*p*-chlorophenyl)-5-isopropyl-3-tert-butylthio-1*H*-indol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid; ATX, autotaxin; ECF, enhanced chemifluorescence; siRNA, small interfering RNA; h, human; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; DIG, digoxigenin; SSC, standard saline citrate; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, Tris-buffered saline; GFP, green fluorescent protein; OS₁, *Oxyuranus scutellatus scutellatus* sPLA₂-1; OS₂, *Oxyuranus scutellatus scutellatus* sPLA₂-2; LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine; ANOVA, analysis of variance; LPE, lysophosphatidylethanolamine; COX, cyclooxygenase; LOX, lipoxygenase; S32826, [4-(tetradecanoylamino)benzyl]phosphonic acid; PA, phosphatidic acid; LY329722, 3-(3-aminooxalyl-1-benzyl-2-ethyl-6-methyl-1*H*-indol-4-yl)propionic acid.

teria, viruses, and parasites (Touqui and Wu, 2003; Triggiani et al., 2006; Lambeau and Gelb, 2008; Nevalainen et al., 2008). Besides their catalytic activity, sPLA₂s are also able to bind to specific soluble and membrane-binding proteins, including the M-type receptor (Rouault et al., 2007).

Several PLA₂s have also been implicated in various cancers. Disruption of the cPLA₂α gene decreases initiation and growth of intestinal tumors in Apc-mutated mice (Takaku et al., 2000) but increases the number of tumors in the carcinogen azoxymethane-induced mouse model of colon cancer (Ilsley et al., 2005). The gene coding for mouse group IIA (mGIIA)¹ sPLA₂ was identified as a gene modifier that reduces the number of intestinal polyps in Apc(+/-Min) mice, but the mechanism of action is still unclear (Fijneman and Cormier, 2008). Distinct roles have also been proposed for human group IIA sPLA₂ in various cancers (Sved et al., 2004; Cummings, 2007). Recent data have shown differential expression of sPLA₂s IID, III, and V but not X in human colon cancer (Murakami et al., 2005; Mounier et al., 2008). In Apc^{Δ716} and azoxymethane mouse models of colon cancer, the expression of group X sPLA₂ may be increased in small intestinal tumors but not in colon tumors (Takaku et al., 2000; Ilsley et al., 2005). In vitro, group IB, IIA, and III sPLA₂s have been reported to stimulate cell proliferation and activation of MAP kinases in various cancer cells (Kinoshita et al., 1997; Sved et al., 2004; Murakami et al., 2005). Finally, subcutaneous injection into nude mice of colon tumor cells overexpressing mGIIA sPLA₂ resulted in a 2.5-fold increase in tumor size (Belinsky et al., 2007).

Over the past few years, the group X sPLA₂ has emerged as the most potent sPLA₂ capable of hydrolyzing phosphatidylcholine and acting extracellularly on cellular membranes and noncellular phospholipid substrates such as lipoproteins (Lambeau and Gelb, 2008). Consequently, group X sPLA₂ has been proposed to play a role in atherosclerosis (Lambeau and Gelb, 2008), asthma (Henderson et al., 2007), and colon cancer (Morioka et al., 2000).

The above-mentioned findings plus the fact that group X sPLA₂ is expressed at very high levels in human (Cupillard et al., 1997; Morioka et al., 2000; Mounier et al., 2008) and mouse colon (Eerola et al., 2006; this study) prompted us to analyze the proliferative effect of group X sPLA₂ on different colon cancer cells, including the adenocarcinoma-derived mouse Colon-26 cancer cells. Among different mouse sPLA₂s, group X sPLA₂ was the most potent enzyme to stimulate cell proliferation. Using a combination of tools and methods, we found that its proliferative effect does not depend on binding to the M-type receptor or activation of cPLA₂α but rather on its intrinsic catalytic activity and ability to release free fatty acids and lysophospholipids, which most likely act in concert to stimulate cell proliferation.

Materials and Methods

Materials. The mouse adenocarcinoma cell line Colon-26 was obtained from Cell Lines Service (Heidelberg, Germany). AJ02-nm0 cells (Belinsky et al., 2007), YAMC cells (young adult mouse colon) (Whitehead et al., 1993), and Apc(+/-Min) cells (Forest et al., 2003)

¹ A comprehensive abbreviation system for the various mouse and human sPLA₂s is used. Each sPLA₂ is abbreviated with the lowercase letter indicating the sPLA₂ species (m and h for mouse and human, respectively) followed by uppercase letters identifying the sPLA₂ group (GIB, GIIA, GIIC, GIID, GIIE, GIIF, GIII, GV, GX, GXIIA, GXIIB).

were generous gifts from Drs. D. W. Rosenberg (University of Connecticut Health Center, Farmington, CT), R. H. Whitehead (Melbourne, Australia), and F. Pierre (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France) and J. Menanteau (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France), respectively. RPMI 1640 medium and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). Oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, oleoyl-L-α-lysophosphatidic acid sodium salt, 1-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PGE₂, AA, aspirin, ibuprofen, indomethacin, and FAF BSA were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). [*methyl*-³H]Thymidine, [³H]oleic acid, and [³H]AA were from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Courtabouef, France). Recombinant murine interferon-γ was from PeprTech EC (London, UK). Insulin, transferrin, selenious acid (ITS) was from BD Biosciences (Le Pont-De-Claix, France). Phospho-specific p42/p44 MAPK antibodies (clone E-4), p42/p44 antibodies, and cPLA₂α antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Tebu-Bio SA, Le Perray en Yvelines, France). MK886, baicalein, and ATX antibody were from Cayman Chemicals (Interchim, Montluçon, France). Alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Immuntect, Marseille, France), and enhanced chemifluorescence (ECF) substrate was from GE Healthcare (Orsay, France). PGE₂ enzyme-linked immunosorbent assay kit was from Assay Designs (Euromedex, Strasbourg, France). Prevalidated siRNAs were from QIAGEN (Courtabouef, France). Hoechst was from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). LY329722 and Me-indoxam sPLA₂ inhibitors were prepared as described previously (Singer et al., 2002; Smart et al., 2006). Lysing Matrix D beads were from Qbiogene (Illkirch, France). Nucleospin RNA extraction kit was from Macherey Nagel (Hoerd, France). All recombinant mouse and human sPLA₂s used in this study and catalytically inactive hGX and mGX H48Q sPLA₂ mutants were prepared as described previously (Singer et al., 2002; Rouault et al., 2006, 2007).

sPLA₂ Expression in Mouse Intestinal Tract Analyzed by RT-qPCR. Tissue samples from duodenum, jejunum, ileum, and proximal and distal colon from two C57BL/6J female or three BALB/c female mice were snap-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the Nucleospin RNA extraction kit with DNase I treatment and Lysing Matrix D beads to homogenize the samples. Reverse-transcription and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were performed as described previously (Eerola et al., 2006). The abundance of each sPLA₂ mRNA target was calculated relative to the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, which was used as a reference gene. The tissue distribution of sPLA₂s and cPLA₂α was further normalized to the lowest cycle threshold value accurately measured. A relative abundance of 1 (arbitrary unit = 1) was assigned to the expression level of the pancreatic group IB sPLA₂ mRNA in the colon, which was detected with cycle threshold values of 33 or higher. Standard deviation calculation was made according to User Bulletin 2 from Applied Biosystems, Foster City, CA.

Expression of mGX sPLA₂ by in Situ Hybridization. Samples for in situ hybridization were obtained from small and large intestines of C57BL/6J mice, fixed in 4% phosphate-buffered formalin, and embedded in paraffin. A 0.45-kilobase mGX sPLA₂ cDNA insert was cloned into the pRc/CMV vector (Invitrogen) and used as a template to prepare digoxigenin (DIG)-labeled antisense (test) and sense (control) RNA probes by in vitro transcription using a commercial kit (DIG RNA labeling kit; Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Nonradioactive in situ hybridization has been described in detail previously (Haapamäki et al., 1999). In brief, 5-μm-thick paraffin sections were placed on silanated slides, dewaxed in xylene, and rehydrated in a graded alcohol series. Pretreatment was performed sequentially with 200 mM HCl for 20 min, 20 μg/ml proteinase K at 37°C for 15 min, 0.2% glycine in phosphate-buffered saline, pH 7.4, two times for 3 min

each, freshly prepared 0.4% acetic anhydride in 100 mM triethanolamine two times for 5 min each, and finally with ficin (Digest-All kit; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) at 37°C for 20 min. The sections were then blocked in hybridization solution without probe. The solution was replaced with fresh hybridization solution containing the antisense or sense probe at a final concentration of 60 ng/ml. After overnight hybridization, the sections were washed in 2× standard saline citrate (SSC) for 5 min, in 0.2× SSC, 60% formamide at 37°C three times for 5 min each, and 2× SSC two times for 5 min each. The sections were blocked with 3% bovine serum albumin in Tris-buffered saline, and the hybridized probe was detected with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG Fab-fragments (1/2000; Roche Diagnostics) using a substrate solution containing 0.18 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 0.34 mg/ml 4-nitro blue tetrazolium phosphate (Roche Diagnostics), and 0.24 mg/ml levamisole (Vector, San Francisco, CA) in 100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 50 mM MgCl₂. The color reaction was allowed to develop at 4°C overnight and at 25°C for 6 h. The tissue sections were briefly counterstained with hematoxylin, washed with water, and mounted in aqueous mounting medium.

Cell Culture. Colon-26 cells were grown at 37°C in DMEM/10% FCS, antibiotics, and 2 mM glutamine. AJ02-nm0 cells were grown in RPMI 1640 medium/10% FCS with antibiotics, glutamine, and supplementation with insulin (6.25 ng/ml), transferrin (6.25 μg/ml), and selenious acid (6.25 ng/ml; ITS). YAMC and Apc(+/-Min) cells express the temperature-sensitive mutation of the simian virus 40 large tumor antigen gene (tsA58) and grow well at 33°C but become quiescent at 37°C. YAMC cells were grown at 33°C in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS, antibiotics, ITS, and 5 U/ml recombinant interferon-γ. Apc(+/-Min) cells were grown at 33°C in DMEM supplemented with 10% FCS, antibiotics, 10 U/ml recombinant IFN-γ, and 10 ng/ml recombinant epidermal growth factor. We found that these cells do not release sPLA₂ enzymatic activity in cell medium during their normal growth, nor do they express detectable amounts of mGX sPLA₂ protein by time-resolved fluoroimmunoassays (Eerola et al., 2006). To determine whether these cell lines express a functional mGIIA sPLA₂ gene (MacPhee et al., 1995), we set up conditions for the specific detection of wild-type and mutated mGIIA alleles by polymerase chain reaction on genomic DNA (see Supplemental Data). YAMC cells were found to be heterozygous for the *pla2g2a* gene, Colon-26 cells were found to be wild type, and AJ02-nm0 and Apc(+/-Min) cells were found to contain two mutated *pla2g2a* alleles (Supplemental Fig. 1S).

[³H]Thymidine Incorporation and Cell Growth Assays. Colon-26 (5000 cells/well), YAMC (10,000 cells/well), AJ02-nm0 (5000 cells/well), and Apc(+/-Min) (4000 cells/well) cells were plated into 48-well culture plates (Falcon; BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA) that were precoated (Colon-26 and YAMC) or not [AJ02-nm0 and Apc(+/-Min)] with rat tail collagen to ensure tight adhesion of cells. Fifty percent (Colon-26) or 80% [YAMC, AJ02-nm0, and Apc(+/-Min)] confluent cells were made quiescent by incubating them for 24 h in serum-free medium with 0.02% FAF BSA at 37°C. It is important that we observed that the percentage of cell confluence can dramatically affect the ability of the sPLA₂ to trigger cell proliferation. Quiescent cells were treated with medium containing 0.02% FAF BSA and the effectors and were further incubated for 24 h (Colon-26) or 48 h [YAMC, AJ02-nm0, and Apc(+/-Min)] at 37°C (Colon-26 and AJ02-nm0) or 33°C [YAMC and Apc(+/-Min)]. During the last 4 h, [*methyl*-³H]thymidine was added to wells to a final concentration of 1 μCi/ml, 1 μM unlabeled thymidine. In some experiments, cell supernatant of Colon-26 cells was collected for PGE₂ assays. The cells were then washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, incubated for 30 min in 5% ice-cold trichloroacetic acid, solubilized in 0.2 N NaOH, and analyzed for [³H]thymidine incorporation into DNA. For cell growth assays, cells were seeded as described above, starved at low density, and then treated with sPLA₂. Cells were dissociated and counted after trypan blue staining. Assays were done in triplicate.

Immunoblot Analysis. Colon-26 cells grown and made quiescent as described above were treated with effectors for various times, washed with PBS, lysed in hot Laemmli buffer, and boiled for 5 min at 95°C. Sonicated lysates were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Immobilon-FL polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Membranes were blocked for 2 h at room temperature in NETG buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.4, 0.05% Triton X-100, and 0.25% gelatin) and probed for 1 h with phospho-specific p42/44 MAPK antibodies or cPLA₂α antibodies (1/2000). Blots were washed five times with PBS/0.1% Tween 20, incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies diluted in PBS/Tween (1/10,000), visualized by incubation for 5 min with ECF substrate, and scanned with a Pro-Xpress imager (excitation, 480 nm; emission, 590 nm). For Western blot of the mouse M-type receptor, cells were lysed in ice-cold 20 mM Tris, pH 7.4, 2 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and sonicated. Unboiled proteins (60 μg) prepared in nonreducing Laemmli buffer were separated on a 7% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred to an Immobilon-FL membrane. The membrane was blocked with 5% blocking agent (GE Healthcare) dissolved in TBS/Tween (25 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, and 0.15% Tween 20) for 1 h and then incubated with the anti-mouse M-type receptor antibody (1/5000 in TBS/Tween; Rouault et al., 2007) overnight at 4°C. The membrane was washed six times for 5 min each and incubated with secondary alkaline phosphatase goat anti-rabbit antibody (1/10,000 in TBS/Tween). The immunocomplex was visualized with ECF substrate as described above.

siRNA Transfection. siRNAs were designed using the program HP GenomeWide siRNA (HiPerformance Design Algorithm; QIAGEN). Best siRNAs respectively targeting the mouse M-type receptor and mouse cPLA₂α were selected from two QIAGEN-designed siRNAs after validation by binding assays and immunocytochemistry for the M-type receptor and Western blot analysis for cPLA₂α. For siRNA transfection, duplex siRNAs were first heated for 1 min at 90°C and cooled at 37°C for 30 min to allow for annealing. Cells were seeded on day 0 and transfected on day 1. Duplex siRNAs were preincubated with HiPerFect reagent (QIAGEN) and added dropwise to each well to a final concentration of 5 nM. On day 2, cells were made quiescent for 24 h before stimulation with sPLA₂ and subsequent Western blotting, binding assays, proliferation experiments, or immunocytochemistry. Transfection efficiency was evaluated by transfection with an Alexa546-coupled siRNA and fluorescence visualization with a microscope. The effect of the best-selected siRNAs for M-type receptor [forward, r(GGU ACA CUC GAU ACA UUA A)dTdT; reverse, r(UUAAUGUAUCGAGUGUACC)dTdA] and cPLA₂α [forward, r(GGA GAU UAA UGA AGA GCU A)dTdT; reverse, r(UAG CUC UUC AUU AAU CUC C)dTdT] were compared with the effect of the nonrelevant GFP-directed siRNA (forward, GCA AGC UGA CCC UGA AGU UCA U; reverse, GAA CUU CAG GGU CAG CUU GCC G).

Binding Assays and Immunocytochemistry. The expression of the mouse M-type receptor in various cell lines was determined by binding experiments using iodinated OS₁ as described previously (Rouault et al., 2007). Cells were seeded in six-well plates, and 90% confluent cells were incubated for 1 h in binding buffer (140 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 20 mM Tris, pH 7.4, and 0.1% BSA) at room temperature, with 200,000 cpm iodinated OS₁ in the absence (total binding) or presence (nonspecific binding) of 100 nM unlabeled OS₁. Cells were washed, lysed with 0.2 M NaOH, and analyzed for bound iodinated OS₁. The expression of the mouse M-type receptor after siRNA transfection was evaluated by immunocytochemistry as follows. Colon-26 cells were seeded in 24-well culture plates (4000 cells/well) on coverslips coated with rat tail collagen. Twenty-four hours after transfection with siRNA, the medium was changed, and cells were incubated in FCS-free medium for 24 h to mimic conditions of proliferation assays. Cells were then fixed with 3.7% paraformaldehyde for 25 min at room temperature and washed twice

with PBS. Free aldehyde groups were quenched with 50 mM NH₄Cl in PBS, and cells were washed once with PBS and permeabilized with 0.5% saponin (two times for 5 min each). Nonspecific sites were blocked with 10% horse serum/0.05% saponin. Anti-mouse M-type receptor rabbit serum (Rouault et al., 2007) was diluted 1/1000 in 5% horse serum/0.05% saponin and incubated for 30 min at room temperature. After three washes with PBS/0.05% saponin, fluorescein isothiocyanate-linked secondary antibodies were diluted 1/600 in 5% horse serum/0.05% saponin and incubated for 1 h at room temperature under dim light. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 μg/ml). Cells were washed once in PBS/0.05% saponin, twice in PBS, and once in H₂O, and then they were mounted with Dako mounting medium (Dako, Trappes, France) and visualized under a microscope.

AA Release. AA release was performed under the same conditions of culture as those used for proliferation assays. During the starvation time, cells were labeled with [³H]AA (0.2 μCi/well) in FCS-free DMEM/0.02% FAF BSA for 24 h at 37°C. Cells were washed twice with FCS-free medium/0.1% FAF BSA and incubated for the indicated periods in 200 μl of serum-free medium with 200 nM sPLA₂. Cell-free supernatants and cell monolayers lysed in 400 μl of 0.2 N NaOH were submitted to scintillation counting. [³H]AA release is expressed as the percentage of cpm in cell supernatant versus total cpm (supernatant and cell lysate).

Eicosanoid Assays. Colon-26 cells (10⁶ cells) were grown in six-well culture plates for 2 days, starved for 24 h, and stimulated for 24 h with 200 nM mGX sPLA₂ in 1 ml of serum-free medium containing 0.02% FAF BSA. Total eicosanoid production in combined supernatant and cell pellet was assayed by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry according to the procedure described previously (Kita et al., 2005; Henderson et al., 2007). For specific PGE₂ assay, cell supernatants from proliferation assays were centrifuged, appropriately diluted (1/10–1/500), and PGE₂ levels were determined using the PGE₂ enzyme immunoassay kit (Assay Designs) according to the manufacturer's instructions.

Lysophospholipid Analysis. Colon-26 cells (2 × 10⁶ cells) were seeded in 10-cm Petri dishes and grown for 2 days. Then, cells were starved for 24 h in FCS-free medium/0.02% FAF BSA and stimulated with effectors in 4 ml of FCS-free medium/0.02% FAF BSA for 6 and 24 h. After incubation, the cell supernatants were collected and lyophilized. The cell monolayer (approximately 10⁷ cells) was scraped in PBS, centrifuged, and stored as a dried pellet at –70°C. The following procedure was adapted from previously published methods of lysophosphatidic acid (LPA) analysis (Baker et al., 2001). Lyophilized supernatants were resuspended in 0.5 ml of Milli-Q water (Millipore), and cell pellets were thawed on ice in 0.5 ml of Milli-Q water. To each sample, 1.5 ml of 30 mM citric acid and 40 mM Na₂HPO₄, pH ~4.0, was added and vortexed for 30 s. Samples were then spiked with 500 pmol of 17:0 LPA and 1 nmol of d³¹-16:0 LPC and extracted using 4 ml of 1-butanol followed by re-extraction with 2 ml of 1-butanol. Organic phases were dried in vacuo overnight. The resulting residues were reconstituted in 1.5 ml of CHCl₃:MeOH (2:1), dried again, and finally reconstituted in 100 μl of CHCl₃:MeOH (2:1). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis was performed using a Micromass Quattro Micro tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA) coupled with a 2795 Chromatography System (Waters). Twenty microliters of concentrated lipid extract was injected onto a Luna silica column (5-μm particle size, 4.6 × 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA) equilibrated with 65% solvent A (30:40, *n*-hexane/isopropanol) and 35% solvent B (30:60:15, *n*-hexane/isopropanol/H₂O) at 30°C with a flow rate of 1 ml/min. After injection, 35% solvent B was maintained for 6 min. A gradient of 35 to 100% solvent B was run over 24 min. The gradient was held at 100% solvent B for an additional 20 min. Mass transitions, cone voltages, and collision energies are available on request. Transitions were monitored in the negative mode for the first 30 min, with 40-ms dwell times, and in the positive mode for the final 20 min, with 100-ms dwell times. In both modes, 10-ms interchannel and 100-ms interscan delays were used.

Statistics. Data are expressed as mean ± S.D. Statistical analyses were performed with Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) using Student's *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA), with Bonferroni adjustment for multiple comparisons. *P* values <0.05 were considered as statistically significant.

Results

Group X sPLA₂ Is Expressed at High Levels in Mouse Colon. We have recently found that mGX sPLA₂ is expressed at high levels in the small intestine and colon at both mRNA and protein levels (Eerola et al., 2006). To further analyze the expression of mGX sPLA₂ and other PLA₂ genes in the different sections of the intestine of C57BL/6J mice, we have measured by RT-qPCR the relative abundance of mRNAs coding for the full set of mouse sPLA₂s (except IIC), for cPLA₂α (Fig. 1A) and for the M-type receptor (data not shown). Most sPLA₂s were expressed in the different gut sections, but marked differences were found. Among catalytically active sPLA₂s, mGX sPLA₂ is by far the most highly expressed enzyme in the intestine of C57BL/6J mice, with highest expression in the distal colon. For example, its level of expression in the colon is approximately 10-fold higher than that of mGV sPLA₂. It is interesting that mGX sPLA₂ mRNA levels vary along the intestine with up to 120-fold increase in expression from duodenum to distal colon. Second, the levels of mRNA for the catalytically inactive group XIIB sPLA₂-like protein are similar to those of mGX sPLA₂, but the expression pattern is the inverse. Third, group IID, IIF, III, and XIIA sPLA₂s are expressed in the intestine at significant but low levels, and group IB and IIE sPLA₂s are barely detectable. Expression of group XIIA sPLA₂ is rather constitutive all along the intestine. Conversely, that of group IIF, III, and V sPLA₂s increases, whereas that of group IID sPLA₂ decreases when moving from the proximal to the distal part of the gut. Fourth, the expression of cPLA₂α is 5-fold lower than that of mGX sPLA₂ but follows a similar gradient of expression along the intestine. Finally, the expression of the M-type receptor was low along the gut sections (data not shown), but, interestingly, it follows the same gradient of expression of mGX sPLA₂.

It is important that C57BL/6J mice have a disrupted mGIIA sPLA₂ gene (MacPhee et al., 1995), which probably explains the low and aberrant amount of mRNA observed in the small intestine (Fig. 1A). When RT-qPCR assays for the different sPLA₂s were done as described above on intestinal sections from BALB/c mice expressing a functional gene, the expression of mGIIA sPLA₂ in jejunum and ileum was found to be much higher than that of all other sPLA₂s, including mGX sPLA₂ (Fig. 1B). However, the mRNA levels of mGIIA were fairly low in proximal and distal colon, where mGX sPLA₂ remained the most abundantly expressed sPLA₂ (Fig. 1B).

To determine more precisely the cellular site of mGX sPLA₂ expression in small and large intestine, we performed *in situ* hybridization. Figure 1, C and D, shows strong labeling of columnar epithelial cells of mucosal villi, Paneth cells in the crypts of Lieberkühn, and ganglion cells of the myenteric plexus between smooth muscle cell fibers. Figure 1E illustrates the absence of labeling from a section of small intestine hybridized with sense probe. Figure 1F shows labeling of epithelial cells in the mucosal glands of the large intestine adjacent to empty-looking goblet cells.

We also analyzed the expression level of group X sPLA₂ in the ileum and colon of mouse models of colon cancer (Apc^{A14} and azoxymethane) and found no dramatic change in the expression of group X sPLA₂ (Supplemental Fig. 2S).

Group X sPLA₂ Stimulates the Proliferation of Mouse Colon Cells. Because group X sPLA₂ is expressed in both normal colon and colon adenocarcinoma (Cupillard et al., 1997; Morioka et al., 2000; Takaku et al., 2000; Osterström et al., 2002; Ilsley et al., 2005; Mounier et al., 2008), we

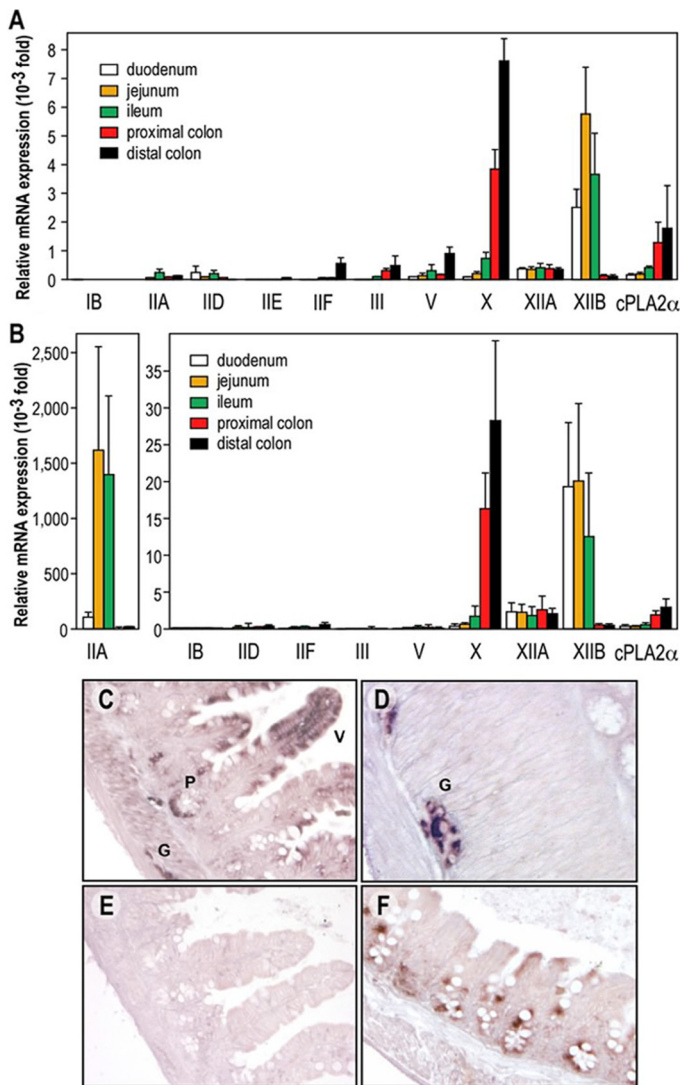


Fig. 1. Expression of the different mouse sPLA₂s in the intestine of C57BL/6J and BALB/c mice by RT-qPCR and in situ hybridization of mGX sPLA₂. A and B, RT-qPCR in C57BL/6J (A) and BALB/c (B) mouse intestine sections using specific sets of PLA₂ primers. To facilitate the comparison of expression between the different sPLA₂s, the data were first normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, which was used as a reference gene, and then expressed relative to the lowest expression level that can be accurately measured in our RT-qPCR assay conditions [i.e., the expression of pancreatic group IB sPLA₂ in the colon (relative abundance of 1 (arbitrary unit = 1))]. Note that two different ordinate axes have been used in B. mGIE sPLA₂ could not be detected in all intestine sections from BALB/c mice (C–F). In situ hybridization of mGX sPLA₂ in small intestine (ileum) showing labeling of columnar epithelial cells in mucosal villi (V), Paneth cells (P), and ganglion cells (G) of the myenteric plexus. Hybridized with antisense probe. D, absence of reaction product from ileal tissue when hybridized with sense probe. E, in situ hybridization of mGX sPLA₂ in large intestine (cecum) showing labeling in epithelial cells. Hybridized with antisense probe.

analyzed the effect of exogenous recombinant group X sPLA₂ on the proliferation of four different mouse colon cell lines [YAMC, Apc(+)/Min, AJ02-nm0, and Colon-26]. Both mGX and hGX sPLA₂s were able to stimulate [³H]thymidine incorporation in the four tested cell lines (Fig. 2). At 200 nM, group X sPLA₂ increased [³H]thymidine incorporation by up to 3-fold, depending on the cell line and conditions of stimulation. This proliferative effect is important because it corresponds to approximately 50% of the maximal effect observed with fetal calf serum. We decided to use the Colon-26 cell line for the experiments described below because these cells are adenocarcinoma-derived and were easier to grow and transfect than the other cell lines. We also found that these cells do not express mGX sPLA₂ at the mRNA level by RT-qPCR analysis and at the protein level by both a highly specific and sensitive time-resolved fluoroimmunoassay (Eerola et al., 2006) and *Escherichia coli* sPLA₂ enzymatic assays (data not shown). Compared with various mouse sPLA₂s, we found that group X sPLA₂ has the strongest mitogenic capacity on Colon-26 cells (Fig. 3A) and dose-dependently induced cell proliferation (Fig. 3B). mGV and mGIIA sPLA₂ also significantly induced cell proliferation, whereas the other sPLA₂s were relatively poor inducers. To further demonstrate that group X sPLA₂ can trigger cell proliferation, we measured the growth of Colon-26 cells treated with mGX and hGX sPLA₂s by direct cell counting. As indicated in Fig. 3C, cells proliferated more rapidly over time in the presence of group X sPLA₂. In accordance with their proliferative effects, both mGX and hGX sPLA₂s were capable of inducing a time-dependent phosphorylation of p42/44 MAPK, with a sustained induction at 4 h (Fig. 3D).

Group X sPLA₂ Stimulates the Proliferation of Colon-26 Cells via Its Catalytic Activity and Independently of Binding to the M-Type Receptor. We next analyzed the molecular mechanisms involved in the proliferative effect of group X sPLA₂. To evaluate the role of sPLA₂ enzymatic activity, we first used the specific sPLA₂ inhibitors Me-indoxam (Singer et al., 2002) and LY329722 (compound B in Smart et al., 2006), which inhibit the catalytic activity of mGX sPLA₂, with IC₅₀ values of 500 and 75 nM, respectively. Both inhibitors clearly suppressed the proliferation and MAP kinase phosphorylation induced by mGX sPLA₂ (Fig. 4, A and B). We then tested the mitogenic activity of catalytically inactive mutants of mGX and hGX sPLA₂s as well as of OS₂, a snake venom sPLA₂ with high catalytic activity on phosphatidylcholine (Rouault et al., 2006). The H48Q mutants of mGX and hGX sPLA₂s have less than 0.1% of wild-type catalytic activity (data not shown), and the D49K mutant of OS₂ is fully inactive (Rouault et al., 2006). Results shown in Fig. 4C further demonstrate that the catalytic activity of group X sPLA₂ is required for its mitogenic effect. Finally, we evaluated the role of cPLA₂α and found that the mitogenic effect of group X sPLA₂ on Colon-26 cells does not depend on cPLA₂α activation because siRNA silencing of cPLA₂α efficiently suppressed protein expression but has little effect on the -fold increase factor of [³H]thymidine incorporation induced by hGX sPLA₂ (Fig. 4D). However, our results also suggest that cPLA₂α is involved in the proliferation of Colon-26 in the absence of exogenously added sPLA₂ because siRNA silencing slightly decreased the basal level of incorporation of [³H]thymidine (Fig. 4D).

Because the M-type sPLA₂ receptor was proposed previ-

ously to play a role in cell proliferation (Kinoshita et al., 1997) and because both mGX and hGX sPLA₂s bind to the mouse M-type receptor (Rouault et al., 2007), we sought to determine whether this receptor is expressed in the above-mentioned different colon cells and plays a role in the proliferative effect of group X sPLA₂. We first screened the four colonic cell lines for the expression of the receptor using iodinated OS₁, the snake venom sPLA₂ that binds to the M-type receptor with very high affinity and specificity (Rouault et al., 2007). Apc(+)/Min cells were found to express high levels of the receptor, whereas Colon-26 and YAMC cells express low but clearly detectable levels (Fig. 5A). Conversely, AJ02-nm0 cells do not express the receptor. Scatchard plot analysis indicated that Colon-26 cells contain a single population of binding sites for iodinated OS₁, with a K_d value of 90 pM and a maximal binding capacity (B_{max}) of 0.016 pmol/mg total protein (data not shown). These binding data were confirmed by Western blot analysis (Fig. 5B) and RT-qPCR analysis (data not shown). The fact that group X sPLA₂ stimulates the proliferation of AJ02-nm0 cells (Fig. 2B), which do not express the M-type receptor (Fig. 5A), represents a first indication that the M-type receptor is not required for the proliferative effect of group X sPLA₂. This view was further supported by siRNA experiments targeting the M-type receptor expressed in Colon-26 cells. As shown in Fig. 5C, we observed by both binding assays and immunocytochemistry that the expression of the M-type receptor was dramatically reduced at 48 and 72 h after siRNA transfection, at the time window where the Colon-26 cells were stim-

ulated with exogenous hGX and mGX sPLA₂s for cell proliferation (Fig. 5D). The specificity of siRNA silencing of the receptor was validated using a nonrelevant GFP-siRNA that did not suppress M-type receptor expression (Fig. 5C). The capacity of group X sPLA₂ to increase Colon-26 proliferation was unaffected by knocking-down the M-type receptor, indicating that receptor binding is not required for the proliferative effect of group X sPLA₂ (Fig. 5D).

Group X sPLA₂ Produces Various Lipid Mediators from Colon-26 Cells. Based on the above-mentioned findings, we sought to determine whether group X sPLA₂ can release various lipid mediators, including free AA, eicosanoids, and lysophospholipids from Colon-26 cells. As found previously in other cells (Singer et al., 2002), exogenously added mGX, but not mGIB, mGIIA, mGV, and mGXIIA sPLA₂s, can release significant amounts of free AA from Colon-26 cells radiolabeled with [³H]AA (Fig. 6A). Similar results were obtained when cells were radiolabeled with [³H]oleate (data not shown). We also monitored the ability of group X sPLA₂ to produce various eicosanoids derived from free AA by combined liquid chromatography/mass spectrometry after stimulation of Colon-26 cells by the sPLA₂ for 6 h (data not shown) and 24 h (Fig. 6B). Group X sPLA₂ increases the production of several eicosanoids, with PGE₂ being by far the most prominent eicosanoid product, with up to 74 ng/10⁶ cells. PGD₂, PGF₂α, and 5-, 12-, and 15-hydroxyeicosatetraenoic acids, and to a lesser extent leukotriene C₄ and leukotriene E₄, are also produced by group X sPLA₂ at 6 h (data not shown) and 24 h.

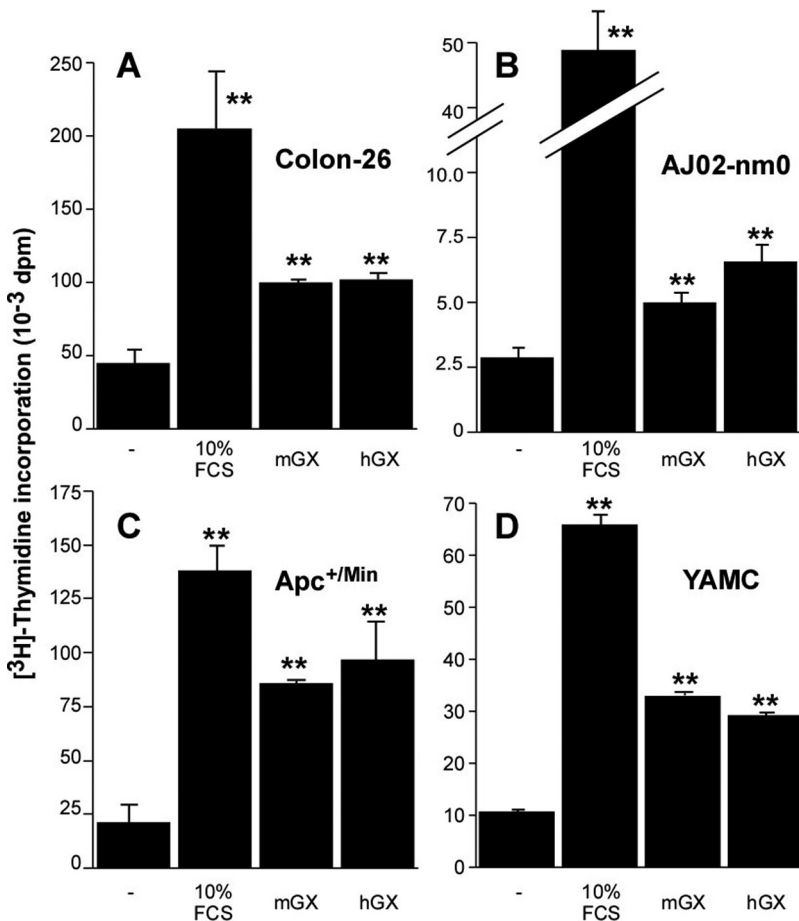


Fig. 2. Effect of group X sPLA₂ on [³H]thymidine incorporation in mouse colon cell lines. After starvation for 24 h at 37°C in serum-free and additive-free medium, all cell lines were incubated in the presence of mGX and hGX sPLA₂s (200 nM) or FCS under the following conditions: Colon-26 were grown at 37°C for 24 h in DMEM and 0.02% FAF BSA (A); AJ02-nm0 cells were grown at 37°C for 48 h in RPMI 1640 medium and 0.02% FAF BSA (B); Apc(+)/Min cells were grown at 33°C in DMEM, 0.02% FAF BSA, and 10 ng/ml recombinant EGF (C); and YAMC cells were incubated at 33°C for 48 h in serum-free RPMI 1640 medium and 0.02% FAF BSA (D). [³H]Thymidine was added during the last 4 h of sPLA₂ stimulation, and cells were processed as described under *Materials and Methods*. The increase in [³H]thymidine incorporation induced by sPLA₂s was compared with untreated cells (-) and FCS-treated cells. In all panels, values are representative of at least two experiments performed in triplicates. Significant differences between untreated and sPLA₂-treated cells were found (**, $P < 0.001$; Student's t test).

In parallel experiments, we monitored the ability of group X sPLA₂ to release various lysophospholipids, namely, LPA, LPC, LPE, lysophosphatidylglycerol, lysophosphatidylinositol, and lysophosphatidylserine. We found that group X sPLA₂ can release a variety of lysophospholipids with different fatty acids at the *sn*-1 position from Colon-26 cells at 6 h (Fig. 7) and 24 h (data not shown). The lysophospholipids produced in highest quantities were LPC and LPE, a result that is in accordance with the relative abundance of these lipids in cell membranes and the ability of group X sPLA₂ to efficiently hydrolyze zwitterionic phospholipids (Singer et al., 2002; Mitsuishi et al., 2007). For example, treatment with group X sPLA₂ for 6 h led to 25- and 36-fold increases in the release of total LPC and LPE compared with untreated cells (Fig. 7A). It is important that we also found that group X sPLA₂ increases by 3.7-fold the overall production of LPA. The detailed data for production of the different acyl chain species for LPC and LPA are shown in Fig. 7B. They indicate, for example, 41- and 26-fold increases for the two main products oleoyl-LPC and palmitoyl-LPC.

Effects of Various Lipid Mediators Released by Group X sPLA₂ on the Proliferation of Colon-26 Cells. The above-mentioned results led us to analyze the prolifera-

tive effect of each type of lipid mediators that are generated by the action of group X sPLA₂. Because LPC can be further converted into LPA by autotaxin (Ferry et al., 2008), we also tested the effect of LPA on cell proliferation. As shown in Fig. 8, free AA, LPC, and LPA can all stimulate the incorporation of [³H]thymidine in Colon-26 in a dose-dependent manner. Various other fatty acids were also able to stimulate cell proliferation, although with a lower efficacy than free AA (data not shown). For example, oleic (50 μM), linoleic (50 μM), and α-linolenic (20 μM) acids could stimulate the incorporation of [³H]thymidine by factors of 1.4, 1.6, and 2.1, respectively. Furthermore, both AA and LPA were able to phosphorylate p42/44 MAPK (Fig. 8). To test the hypothesis that PGE₂ production could explain at least in part the mitogenic effects of group X sPLA₂, we treated Colon-26 cells with four nonselective or COX-2-selective inhibitors (aspirin, indomethacin, ibuprofen, and rofecoxib). We found that all four inhibitors were able to dramatically reduce PGE₂ production (Fig. 9A) but were unable to suppress the cell proliferation induced by mGX sPLA₂ (Fig. 9B). It is interesting that the COX inhibitors were also ineffective at suppressing the proliferative effect of free AA (Fig. 9C). Furthermore, we

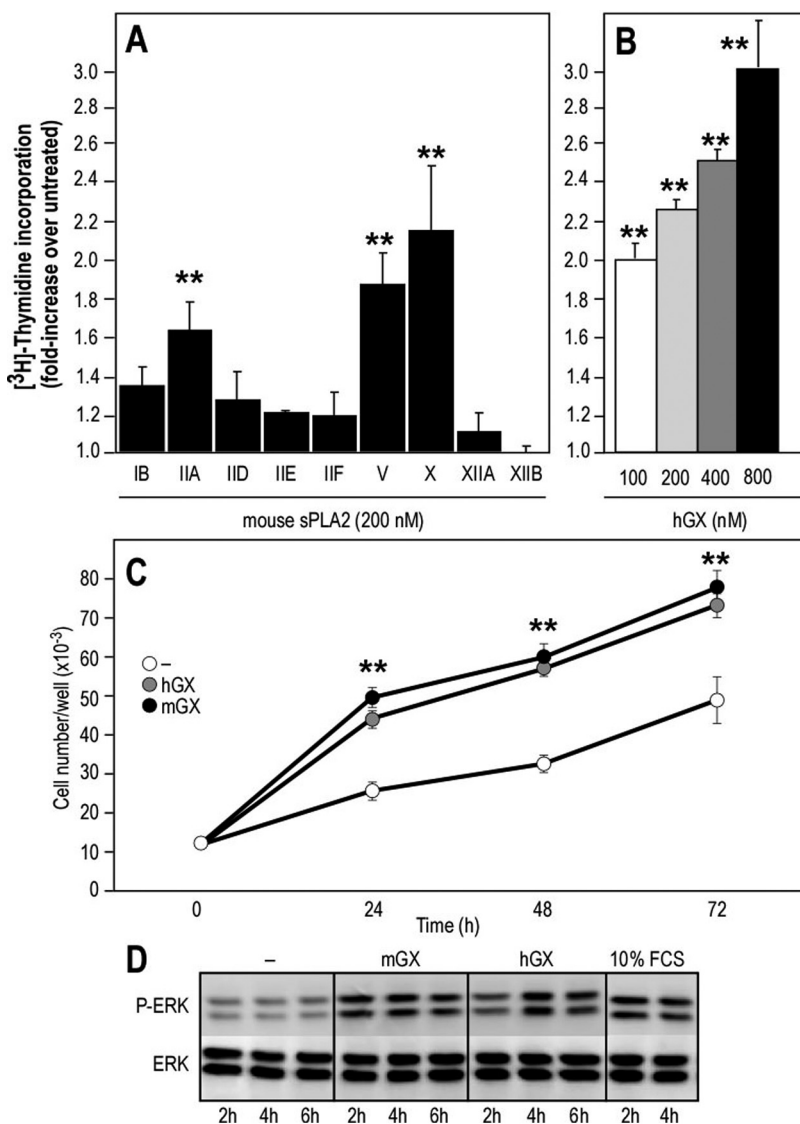


Fig. 3. Effect of various mouse sPLA₂s and hGX sPLA₂ on DNA synthesis, cell growth, and p42/44 MAP kinase phosphorylation in Colon-26 cells. A and B, quiescent cells were incubated for 24 h with the different mouse sPLA₂s (A) or various concentrations of hGX sPLA₂ (B). [³H]Thymidine incorporation is expressed as -fold increase over untreated cells (incorporation of [³H]thymidine under untreated conditions was 44,962 dpm). Values represent average values of at least three experiments performed in triplicate (A) or are representative of at least three experiments (B). Group IIA, V, and X sPLA₂s significantly stimulated [³H]thymidine incorporation compared with untreated cells (**, $P < 0.001$; one-way ANOVA, with Bonferroni adjustment). No significant difference was found between cells treated with group V and X sPLA₂s ($P = 0.2176$; Student's t test). C, quiescent Colon-26 cells were cultured for up to 3 days in the presence or absence of hGX or mGX sPLA₂s (200 nM) and counted every day. The difference in cell number between cells cultured in the absence and presence of sPLA₂ at different time points is statistically significant (**, $P < 0.05$; Student's t test). D, cells were incubated for various times at 37°C with mGX and hGX sPLA₂s (200 nM). The cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-phospho-specific antibodies that specifically recognize tyrosine-phosphorylated p42/44 MAPK. Equal amounts of proteins were loaded, which was verified by immunoblotting of total p42/44 MAPK proteins.

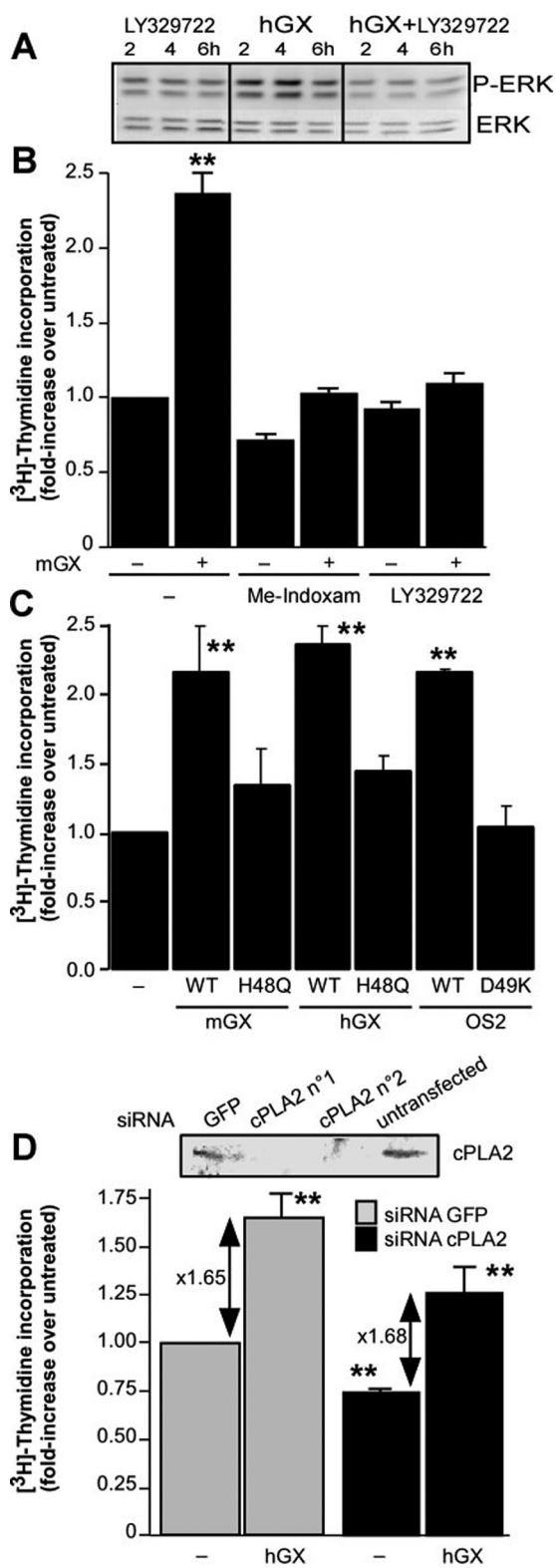


Fig. 4. The proliferative effect of group X sPLA₂ on Colon-26 cells is dependent on sPLA₂ catalytic activity. **A** and **B**, effect of sPLA₂ inhibitors on the proliferative effect of mGX sPLA₂ and MAP kinase activation. Me-indoxam (10 μ M) and LY329722 (5 μ M) were preincubated with mGX sPLA₂ (200 nM) in DMEM and 0.02% FAF BSA for 20 min before incubation with Colon-26 cells. Under untreated conditions, incorporation of [³H]thymidine was 54,669 dpm; mGX sPLA₂ alone but not mGX sPLA₂ preincubated with Me-indoxam or LY329722 significantly stimulated [³H]thymidine incorporation versus untreated cells (**, $P < 0.001$; one-way ANOVA, with Bonferroni adjustment). Although significant ($P < 0.01$), the effect of Me-indoxam

found that exogenously added PGE₂ (1–1000 nM) did not induce cell proliferation (data not shown). Finally, incubation of Colon-26 cells with MK886 or baicalein, that inhibit 5- and 12-LOXs, respectively, did not alter the effect of mGX sPLA₂ on cell proliferation (Fig. 9D). Together, these results indicate that although group X sPLA₂ can release large amounts of PGE₂ (and small amounts of other eicosanoids) from Colon-26 cells (Fig. 6), this PGE₂ is at best a minor effector of the sPLA₂ proliferative effect. Rather, the sPLA₂ proliferative effect seems to be due to the combined production and direct action of free AA and lysophospholipids, including LPC and LPA.

Discussion

This work shows for the first time that group X sPLA₂ can stimulate the proliferation of colon cancer cells and activate the phosphorylation of p42/44 MAPK via its potent catalytic activity and ability to produce various lipid mediators. We found that the proliferative effect of group X sPLA₂ was much higher than that of other mouse sPLA₂s. This effect was as strong as or higher than that of sPLA₂-IB, -IIA, or -III acting on different cell types (Kinoshita et al., 1997; Sved et al., 2004; Murakami et al., 2005; Belinsky et al., 2007). mGV and mGIIA sPLA₂s, but not other enzymes, were also able to promote cell proliferation. Except for mGIIA, the ability of the different sPLA₂s to stimulate proliferation seems to be linked to their direct capacity to hydrolyze phosphatidylcholine and release AA and LPC from cells (Singer et al., 2002; Masuda et al., 2005). As found previously in LNCaP prostatic cancer cells (Sved et al., 2004), it is possible that the proliferative effects mediated by mGIIA sPLA₂ is due to activation of cPLA₂ α , but we did not further investigate this point.

The proliferative effect of various sPLA₂s has been associated with binding to the M-type receptor (Kinoshita et al., 1997) or enzymatic activity of sPLA₂ and subsequent activation of cPLA₂ α (Sved et al., 2004; Murakami et al., 2005). We found here that the proliferative effect of group X sPLA₂ fully depends on its intrinsic catalytic activity and not on binding to the M-type receptor or cPLA₂ α activation. First, two specific sPLA₂ inhibitors suppressed the proliferative effect of group X sPLA₂. Second, the H48Q mutants of mGX and hGX sPLA₂s and the D49K mutant of OS₂ (Rouault et al., 2006), which have less than 0.1% of wild-type enzymatic activity but still bind with high affinity to the M-type receptor (data not shown; Rouault et al., 2006), had no or very modest effects on cell proliferation. Third, mGX and hGX sPLA₂s can trigger

was probably due to a toxic effect that was not observed with LY329722 ($P > 0.05$). **C**, effect of catalytically inactive mGX H48Q, hGX H48Q, and OS₂ D49K sPLA₂s (200 nM) on the proliferation of Colon-26 cells (**, $P < 0.001$; one-way ANOVA, with Bonferroni adjustment). Under untreated conditions, the incorporation of [³H]thymidine was 74,679 dpm. **D**, effect of cPLA₂ α siRNA silencing on the proliferative effect of hGX sPLA₂. Two different commercially available siRNAs (QIAGEN) targeting mouse cPLA₂ α were tested for silencing by Western blotting (inset), and the effect of the best cPLA₂ α siRNA (n°1) versus an irrelevant GFP-directed siRNA was tested for incorporation of [³H]thymidine triggered by hGX sPLA₂. Colon-26 cells were transfected with siRNA on day 1, starved the next day for 24 h, and then assayed for cPLA₂ α expression or incorporation of [³H]thymidine triggered by hGX sPLA₂ (200 nM). Under untreated conditions, the incorporation of [³H]thymidine was 45,825 dpm. The differences in incorporation of [³H]thymidine in the absence and presence of sPLA₂ or between untreated cells transfected with the two siRNA are statistically significant (**, $P < 0.01$; Student's *t* test). In all panels, data are representative of two experiments.

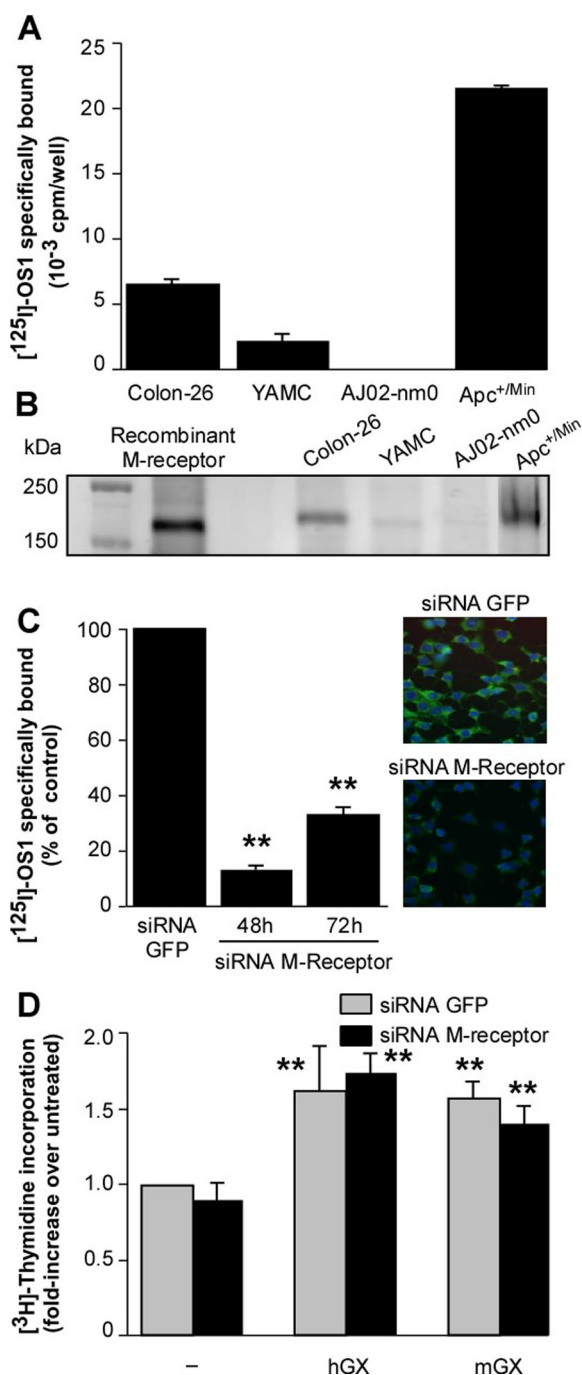


Fig. 5. The proliferative effect of group X sPLA₂ on Colon-26 cells is not dependent on binding to the M-type receptor. A and B, expression of the M-type receptor in Colon-26, YAMC, AJ02-nm0, and Apc(+/-Min) cells. Mouse M-type receptor expression was measured by binding experiments (A) using the specific ligand [¹²⁵I]-OS₁ and by Western blotting (B) of cell lysates as described under *Materials and Methods*. C, validation of M-type receptor silencing by siRNA. Two different commercially available siRNAs (QIAGEN) targeting the mouse M-type receptor were tested for silencing by binding assays and immunocytochemistry to measure the percentage of receptor silencing. The two siRNAs were effective, and representative results of at least two experiments obtained with siRNA1 versus an irrelevant GFP-directed siRNA are shown. Colon-26 cells were transfected with siRNAs on day 1, starved on day 2 for 24 h, and then assayed on day 3 (48 h) and day 4 (72 h) after transfection for M-type receptor expression by binding experiments using [¹²⁵I]-OS₁ ligand. The decrease in binding at 48 and 72 h compared with GFP-siRNA is statistically significant (**, *P* < 0.01; Student's *t* test). Immunocytochemistry using mouse M-type receptor antiserum was performed 48 h after transfection. D, effect of M-type receptor siRNA1 versus GFP-directed siRNA

proliferation on cells expressing or not the M-type receptor. Fourth, siRNA silencing of the M-type receptor in Colon-26 cells did not affect group X sPLA₂-induced cell proliferation. Finally, because of the possible role of cPLA₂α (Sved et al., 2004), we analyzed its role by siRNA silencing and found that group X sPLA₂ stimulates cell proliferation independently of cPLA₂α.

In line with the role of group X sPLA₂ enzymatic activity in proliferation of Colon-26 cells, we found that group X sPLA₂ can release relatively large quantities of free AA, LPC, and LPA, which are all able to stimulate cell proliferation and activation of MAP kinase phosphorylation. AA is the precursor of numerous eicosanoids, including PGE₂ and leukotriene D₄, which contribute to colon cancer cell proliferation (Wang and Dubois, 2006). Group X sPLA₂ increases the production of various prostaglandins, leukotrienes, and hydroxyeicosatetraenoic acids, but these mediators do not explain the sPLA₂ mitogenic effect (Fig. 9). It has been shown that Colon-26 cells express the four PGE₂ receptors (EP1–4) and that PGE₂ is mitogenic on these cells (Pozzi et al., 2004). That exogenous PGE₂ or sPLA₂-produced PGE₂ did not trigger the proliferation of our Colon-26 cells may be linked to the high basal concentrations of PGE₂ (approximately 30 nM) that already saturate EP receptors. Treatment of Colon-26 cells with 5- and 12-LOX inhibitors also does not prevent the mitogenic effect of sPLA₂ or free AA, indicating that the proliferative effect of the sPLA₂ is in part mediated by free AA without conversion into prostaglandins or leukotrienes.

Based on lysophospholipid analyses of cells treated with hGX sPLA₂ (Fig. 7), we could estimate that the sPLA₂ can release LPA and LPC at nanomolar and low micromolar concentrations, respectively. Although these concentrations are lower than those of exogenously added LPA and LPC (Fig. 8), lysophospholipids produced endogenously may be more effective because they are released locally at the cell surface. The proliferative effect of LPA is probably explained by its binding to receptors LPA1, LPA2, and LPA4, which are expressed in Colon-26 cells (Supplemental Fig. 3S). Whether the proliferative effects of exogenous LPC is due to conversion into LPA by ATX and subsequent binding to LPA receptors or to a direct action via other G protein-coupled receptors and/or transactivation of tyrosine kinase receptors (Ikeno et al., 2005; Fujita et al., 2006) remains an open question. We analyzed Colon-26 cells for expression of ATX at the mRNA and protein levels (Supplemental Fig. 3S). Although detectable amounts of ATX mRNA were observed by RT-qPCR analysis, no ATX protein could be detected by Western blot analysis using two distinct antibodies and a radioactive lysophospholipase D enzymatic assay (Ferry et al., 2008). We also analyzed the effect of the recently described ATX inhibitor S32826 (Ferry et al., 2008) on the production of LPA triggered by hGX sPLA₂ in conditions identical to those used

on incorporation of [³H]thymidine triggered by hGX sPLA₂. Colon-26 cells were transfected with siRNAs on day 1, starved on day 2 for 24 h, and then stimulated on day 3 for 24 h in the absence (–) or presence of mGX and hGX sPLA₂s (200 nM). [³H]Thymidine was added during the last 4 h of sPLA₂ stimulation, and cells were processed as described under *Materials and Methods*. Under untreated conditions, the incorporation of [³H]thymidine was 42,395 dpm. Incorporation of [³H]thymidine in sPLA₂-treated cells over untreated is statistically significant (**, *P* < 0.05; Student's *t* test), but no significant difference was found between the two siRNAs. Data are representative of two experiments.

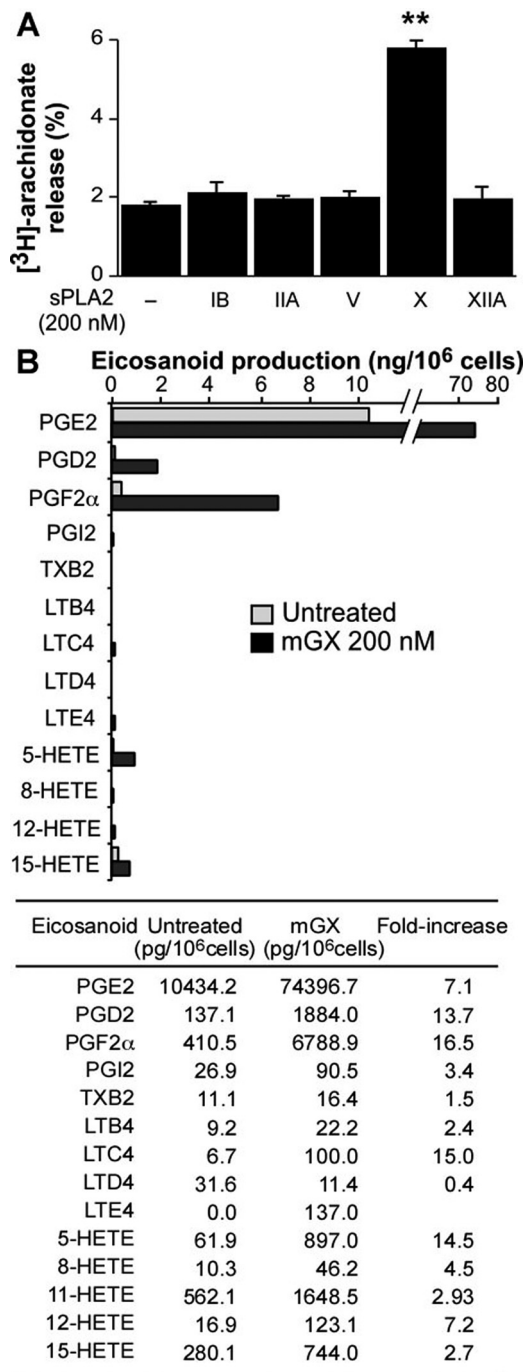


Fig. 6. Release of AA by various mouse sPLA₂s and production of eicosanoids triggered by mGX sPLA₂ from Colon-26 cells. A, release of AA by various mouse sPLA₂s was measured on quiescent Colon-26 cells prelabeled with [³H]AA for 24 h as described under *Materials and Methods*. Mouse recombinant sPLA₂s (200 nM) were incubated with cells for 6 h in DMEM with 0.02% FAF BSA. [³H]AA release is expressed as the percentage of radioactivity present in cell medium relative to the total radioactivity incorporated into cells. sPLA₂-X-treated cells release significantly more [³H]AA (**, $P < 0.001$; one-way ANOVA, with Bonferroni adjustment). A representative experiment of at least two experiments is shown. B, eicosanoid production triggered by mGX sPLA₂. Colon-26 cells (10⁶ cells) were starved for 24 h and treated with mGX sPLA₂ (200 nM) for 24 h in DMEM and 0.02% BSA. The cell medium and the cell monolayer were collected, extracted with organic solvent, combined, and analyzed for eicosanoid production by liquid chromatography/mass spectrometry as described under *Materials and Methods*. A representative experiment of two experiments is shown.

in Fig. 7. The ATX inhibitor S32826 had no effect on LPA production at 1 and 10 μ M (Supplemental Fig. 3S), further indicating that Colon-26 cells do not express ATX. It thus seems unlikely that the LPA produced by group X sPLA₂ comes from released LPC being converted into LPA by ATX. Although we cannot rule out the presence of another lysophospholipase D-like activity in Colon-26 cells, our finding raises the possibility that group X sPLA₂ directly hydrolyzes cellular PA to generate LPA by acting either at the plasma membrane or after shuttling into intracellular compartments enriched in PA. It is noteworthy that the total amount of LPA released by group X sPLA₂ was less than 3% of the LPC produced (Fig. 7A), suggesting that the sPLA₂ may have

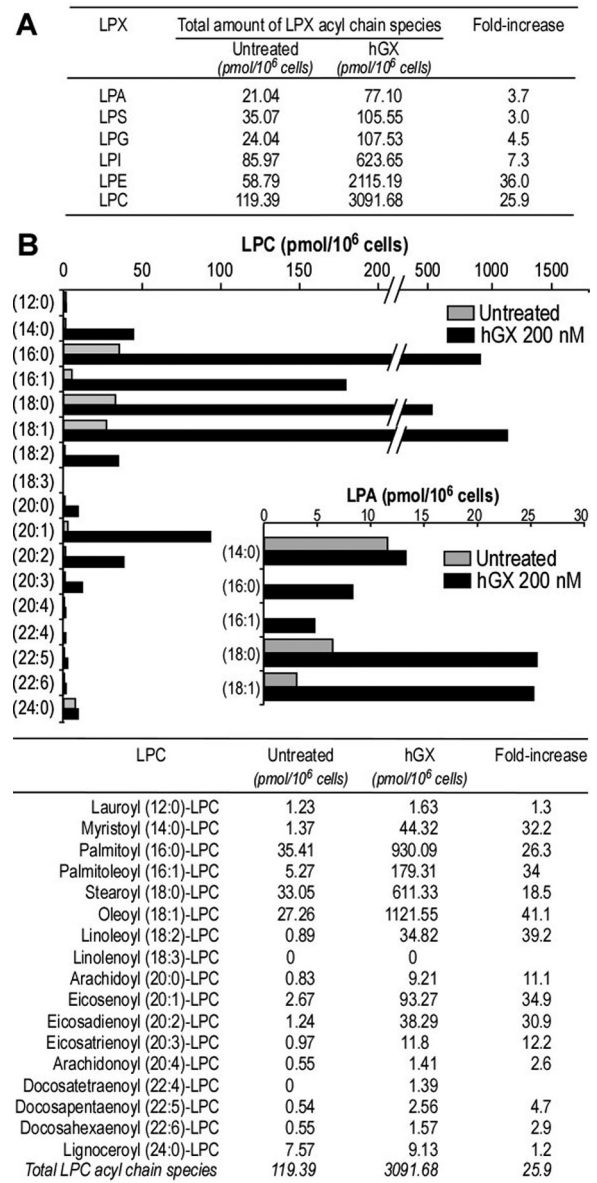


Fig. 7. Release of lysophospholipids by group X sPLA₂ from Colon-26 cells. A, total amount of LPX acyl chain species released by hGX sPLA₂. B, release of the different LPC and LPA acyl chain species by hGX sPLA₂. Colon-26 cells were starved for 24 h and treated with hGX sPLA₂ (200 nM) for 6 h in DMEM and 0.02% BSA. The cell medium and the cell monolayer were collected, extracted with organic solvent, combined, and analyzed for lysophospholipid production by liquid chromatography/mass spectrometry as described under *Materials and Methods*. A representative experiment of two experiments is shown.

access to little amounts of PA substrate. We have shown that group X sPLA₂ can efficiently hydrolyze PA in mixed phospholipid vesicles (Singer et al., 2002), but there has been so far no report on the capacity of this enzyme to release LPA from cells. Only a few studies have suggested that group IIA

sPLA₂ may be involved in LPA release (Fourcade et al., 1995; Smitko et al., 1997). Together, the above-mentioned data indicate that the proliferative effects of group X sPLA₂ are likely to be dependent on the combined production of both free fatty acids, including AA, and lysophospholipids, including LPC and LPA.

We also found by RT-qPCR that group X sPLA₂ is expressed at very high levels in the small intestine and more particularly in the colon of C57BL/6J and BALB/c mice. The cellular sites of mGX sPLA₂ expression include columnar epithelial cells, Paneth cells, and ganglion cells. It should be noted that the very low level of expression measured for mGIIA sPLA₂ mRNA in C57BL/6J mice is due to the natural disruption of the *pla2g2a* gene. In the small intestine of BALB/c mice harboring a functional gene, the expression level of mGIIA was much higher than those of group X sPLA₂ and other sPLA₂s (Fig. 1B). However, the expression of mGIIA dramatically decreased in the colon, whereas that of mGX sPLA₂ increased, making mGX sPLA₂ among the most highly expressed sPLA₂ gene in the proximal and more particularly in the distal colon of both C57BL/6J and BALB/c mice (Fig. 1, A and B). In good accordance, group IIA and X sPLA₂s are also the most highly expressed sPLA₂s in human colon (Mounier et al., 2008). These observations raise the question as to whether the two enzymes play redundant or divergent functions within the small intestine and colon. Based on their unique molecular and functional features, it is likely that the two sPLA₂s have distinct roles. First, group IIA sPLA₂ is a very basic protein, whereas group X is the most acidic sPLA₂ (Lambeau and Gelb, 2008). Second, group IIA sPLA₂ binds tightly to anionic phospholipid interfaces but not zwitterionic interfaces, whereas group X sPLA₂ shows similar binding (Singer et al., 2002). Third, their expression in normal intestine is different in both mouse and human species (see above). Fourth, there is a strong up-regulation of group IIA sPLA₂ at either mRNA or protein levels in inflammatory bowel diseases and probably in mouse and human colon tumors (Ilsley et al., 2005; Cummings, 2007). Alternatively, there is no conclusive evidence for up-regulation of group X sPLA₂ in the small intestine and colon of *Apc*^{Δ716} (Takaku et al., 2000) and *Apc*^{Δ14} mice (Supplemental Fig. 2S), two models of human familial adenomatous polyposis. No up-regulation was observed in the colon tumors of mice treated with the carcinogen azoxymethane (Ilsley et al., 2005) and in human colorectal adenocarcinomas (Osterström et al., 2002; Mounier et al., 2008). This is probably reminiscent of the fact that the catalytic activity of group X sPLA₂, but not group IIA, may be regulated at the post-translational level by maturation of its N-terminal propeptide by a still poorly defined proteolytic mechanism (Cupillard et al., 1997; Masuda et al., 2005). Finally, group IIA sPLA₂ probably plays an important antibacterial role in the intestine and is accordingly highly expressed in Paneth cells of the small intestine and epithelial cells of colonic mucosa (Nevalainen et al., 2008). Its antitumoral role in colon cancer has been proposed to be linked to this antibacterial activity, but the mechanism is still enigmatic (Fijneman and Cormier, 2008). Conversely, group X sPLA₂ has been proposed to play a central role in AA release and PGE₂ production in the colon but not in the small intestine where cPLA₂α would play the major role (Morioka et al., 2000; Takaku et al., 2000). This hypothesis fits well with our RT-qPCR data showing a 5-fold

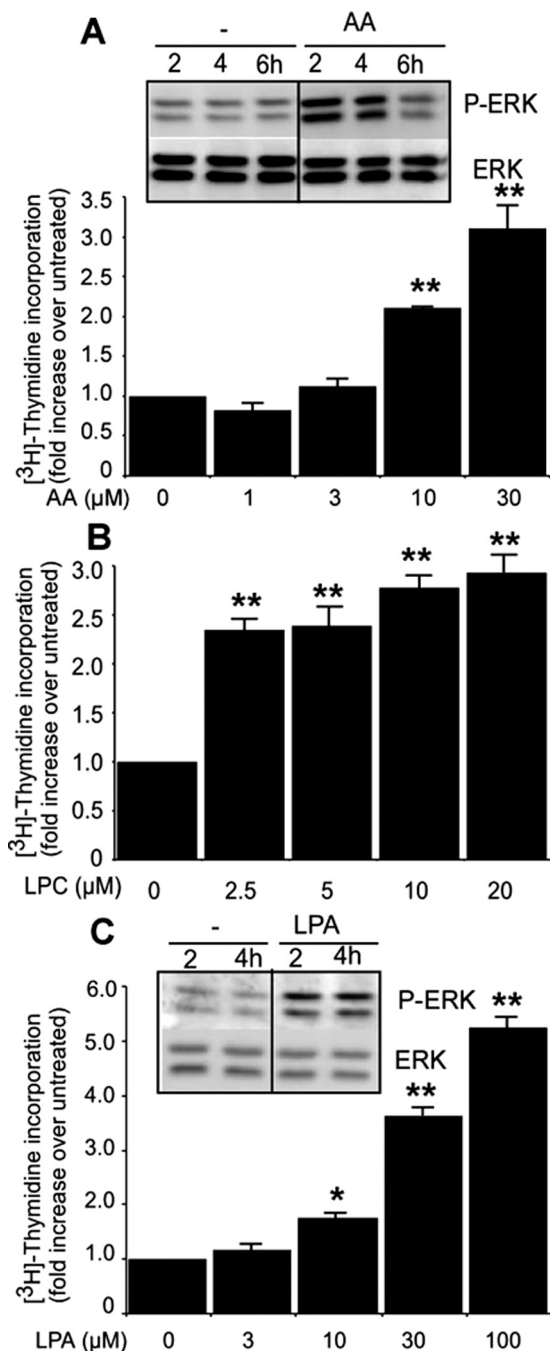


Fig. 8. Effect of AA, LPA, and LPC on Colon-26 proliferation. Effect of free AA (A), LPA (B), and LPC (C) on [³H]thymidine incorporation and p42/44 MAPK phosphorylation. Quiescent Colon-26 cells were stimulated with various concentrations of the different lipid mediators, and [³H]thymidine incorporation was evaluated as described under *Materials and Methods*. Under untreated conditions, the incorporation of [³H]thymidine was 42,493 dpm. The effect of AA and LPA on p42/44 phosphorylation was measured by incubating Colon-26 cells for the indicated periods at 37°C with 20 μM AA and 5 μM LPA as described in Fig. 3 legend. A representative experiment of at least two separate experiments is shown (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ over untreated cells; one-way ANOVA, with Bonferroni adjustment).

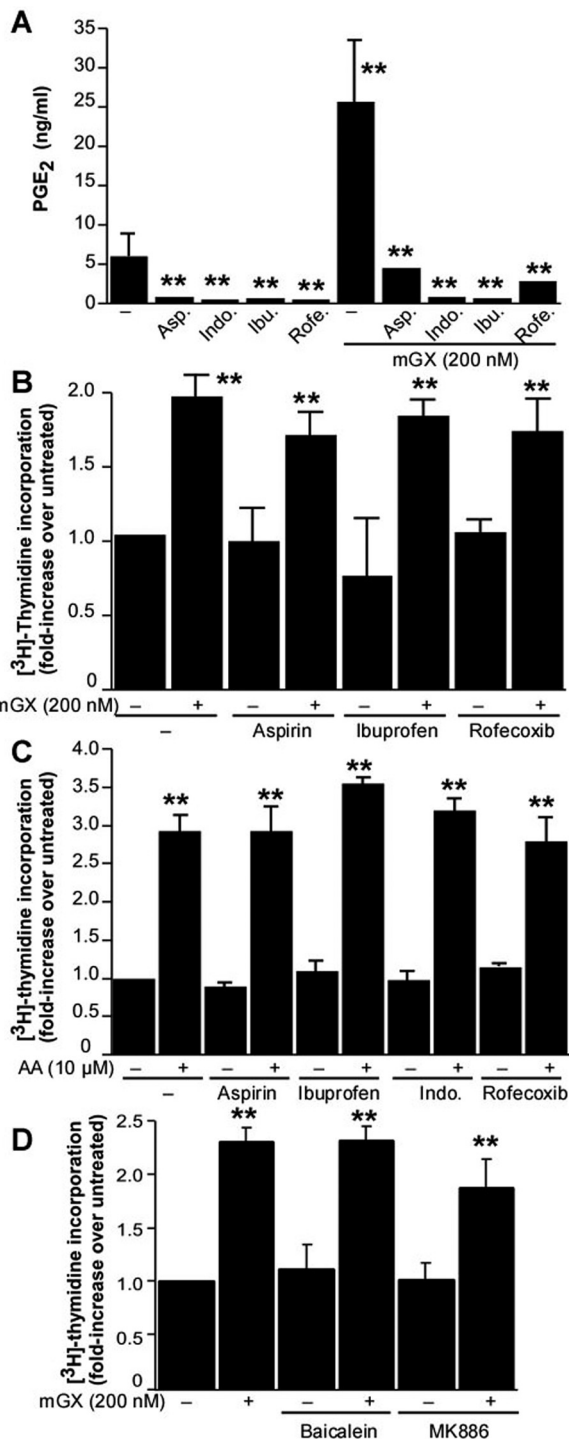


Fig. 9. Effect of COX and LOX inhibitors on PGE₂ release and proliferation in Colon-26. A, effect of COX inhibitors on PGE₂ release. Quiescent Colon-26 cells were preincubated with 20 μM aspirin, ibuprofen, indomethacin, or rofecoxib for 20 min before adding mGX sPLA₂ (200 nM) for 24 h. Supernatants were collected and analyzed for PGE₂ by enzyme-linked immunosorbent assay as described under *Materials and Methods*. B and C, effect of COX inhibitors on mGX- and AA-induced cell proliferation. Quiescent Colon-26 cells were preincubated with COX inhibitors for 20 min before adding mGX sPLA₂ (B) or AA (C). The -fold increase in [³H]thymidine incorporation over untreated cells is shown. Under untreated conditions, the incorporation of [³H]thymidine was 41,719 dpm. D, effects of the 5-LOX inhibitor MK886 (10 μM) and the 12-LOX inhibitor baicalein (10 μM) on Colon-26 cell proliferation. Under untreated conditions, the incorporation of [³H]thymidine was 39,550 dpm. A representative experiment of at least two experiments is shown in the different panels, and results statistically significant over their respective controls are indicated (**, *P* < 0.001; one-way ANOVA, with Bonferroni adjustment).

higher expression of group X sPLA₂ over cPLA₂α in the colon but not in the small intestine (Fig. 1). Whether autotaxin and/or LPA receptors, which are overexpressed in cancer (Parrill and Baker, 2008), contribute to the effects of group X sPLA₂ is unknown. That group X sPLA₂ can produce various lipid mediators suggests that this enzyme may also regulate other key events in tumorigenesis (Wang and Dubois, 2006). Finally, the presence of mGX sPLA₂ mRNA in ganglion cells may suggest additional functions in the enteric nervous system, including neuritogenesis (Masuda et al., 2005), peristaltic reflex, or nociception.

In conclusion, we have shown that group X sPLA₂ can stimulate the in vitro proliferation of colon cancer cells via its enzymatic activity and production of free AA and lysophospholipids. The high expression of group X sPLA₂ in normal colon and tumors in both mouse and human species and its ability to produce various lipid mediators suggests that this enzyme plays a similar role in vivo.

Acknowledgments

We are particularly grateful to Catherine Le Calvez and Dr. Sabine Scarzello for the production and characterization of several recombinant sPLA₂ proteins and to Dr. Morgane Rouault for the OS₂ proteins. We thank Drs. F. Pierre, R. H. Whitehead, D. W. Rosenberg, and C. Perret for providing Apc(+/-Min), YAMC, AJ02-nm0 cells and mouse colon tumor samples, and Apc⁻¹⁴ mice, respectively. We greatly acknowledge Drs. Gilles Ferry and Jean A. Boutin (Institut de Recherches SERVIER, Croissy-sur-Seine, France) for providing recombinant autotaxin, a specific antibody, and its inhibitor S32826. We also thank Nina Niemi for in situ hybridization experiments on mouse colon and Drs. D. W. Rosenberg, J. Pannequin, J. S. Saulnier-Blache, and D. Wendum for helpful discussions.

References

- Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B, and Tigyi GJ (2001) Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* **292**:287–295.
- Belinsky GS, Rajan TV, Saria EA, Giardina C, and Rosenberg DW (2007) Expression of secretory phospholipase A₂ in colon tumor cells potentiates tumor growth. *Mol Carcinog* **46**:106–116.
- Cummings BS (2007) Phospholipase A₂ as targets for anti-cancer drugs. *Biochem Pharmacol* **74**:949–959.
- Cupillard L, Koumanov K, Mattéi MG, Lazdunski M, and Lambeau G (1997) Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A₂. *J Biol Chem* **272**:15745–15752.
- Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, and Laine VJ (2006) Analysis of expression of secreted phospholipases A₂ in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta* **1761**:745–756.
- Ferry G, Moulharat N, Pradère JP, Desos P, Try A, Genton A, Giganti A, Beucher-Gaudin M, Lonchamps M, Bertrand M, et al. (2008) S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J Pharmacol Exp Ther* **327**:809–819.
- Fijneman RJ and Cormier RT (2008) The roles of sPLA₂-IIA (Pla2g2a) in cancer of the small and large intestine. *Front Biosci* **13**:4144–4174.
- Forest V, Pierre F, Bassonga E, Meflah K, Olivier C, and Menanteau J (2003) Apc+/-Min colonic epithelial cells express TNF receptors and ICAM-1 when they are co-cultured with large intestine intra-epithelial lymphocytes. *Cell Immunol* **223**:70–76.
- Fourcade O, Simon MF, Viodé C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournié B, Sarda L, and Chap H (1995) Secretory phospholipase A₂ generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80**:919–927.
- Fujita Y, Yoshizumi M, Izawa Y, Ali N, Ohnishi H, Kanematsu Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, and Tamaki T (2006) Transactivation of fetal liver kinase-1/kinase-insert domain-containing receptor by lysophosphatidylcholine induces vascular endothelial cell proliferation. *Endocrinology* **147**:1377–1385.
- Haapamäki MM, Grönroos JM, Nurmi H, Alanen K, and Nevalainen TJ (1999) Gene expression of group II phospholipase A₂ in intestine in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **94**:713–720.
- Henderson WR Jr, Chi EY, Bollinger JG, Tien YT, Ye X, Castelli L, Rubtsov YP, Singer AG, Chiang GK, Nevalainen T, et al. (2007) Importance of group X-secreted phospholipase A₂ in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med* **204**:865–877.
- Ikeno Y, Konno N, Cheon SH, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K, and Arioka M (2005) Secretory phospholipases A₂ induce neurite outgrowth in PC12 cells

- through lysophosphatidylcholine generation and activation of G2A receptor. *J Biol Chem* **280**:28044–28052.
- Ilsley JN, Nakanishi M, Flynn C, Belinsky GS, De Guise S, Adib JN, Dobrowsky RT, Bonventre JV, and Rosenberg DW (2005) Cytoplasmic phospholipase A₂ deletion enhances colon tumorigenesis. *Cancer Res* **65**:2636–2643.
- Kinoshita E, Handa N, Hanada K, Kajiyama G, and Sugiyama M (1997) Activation of MAP kinase cascade induced by human pancreatic phospholipase A₂ in a human pancreatic cancer cell line. *FEBS Lett* **407**:343–346.
- Kita Y, Ohto T, Uozumi N, and Shimizu T (2006) Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A₂s. *Biochim Biophys Acta* **1761**:1317–1322.
- Kita Y, Takahashi T, Uozumi N, and Shimizu T (2005) A multiplex quantitation method for eicosanoids and platelet-activating factor using column-switching reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **342**:134–143.
- Lambeau G and Gelb MH (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. *Annu Rev Biochem* **77**:495–520.
- MacPhee M, Chepenik KP, Liddell RA, Nelson KK, Siracusa LD, and Buchberg AM (1995) The secretory phospholipase A₂ gene is a candidate for the mom1 locus, a major modifier of Apc^{min}-induced intestinal neoplasia. *Cell* **81**:957–966.
- Masuda S, Murakami M, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Ishikawa Y, Ishii T, Arioka M, and Kudo I (2005) Neuronal expression and neurotogenic action of group X secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem* **280**:23203–23214.
- Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, and Murakami M (2007) Human group III phospholipase A₂ suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A₂s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim Biophys Acta* **1771**:1389–1396.
- Morioka Y, Ikeda M, Saiga A, Fujii N, Ishimoto Y, Arita H, and Hanasaki K (2000) Potential role of group X secretory phospholipase A₂ in cyclooxygenase-2-dependent PGE₂ formation during colon tumorigenesis. *FEBS Lett* **487**:262–266.
- Mounier CM, Wendum D, Greenspan E, Fléjou JF, Rosenberg DW, and Lambeau G (2008) Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A₂ in human colorectal adenocarcinomas: sPLA₂-III as a biomarker candidate. *Br J Cancer* **98**:587–595.
- Murakami M, Masuda S, Shimbara S, Ishikawa Y, Ishii T, and Kudo I (2005) Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem* **280**:24987–24998.
- Nevalainen TJ, Graham GG, and Scott KF (2008) Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. *Biochim Biophys Acta* **1781**:1–9.
- Osterström A, Dimberg J, Fransén K, and Söderkvist P (2002) Expression of cytosolic and group X secretory phospholipase A₂ genes in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Lett* **182**:175–182.
- Parrill AL and Baker DL (2008) Autotaxin inhibition: challenges and progress toward novel anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* **8**:917–923.
- Pozzi A, Yan X, Macias-Perez I, Wei S, Hata AN, Breyer RM, Morrow JD, and Capdevila JH (2004) Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E₂/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* **279**:29797–29804.
- Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH, et al. (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A₂ to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* **46**:1647–1662.
- Rouault M, Rash LD, Escoubas P, Boilard E, Bollinger J, Lomonte B, Maurin T, Guillaume C, Canaan S, Deregnacourt C, et al. (2006) Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A₂ OS₂: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry* **45**:5800–5816.
- Schaloske RH and Dennis EA (2006) The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* **1761**:1246–1259.
- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, et al. (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem* **277**:48535–48549.
- Smart BP, Oslund RC, Walsh LA, and Gelb MH (2006) The first potent inhibitor of Mammalian group X secreted phospholipase A₂: elucidation of sites for enhanced binding. *J Med Chem* **49**:2858–2860.
- Snitko Y, Yoon ET, and Cho W (1997) High specificity of human secretory class II phospholipase A₂ for phosphatidic acid. *Biochem J* **321**:737–741.
- Sved P, Scott KF, McLeod D, King NJ, Singh J, Tsatralis T, Nikolov B, Boulass J, Nallan L, Gelb MH, et al. (2004) Oncogenic action of secreted phospholipase A₂ in prostate cancer. *Cancer Res* **64**:6934–6940.
- Takaku K, Sonoshita M, Sasaki N, Uozumi N, Doi Y, Shimizu T, and Taketo MM (2000). Suppression of intestinal polyposis in Apc Δ 716 knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A₂ gene. *J Biol Chem* **275**:34013–34016.
- Touqui L and Wu YZ (2003) Interaction of secreted phospholipase A₂ and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome. *Acta Pharmacol Sin* **24**:1292–1296.
- Triggiani M, Granata F, Frattini A, and Marone G (2006) Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* **1761**:1289–1300, 2006.
- Wang D and Dubois RN (2006) Prostaglandins and cancer. *Gut* **55**:115–122.
- Whitehead RH, VanEeden PE, Noble MD, Ataliotis P, and Jat PS (1993) Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:587–591.

Address correspondence to: Dr. Gérard Lambeau, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis et Centre National de la Recherche Scientifique, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France. E-mail: lambeau@ipmc.cnrs.fr

II. Les propriétés anti-malariales de la phospholipase A2 de groupe X et IIF

Article 4 : en préparation

La malaria est une maladie due à un parasite appelé *Plasmodium* (surtout *P. falciparum*, *P. vivax*, plus rarement *P. ovale* et *P. malariae*) qui est transmis par la piqure de la femelle d'un moustique appelé anophèle. Avec 300 à 500 millions de malades et 1,5 à 2,7 millions de décès par an, le paludisme demeure la parasitose tropicale la plus importante. 80 % des cas sont enregistrés en Afrique subsaharienne, où ils concernent majoritairement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (OMS, 2005)

Il a été montré que certaines sPLA2 de venins et la sPLA2 pancréatique de porc de groupe IB peuvent bloquer le développement intra-érythrocytaire du parasite de la malaria, *Plasmodium falciparum* (112). D'autres travaux ont suggéré l'importance des médiateurs lipidiques et des sPLA2 dans le développement de cette maladie (223).

Afin de déterminer parmi l'ensemble des sPLA2 humaines celles capables de bloquer l'infection de globules rouges humains par le parasite, nous avons fourni au Dr Deregnacourt (INSERM, Paris) l'ensemble des sPLA2 humaines sous forme recombinante. Les résultats de ces recherches ont montré que seules les sPLA2 humaines des groupes X, IIF et V sont capables d'inhiber le développement du parasite à des concentrations relativement faibles (IC_{50} de 2.9 ± 2.4 nM, 14.3 ± 10.4 nM et 162.5 ± 90.9 nM pour les sPLA2 X, IIF et V). Dans le cadre de ce travail, j'ai produit sous forme recombinante les sPLA2 humaine et de souris de groupe X mutées au site catalytique (mutants H48Q). L'utilisation de ces formes mutées au site actif et d'un inhibiteur sPLA2 spécifique a permis de montrer que les propriétés anti-malariales de la sPLA2-X dépendent de son activité enzymatique. Nous avons aussi observé que la proPLA2 de groupe X n'exerce pas d'action anti-malariale dans les conditions d'infection, indiquant qu'aucune protéase capable d'activer la proenzyme n'est présente dans ces conditions. L'activité anti-malariale de la sPLA2 est due à la fois à l'hydrolyse des lipoprotéines présentes dans le test infectieux, mais aussi à l'hydrolyse des phospholipides des érythrocytes infectés par le parasite. L'activité de la sPLA2 de groupe IIF apparaît seulement liée à l'hydrolyse des lipoprotéines LDL et HDL natives. Ces résultats montrent le rôle potentiel de certaines sPLA2 humaines, notamment la sPLA2 de groupe X sous sa forme active comme molécules anti-malariales naturelles, faisant ainsi partie des mécanismes de défense innée.

Article 4

Anti-malarial properties of the full set of human secreted phospholipases A₂: potent effects of group IIF and X enzymes.Running title: anti-Plasmodium activity of human sPLA₂s

Carole Guillaume¹, Pascale Janvrin¹, Ikram Jemel², Philippe Grellier¹, Joseph Schrével¹, Gérard Lambeau^{2*} and Christiane Deregnaucourt^{1*}

1 : Muséum National d'Histoire Naturelle, FRE 3206 CNRS-MNHN, case postale 52, 61 rue Buffon, 75231 Paris cedex 05, France;

2 : Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR 6097, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France;

* Co-last authors.

ABSTRACT

We have previously shown that secreted phospholipases A₂ (sPLA₂) from snake and bee venom exert potent anti-Plasmodium activity. Here, we have analyzed the activity of the full set of human secreted phospholipases A₂ (PLA₂s) for inhibition of *Plasmodium falciparum* development in human red blood cells. Among the ten human recombinant enzymes analyzed, only group X, IIF and V sPLA₂s were effective, with respective IC₅₀ values of 2.9 ± 2.4 nM, 14.3 ± 10.4 nM and 162.5 ± 90.9 nM. Using LY329722, a specific sPLA₂ competitive inhibitor and a catalytic site mutant, we found that the potent anti-Plasmodium effect of human group X sPLA₂ (hGX) was dependent on its catalytic activity. Furthermore, its anti-Plasmodium effect was reduced by 25-fold upon removal of human serum from the incubation medium, indicating a prominent role of serum lipoproteins. Both hGX and hGIIF sPLA₂s could efficiently hydrolyze crude human plasma and purified lipoproteins. LDL and HDL particles hydrolyzed by sPLA₂s were toxic to *Plasmodium* below their physiological concentrations. By contrast, although both sPLA₂s readily hydrolyze oxidized LDL and HDL, their hydrolysis did not enhance the primary toxicity of the modified particles. In the absence of serum, GX sPLA₂ has lower but significant antimalarial activity via its capacity to hydrolyze the phospholipids from erythrocytes infected by mature parasites, suggesting an additional route for its anti-*Plasmodium* activity. In conclusion, our results provide the first evidence of potential anti-malarial properties of human sPLA₂s. A possible role for GX sPLA₂ in severe malaria is discussed.

III. Implication de la sPLA2-X dans la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris : Article 5

En collaboration avec l'équipe du Dr. Arnoult (INSERM, Grenoble), nous avons mis en évidence un nouveau rôle de la sPLA2-X dans la maturation terminale des spermatozoïdes de souris et dans la fécondation *in vitro*.

Des études d'immuno-localisation des sPLA2 de souris faites en collaboration avec le Dr Murakami avaient montré que les différentes sPLA2 sont présentes à différents endroits dans les organes génitaux mâles (235). Plus particulièrement, la sPLA2-X était fortement exprimée dans les cellules germinales des testicules. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Arnoult et le Dr Murakami, nous avons mis en évidence que la sPLA2-X était exprimée dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris et que celle-ci était libérée lors de l'étape de capacitation au cours de laquelle une forte réaction acrosomique dite « spontanée » se produit. Cette réaction de capacitation est nécessaire pour rendre les spermatozoïdes fonctionnels et capables de féconder l'ovocyte. A l'aide des souris KO pour la sPLA2-X, de sPLA2 recombinantes et d'inhibiteurs, nous avons montré que la sPLA2-X était directement impliquée dans la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris, et que celle-ci modifiait le pourcentage de réaction acrosomique « spontanée ». La sPLA2-X mutée au centre actif et la proenzyme n'ont pas d'effet sur la réaction acrosomique, et l'ajout d'un inhibiteur sPLA2 bloque l'effet de la sPLA2-X mature, indiquant le rôle clé de l'activité enzymatique. L'effet de la sPLA2-X sur la réaction acrosomique n'a pas d'action sur une sous-population de spermatozoïdes d'environ 20-30% et pourrait permettre la sélection de cette sous-population de spermatozoïdes qui seraient plus fertiles. En effet, nous avons observé que le traitement des spermatozoïdes par la sPLA2-X conduisait à une augmentation du taux de fécondation *in vitro*. La sPLA2 maintenue « quiescente » dans l'acrosome des spermatozoïdes n'ayant pas subi de réaction acrosomique pendant la capacitation serait libérée au moment de la liaison du spermatozoïde avec l'ovocyte, permettant probablement de faciliter la pénétration et la fusion membranaire avec l'ovocyte au moment de la fécondation.

Deux questions de fond concernent i) la forme selon laquelle la sPLA2-X est stockée dans l'acrosome et ii) comment se fait son éventuelle activation lors de sa sécrétion. Dans nos conditions de capacitation, nous avons observé que la quantité de sPLA2-X présente dans les spermatozoïdes intacts mesurée par TRFIA était plus importante que celle mesurée par le dosage de l'activité enzymatique. Ceci semble indiquer que la sPLA2-X est stockée sous

forme inactive et pourrait être activée au moment de sa libération dans le surnageant des spermatozoïdes. Nous avons tenté des expériences de capacitation en présence d'inhibiteurs de protéases pour déterminer si la sPLA2-X était libérée de l'acrosome sous forme proenzyme, mais nous nous sommes confronté au problème que les inhibiteurs de protéases perturbent la réaction acrosomique et la capacitation. Nos expériences d'activation indiquées plus haut utilisant la forme proenzyme et le surnageant de spermatozoïdes capacités extraits de souris KO suggèrent la présence d'une protéase de nature inconnue qui pourrait être co-sécrétée avec la sPLA2-X et activer cette dernière. L'acrosine, une protéase de type trypsine, pourrait être une bonne candidate (288-289). Enfin, différents groupes ont montré la présence d'une sPLA2 sous forme proenzyme dans les spermatozoïdes au cours de la réaction acrosomique (290-292).

Group X phospholipase A₂ is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome

Jessica Escoffier^{1,2}, Ikram Jemel^{3,4}, Akemi Tanemoto^{5,6}, Yoshitaka Taketomi^{5,6}, Christine Payre^{3,4}, Christelle Coatrieux^{3,4}, Hiroyasu Sato^{5,6}, Kei Yamamoto⁶, Seiko Masuda^{5,6}, Karin Pernet-Gallay^{1,2}, Virginie Pierre^{1,2}, Shuntaro Hara⁵, Makoto Murakami^{5,6,7}, Michel De Waard^{1,2}, Gérard Lambeau^{3,4†} and Christophe Arnoult^{1,2†}*

¹Grenoble Institute of Neuroscience, INSERM U.836, Grenoble, France

²Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS - UMR 6097, Valbonne, France

⁴Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France

⁵Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Tokyo, Japan

⁶Biomembrane Signaling Project, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

⁷PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

†Shared senior authorship

***Corresponding author**

Grenoble Institute of Neurosciences

Equipe 3 “Calcium channels, functions and pathologies”

Bâtiment Edmond J. Safra, Site Santé à La Tronche

BP 170 38042 Grenoble Cedex 9 - France

Phone 33- 4 56 52 05 64

Fax 33- 4 56 52 05 72

E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

The authors have declared that no conflict of interest exists

Nonstandard abbreviations used:

AR: Acrosome Reaction;

BSA: Bovine Serum Albumin;

LPL: lysophospholipid; LPC: lysophosphocholine;

PFA: Paraformaldehyde;

PAF: Platelet activating factor (ether phospholipid 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine);

sPLA₂: secreted phospholipase A₂; A comprehensive abbreviation system for the various mammalian sPLA₂s is used: each sPLA₂ is abbreviated with a lowercase letter indicating the sPLA₂ species (m for mouse), followed by uppercase letters identifying the sPLA₂ group (GIIA, GIID, GIIE, GIIF, GV, GX, for group IIA, IID, IIE, IIF, V, X, respectively).

Ejaculated mammalian sperm must undergo a maturation process, the capacitation, before fertilizing the egg. Several studies have suggested a role for phospholipases A₂ (sPLA₂) in capacitation, acrosome reaction (AR) and fertilization, but the molecular nature of these enzymes and their specific roles remain elusive. We demonstrate here that mouse group X sPLA₂ (mGX) is the major enzyme present in the acrosome of spermatozoa and that mGX is released in an active form during capacitation via spontaneous AR. mGX-deficient males produced smaller litters than wild-type siblings when crossed with mGX-deficient females. Spermatozoa from mGX-deficient mice exhibited lower spontaneous AR associated to a decreased outcome of in vitro fertilization (IVF), due to a drop of fertilization potential of sperm and an increased rate of aborted embryos. Specific sPLA₂ inhibitors and antibodies to mGX blocked spontaneous AR of wild-type sperm and reduced IVF outcome. These effects were restored by addition of lysophosphatidylcholine, a catalytic product of mGX. Finally, recombinant mGX triggered AR in a dose-dependent manner and improved IVF outcome. All together, our results reveal the presence of group X sPLA₂ in mouse sperm acrosome and highlight a paracrine role of this enzyme during capacitation in which the enzyme primes sperm for efficient fertilization and boosts premature AR of a likely phospholipid-damaged sperm subpopulation to discard them from the fertilization race.

Introduction

Spermatogenesis within the testis leads to the production of morphologically mature sperm which are still functionally immature, immotile and incompetent for fertilization. Before fertilization, these sperm should undergo two major series of important morphological, biochemical and functional modifications, one within the epididymis and the other within the female reproductive tract after ejaculation. During their transit through the epididymis, sperm acquire progressive motility and prime the signaling pathways that will eventually orchestrate capacitation. The full fertilization potential of spermatozoa will be reached in vivo only after capacitation, a final maturation process occurring in the female reproductive tract. Capacitation was discovered by Austin and Chang in the early 1950s and is defined as a complex set of molecular events that allow ejaculated sperm to fertilize an egg (1). Fertilization then starts with sperm binding on zona pellucida and is followed by the physiological acrosome reaction (AR), which is essential for sperm-oocyte fusion. Only fully capacitated spermatozoa can bind to the zona-intact egg and are competent for AR (2). However, during capacitation, a large fraction of sperm (30-40%) undergoes an anticipated AR called spontaneous AR (3). This process is currently interpreted as a sperm malfunction and suggests that a subpopulation of ejaculated sperm does not tolerate the above final maturation process. The endogenous factors responsible for spontaneous AR and the possible physiological reasons for this process have not been identified. Indeed, the molecular mechanisms of sperm capacitation is still poorly understood, even after 50 years of intensive research (4-9). If capacitation clearly depends on cellular redox activity, ion fluxes and protein phosphorylations, this process is also characterized by a strong dependence on the lipid membrane composition and lipid metabolism. Indeed, major lipid remodeling events of sperm including reorganization of the plasma membrane and formation of membrane

subdomains have been observed during capacitation at both chemical and biophysical levels (9,10). During capacitation, the most well-known modification of the plasma membrane is cholesterol efflux which plays a major role in sperm maturation both in vivo and in vitro (4). Other major changes during capacitation include remodeling of lipid rafts, efflux of desmosterol, changes in sterol sulfates, phospholipids, sphingomyelin and ceramides, all of them likely contributing to the increase in membrane fluidity by changing lipid packing and thereby providing heterogeneity of the sperm population (4,11-13). If obviously several families of lipolytic enzymes are involved in these lipid modifications (14), phospholipases A₂ (PLA₂s) are likely to be important, because of their abundant expression in male reproductive organs (15-18) and because of their large diversity of action from phospholipid remodeling and lipid mediator release to inflammation and host defense (19,20).

PLA₂s catalyze the hydrolysis of phospholipids at the *sn*-2 position to generate free fatty acids and lysophospholipids, which are precursors of different lipid mediators such as eicosanoids and platelet-activating factor (PAF) (21,22). PLA₂ metabolites either leave the cellular membrane and are involved in different cellular signaling pathways or accumulate in the leaflet of the membrane and change its biophysical properties. PLA₂s constitute one of the largest families of lipid hydrolyzing enzymes and have been classified into several groups (19). Based on their respective structure and cellular localization, PLA₂s can be divided into two major sets of proteins: a set of 12 distinct Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent intracellular PLA₂s and another set of 10 Ca²⁺-dependent secreted PLA₂s (sPLA₂s). The PLA₂ family also comprises a set of intracellular and secreted forms of PAF-acetyl hydrolase. Deciphering the biological functions of each PLA₂ member is challenging. Studies over the last decade have shown that intracellular PLA₂s and secreted PLA₂s are involved in the production of various lipid mediators in different tissues and cell types, these lipid mediators

being important in numerous and diverse physiological and pathophysiological conditions (20-23).

Several intracellular and secreted PLA₂s have been described in the testis and other male reproductive organs, but their respective functions in reproduction still remain largely obscure. Group VIIIIB PAF-acetyl hydrolase and iPLA₂β have been found in sperm and the corresponding deficient mice present defects in early spermatogenesis and sperm motility, respectively (16,17,24). cPLA₂-ε has recently been cloned and found to be expressed in the testis, but its function is still unknown (25). Previous studies have also shown that several sPLA₂s including group IIA, IIC, IID, IIE, IIF, V and X are present in various genital male organs such as testis, epididymis, vas deferens, seminal vesicles and prostate, but their exact functions are still speculative (15,26). More particularly, mouse group IIE, V and X sPLA₂s (mGIIE, mGV and mGX, respectively) have been localized in late spermatids, but their presence in mature sperm and their specific functions in capacitation and/or fertilization remain to be determined.

Irrespective of the above, different studies have shown that one or several uncharacterized PLA₂s play an important role in capacitation, AR and the early steps of fertilization including sperm binding and sperm-oocyte fusion (18). First, several biochemical studies have demonstrated the presence of one or several low molecular weight Ca²⁺-dependent sPLA₂-like proteins in spermatozoa from different species, yet their molecular nature still remains elusive (27-29). As for capacitation, a spontaneous release of PAF during capacitation has been linked to activation of spontaneous AR, but the enzyme responsible for PAF release has not been identified (30). As for AR, non physiological and physiological stimuli of AR using Ca²⁺ ionophore, progesterone and zona pellucida produce the release of arachidonic acid and/or lysophosphatidylcholine (LPC), and is prevented by PLA₂ inhibitors on sperm from various species (31-34). However, the identity of the PLA₂(s) involved in this exocytotic event has

not yet been revealed and the use of poorly specific PLA₂ inhibitors such as Ro 31-4493, aristolochic acid or ONO RS-82 in these studies cannot provide any clue (31,33,34). PLA₂ activation during AR is also supported by the fact that LPC and fatty acids accelerate or promote exocytosis (35,36). Finally, LPC improves sperm binding on zona pellucida (37) and sperm-oocyte fusion (38), supporting the notion that one or several PLA₂s including an sPLA₂ protein may be important for capacitation and fertilization.

In this paper, we have used mouse group X deficient mice (mGX^{-/-}), sPLA₂ inhibitors and recombinant mGX protein to identify a novel role of this particular sPLA₂. We demonstrated that mGX sPLA₂ is the major enzyme present in the acrosome of mature spermatozoa and is released as an active enzyme during AR. mGX controls sperm physiology at two levels, first during capacitation, by triggering spontaneous AR of a specific subpopulation of sperm, and second during the subsequent fertilization by improving the sperm fertilization potential.

In our companion paper (39), Sato et al have shown that another enzyme, the mouse group III sPLA₂ is highly expressed in the proximal epithelium of epididymis and that mice deficient for this sPLA₂ exhibit male infertility because of profound defects in sperm maturation within the epididymis. Together, our results show that two catalytically active sPLA₂s are expressed in different locations within the reproductive male organs and exert non redundant functions at two major steps of maturation of spermatozoa, one during their transit through the epididymis and the other during capacitation, with important impacts on male fertility in both cases.

Results

mGX sPLA₂ is specifically expressed in late spermatogenic cells and in the acrosome of mature spermatozoa.

Quantitative RT-PCR analysis showed that the mRNA coding for mGX is present at much higher levels in the testis than epididymis (Figure 1A). Furthermore, *in situ* hybridization on tissue sections of the testis from 8-week-old C57BL/6J mice showed that mGX mRNA is present in late spermatogenic cells (spermatocytes and spermatids, but not spermatogonia) in the seminiferous tubules (Figure 1B). In accordance with these results, immunohistochemistry experiments on parallel tissue sections with a specific polyclonal mGX antibody showed the presence of mGX in spermatocytes and spermatids, but not in spermatogonia (Figure 1C). In magnified views (Figure 1C inset), scattered signals with crescent and elongated shapes were evident in spermatocytes and spermatids, suggesting that mGX is localized in the acrosomal area. In human testis, immunohistochemistry experiments showed that group X sPLA₂ is also present in spermatocytes and spermatids (figure S1A), contrary to group IIF and V sPLA₂s which are present at different locations (figure S1B and C). To further support the acrosomal location of mGX sPLA₂, spermatozoa from caudae epididymis were stained with anti-mGX or control antibodies. A strong and specific immunofluorescent signal for mGX was confined to the sperm head, and more particularly in the acrosomal crescent zone (Figure 1D).

mGX sPLA₂ is released during AR.

To further demonstrate that mGX is an acrosomal protein, we monitored the release of the protein from mouse mature sperm undergoing *in vitro* capacitation in conditions known to induce spontaneous AR of 30 to 40% of the sperm population over a 90 min incubation time. The presence of mGX and other sPLA₂s possibly found in the acrosome was first determined

using specific and sensitive (down to 5 pg per assay for mGX) time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) recently developed for the different mouse sPLA₂s (40). Our experiments demonstrated that the amount of mGX protein was increased in the supernatant with a concomitant decrease in the pellet during capacitation (Figure 2A). Moreover, inducing AR by the Ca²⁺ ionophore A23187 resulted in a 2.5-fold increase in the amount of mGX released at 90 min of capacitation. Remarkably, the sum amount of mGX is constant during capacitation, showing the accuracy of our measurements in supernatants and pellets (Figure 2A). The fact that mGX redistributed from the pellet to the supernatant during capacitation or after A23187-induced AR clearly demonstrates that the enzyme is present in the acrosome of mature sperm. When mGX^{-/-} sperm were used in similar capacitation experiments, no mGX TR-FIA signal was measured, validating the specificity of the results (Figure 2B). We also examined the presence of other sPLA₂s including mGIIA, mGIID, mGIIE, mGIIF and mGV in the sperm of various mouse strains (C57BL/6J, BALB/c and OF1), and none of these sPLA₂s were detected (Figure S2). We then monitored the sPLA₂ enzymatic activity in supernatant and pellet during capacitation by a sensitive sPLA₂ enzymatic assay utilizing radiolabeled *E. coli* membranes as a substrate. In accordance with the mGX sPLA₂ TR-FIA data, the sPLA₂ enzymatic activity was increased in the supernatant and decreased in the pellet (Figure 2C). The respective increases and decreases of sPLA₂ activity during capacitation were entirely due to mGX since only barely detectable and constant levels of enzymatic activity were measured with mGX^{-/-} sperm (figure 2D). The fact that the sPLA₂ activity specifically released during capacitation was due to mGX sPLA₂ was further confirmed by inhibition with an antibody raised against mGX, with no effect of antibodies raised against mGIIA or mGIIF (figure 2E). Finally, the enzymatic activity was of an sPLA₂ type but not cPLA₂ or iPLA₂ since these latter enzymes are known to be inactive on *E. coli* membranes (41,42) and since the measured PLA₂ activity was fully blocked by EDTA, DTT,

and LY329722 (figure 2E), which are broad but specific inhibitors of sPLA₂s (43,44). Parallel experiments performed with recombinant mGX protein and the above inhibitors further demonstrate that mGX is responsible for most of the sPLA₂ enzymatic activity in supernatant and pellet (Figure 2E). Altogether, these results demonstrate that mGX is the major sPLA₂ present in the acrosome of mature mouse sperm, that the enzyme is released during AR in an active form, and that it contributes to most if not all of the sPLA₂ enzymatic activity released in the sperm bathing medium during capacitation.

Disruption of the mGX gene results in a lower fertility outcome.

Although no obvious reproductive phenotype has been reported for mGX^{-/-} male mice (45,46), we re-investigated this point by studying the fertility outcome in natural mating and in vitro fertilization experiments (IVF). Both male and female mGX^{-/-} mice were fertile when mated with wild-type littermate (WT) C57BL/6J mice (figure 3A). However, the average litter size of mGX^{-/-} male mice crossed with mGX^{-/-} females (5.70 ± 0.42 pups, n=10, p<0.01) was slightly lower than that of WT littermates (7.75 ± 0.49 pups, n=37) (Figure 3A), suggesting a lower fertility of mGX^{-/-} animals. Because of the large amount of mGX in the sperm acrosome, we re-investigated the role of mGX in sperm by performing IVF with mGX^{-/-} sperm and WT oocytes. We scored the different types of egg/oocytes obtained 24 hours after mixing sperm with oocytes: unfertilized oocytes, 2-cell embryos (normal stage) and aborted embryos; and we used the 2-cell embryo values to measure fertility (47), since 2-cell embryos are appropriate for transfer into the female tract (Figures 3B and C). We controlled that oocytes incubated without sperm in M16 medium for 24 hours did not present any type of cell division (not shown). In IVF experiments, the fertilizing potential of mGX^{-/-} sperm were clearly impaired when compared to WT littermate sperm (Figure 3D). Indeed, the rate of 2-cell embryos was reduced from $67.6 \pm 2.2\%$ (n=13) to $37.6 \pm 3.9\%$ (n=11, p<0.01) for

mGX^{+/+} sperm and mGX^{-/-} sperm, respectively. Furthermore, the rate of aborted embryos increased from $7.7 \pm 1.6\%$ to $11.9 \pm 1.9\%$ ($n=11$, $p<0.05$) for mGX^{+/+} and mGX^{-/-} sperm, respectively. Finally, the percentage of unfertilized oocytes for mGX^{-/-} sperm were more than 2-fold higher than that for mGX^{+/+} sperm. Interestingly, the impaired fertility of mGX^{-/-} sperm were rescued by a short incubation of mGX^{-/-} sperm with recombinant mGX protein at the end of the capacitation period (Figure 3E, see also the detailed protocol of IVF with treated sperm in Figure S3).

Endogenous mGX sPLA₂ regulates spontaneous AR.

The fact that mGX sPLA₂ is released during AR plus the fact that lysophospholipids and fatty acids, two products of sPLA₂ activity can activate AR (35,48) makes possible that the mGX released during the early time points of capacitation boosts spontaneous AR in a paracrine manner. To explore this possibility, we compared the kinetics of spontaneous AR between sperm from mGX^{+/+} and mGX^{-/-} mice. The early onset of spontaneous AR was unchanged between mGX^{+/+} and mGX^{-/-} sperm. However, the level of spontaneous AR of mGX^{-/-} sperm occurring during the late phase of capacitation (55-90 min) was markedly lower than that of mGX^{+/+} sperm (Figure 4A), and reached a plateau during the late phase of capacitation (55-90 min): a statistically significant difference was found between 55 and 90 min of capacitation for WT sperm ($p<5.10^{-3}$) while no significant difference was observed for deficient sperm ($p=0.94$). To confirm the involvement of mGX in spontaneous AR, we evaluated the capacity of exogenous recombinant mGX to trigger AR during capacitation (Figure 4B and 4C). The mGX recombinant enzyme was highly effective on uncapacitated sperm since concentrations as low as 0.2 nM led to a 2-fold increase of spontaneous AR while a maximal increase of AR up to ~65% was observed at 500 nM (Figure 4B). Uncapacitated sperm or sperm capacitated for 90 min were equally sensitive to a 10 min incubation with mGX, indicating that mGX

kept the ability to induce AR throughout capacitation (Figure 4C). Together, our results demonstrate that spontaneous AR occurring during the late phase of capacitation is controlled by the secretion and paracrine activity of mGX. Our results also indicate that mGX modifies the ratio between two sperm subpopulations: the acrosome-reacted and the non-acrosome-reacted sperm. Importantly, we observed that very high concentrations of recombinant mGX sPLA₂ did not induce AR of the entire sperm population, and that about 35% of the sperm population remain fully resistant to mGX in our conditions of capacitation.

mGX sPLA₂ triggers AR via its catalytic activity and independently of cytosolic Ca²⁺ rise.

To determine whether the catalytic activity of mGX is required for the induction of AR, we first tested the catalytically-inactive H48Q mutant of mGX which has less than 0.1% of WT catalytic activity (49). This mutant was unable to trigger AR of uncapacitated sperm (Figure 5A- □). We then tested the effect of recombinant pro-mGX, the zymogen form of mGX, which has very low enzymatic activity (50). Pro-mGX was also unable to trigger AR at 500 nM (Figure 5A - Δ). Finally, we tested LY329722, a specific sPLA₂ inhibitor (compound A in (44)), and found that this inhibitor blocked the sPLA₂-induced AR of capacitated sperm at 1 μM (Figure 5B). Together, these results demonstrate that the catalytic activity of mGX is essential for inducing AR. We also wondered whether Ca²⁺ influx was required for mGX-induced AR. To address this question, sperm were loaded during 30 min in a non capacitating medium with BAPTA-AM, a cell-permeant and fast chelator of Ca²⁺. Sperm were then washed and incubated for another 30 min to allow for a complete de-esterification of BAPTA-AM. At the end of this procedure, sperm were immobile, indicating efficient chelation of cytoplasmic Ca²⁺ by BAPTA. Sperm were then incubated with mGX for 10 min and scored for AR. The effect of mGX was not prevented by BAPTA, indicating that calcium signaling is not involved in sPLA₂-induced AR (Figure 5C).

Acrosome- and non-acrosome-reacted sperm treated with mGX present a normal ultrastructural morphology.

The sub-population of sperm that is resistant to mGX-dependent AR is obviously the one that can fertilize eggs. This is because only non-acrosome reacted sperm can bind to the egg and cross the zona pellucida. It thus appeared important to check the ultrastructural integrity of the acrosome of sperm resistant to mGX treatment by electron microscopy. We found that non-acrosome-reacted sperm treated for 10 min with 200 nM mGX (Figure 6A) presented ultrastructural characteristics which are undistinguishable from that of untreated sperm (Figure 6B), without any apparent defect in the acrosomal area. We next analyzed the morphology of acrosome-reacted sperm. There are 3 morphological criteria by which an AR can be evaluated as normal : i) the outer acrosomal membrane should present vesiculation, ii) the plasma membrane should fuse with the outer acrosomal membrane and iii) the fused membrane should present a characteristic double hairpin shape at the base of the acrosome (51). We compared A23187-induced and mGX-induced AR. All the sperm which were acrosome-reacted by A23187 presented a complete AR exhibiting the 3 above morphological criteria (not shown). The sperm which were acrosome-reacted by mGX were judged as normal on the basis of the same criteria (Figure 6C). We also observed very early stages of AR-like cavitation of the acrosomal matrix (Figure 6D). Together, our analyses indicate that treatment of sperm with mGX produces acrosome-reacted sperm and non-acrosome-reacted sperm with a normal morphology. The fact that the non-acrosome-reacted sperm do not appear to be damaged and has an intact acrosome indicates that it is this subpopulation of sperm that fertilizes eggs.

The fertility outcome is dependent on the rate of spontaneous AR controlled by mGX sPLA₂.

A fraction of the sperm population was found to be fully resistant to recombinant mGX, even at concentrations as high as 500 nM (Figure 4B). This suggests that recombinant mGX specifically targets a subpopulation of sperm and trigger their AR prematurely, ie before fertilization. Since endogenous mGX is released during capacitation (Figure 2), a similar mechanism may be operating physiologically and the role of endogenous mGX would be to target a specific subpopulation of sperm which may have defective sperm function. To address this hypothesis, we performed IVF experiments with WT sperm and oocytes from outbred OF1 animals. Sperm were pretreated with the sPLA₂ inhibitor LY329722 throughout capacitation. Again, we used the 2-cell embryos outcome as an endpoint to measure fertility (47). Treating sperm with LY329722 decreased the rate of 2-cell embryos by 23% (n=8, p<0.023), which was compensated by an increased rate of aborted embryos (Figure 7A). Importantly, the inhibitor did not alter the fertilizing potential of sperm since the rate of unfertilized oocytes remained constant. We also followed spontaneous AR in the presence of LY329722 during capacitation (Figure 7B). In accordance with the results obtained for mGX^{-/-} sperm (Figure 4A), the onset of spontaneous AR was not modified by LY329722. However, the spontaneous AR occurring during the late phase of capacitation (55-90 min) was markedly reduced by the inhibitor. The level of spontaneous AR at 90 min in the presence of LY329722 is not statistically different to the level of AR of mGX^{-/-} sperm at 90 min. Similar results were obtained with indoxam, another sPLA₂ inhibitor (50) (not shown). Interestingly, we found that addition of 1 μM lysophosphocholine (LPC), a major product of mGX sPLA₂ activity (43), to sperm treated with LY329722 partially rescues the level of spontaneous AR, indicating that LY329722 specifically targets mGX sPLA₂. In contrast, LPC alone had no effect on spontaneous AR at this concentration (figure 7B). Since sPLA₂ inhibitors such as LY329722 have a low membrane permeability (52), the inhibition of

spontaneous AR is likely due to the inhibition of mGX present in the cell medium after its release, and not to inhibition of mGX still present in the acrosome. The fact that LY329722 blocks spontaneous AR and reduces fertility suggests that the level of spontaneous AR controlled by mGX is an important factor controlling the fertility outcome. To confirm this view, we performed IVF with OF1 sperm briefly treated with 200 nM recombinant mGX during the last 10 min of capacitation (see Figure S3 for the time course of this experiment). In accordance with the results of Figure 4C, this treatment elicited AR of ~70% of treated sperm, and was blocked by LY329722 (Figure 8A). This treatment led to an increased rate in 2-cell embryos from $38.09 \pm 5.27\%$ to $57.50 \pm 4.69\%$ ($n=13$, $p<0.0002$) for control and treated sperm, respectively (Figure 8B). Similar experiment performed with sperm and oocytes from C57BL/6J inbred mice produced an even larger increase, with a 2-fold higher rate of 2-cell embryos for mGX treated sperm (figure S4). As for LY329722 (Figure 7A), mGX treatment did not change the fertilization potential of sperm since the rate of unfertilized oocytes remained constant: the increased rate of 2-cell embryos was compensated by the decreased rate of aborted embryos (figure 8B), from $32.95 \pm 5.06\%$ to $19.85 \pm 2.96\%$ ($n=13$, $p<0.005$). Furthermore, we found that embryos obtained with mGX-treated sperm developed normally to the blastocyst stage (Figure 8C) and that re-implanted blastocyst embryos gave rise to normal pups (not shown). The effect of exogenous mGX on fertility was dependent on its enzymatic activity since preincubation of mGX with LY329722 for 15 min before the short treatment of sperm prevents the positive effect on IVF (Figure 8D). We then reasoned that mGX may influence fertility by decreasing the number of sperm able to cross the zona pellucida, and thus by decreasing the risk of polyspermy. Indeed, the number of sperm in an IVF droplet profusely exceeded the minimal number necessary to maximize the IVF outcome. To test this hypothesis, we evaluated the IVF outcome (2-cell embryos) with a concentration of non-acrosome-reacted sperm equivalent to that obtained after mGX treatment. At a sperm

concentration of 3×10^5 , treating sperm with 200 nM mGX, led to a drop of the number of non-acrosome-reacted sperm from 2.1×10^5 (70% of 3×10^5 cells) to 0.9×10^5 (30% of 3×10^5 cells), % values being obtained from Figure 8A. This drop was mimicked by performing IVF either at 1.5×10^5 or 3×10^5 sperm and this dilution did not increase the fertility rate (Figure 8E). This result ruled out the hypothesis of a decreased risk of polyspermy due to mGX treatment. Altogether, the results shown in Figures 7 and 8 clearly indicate that the fertility outcome of our IVF experiments is linked to the level of AR controlled by mGX.

LPC, an sPLA₂ metabolite, increases the fertilization potential of sperm.

We have demonstrated above that mGX, which is spontaneously released by sperm during capacitation triggers AR of a subpopulation of sperm via a paracrine amplification loop. Our IVF experiments further support the notion that this subpopulation of sperm is less fertile and poorly promotes normal embryo development. Moreover, mGX^{-/-} sperm also present a deficit of fertilization potential, as indicated by the decrease of fertilization rate (Figure 3D). This observation is suggestive of a second role for mGX or its catalytic products downstream of capacitation, ie during fertilization. To test this hypothesis, we allowed WT sperm to capacitate in the presence of YM26734, another potent sPLA₂ inhibitor (53), then washed the sperm by centrifugation to remove the inhibitor, and finally performed IVF experiments in the absence or presence of LPC, a major catalytic product of mGX (54). Interestingly, treatment with YM26734 alone decreased the rate of fertilization by 40%, from $58.9 \pm 6.8\%$ to $35.6 \pm 5.7\%$ (n=3) while addition of LPC could rescue the fertilization potential of YM26734-pretreated sperm with a fertilization rate of $52.7 \pm 9.7\%$ (n=3) (Figure 9A). To confirm the effect of YM26734, we performed similar experiments in the presence of a mGX rabbit polyclonal antibody and obtained similar results: the 2-cell rate decreased from $51.7 \pm 5.2\%$ to $32.4 \pm 2.1\%$ with control sperm and sperm treated with mGX antibody, respectively.

Addition of LPC, after the capacitation of sperm treated with the antibody, rescued the 2-cell embryo rate up to $57.1 \pm 8.2\%$ (n=3) (Figure 9B). Importantly, we observed that treatment of sperm with LPC alone had not effect on the rate of fertilization at this concentration (not shown). This result demonstrates that LPC, a mGX metabolite, is required for normal fertilization and suggests a second role for mGX, in addition to that on the control of spontaneous AR. The fertilization potential of the non-acrosome-reacted sperm subpopulation is thus dependent on mGX enzymatic activity, and mGX or its downstream metabolic products including LPC are likely involved in one of the different steps of fertilization occurring after capacitation, including sperm binding on ZP, ZP-induced AR and/or sperm-egg fusion.

Discussion

This paper shows for the first time that mGX sPLA₂ is present in large amounts in the sperm acrosome and plays an important paracrine role in the control of spontaneous AR during capacitation, which is associated to a strong impact on fertility outcome. Our results also provide indirect evidence that mGX plays a role during the downstream fertilization step, and thus likely acts at two major stages of reproduction, capacitation and fertilization. Finally, our findings may open new possibilities for the improvement of assisted reproduction techniques (ART).

We first unambiguously identified mGX as the major sPLA₂ enzyme loaded in the mouse sperm acrosome. Although several sPLA₂s are present in mouse male reproductive organs (15), we did not detect mGIIA, mGIID, mGIIE, mGIIF and mGV sPLA₂ proteins in mature mouse sperm while the expression of mGX was very high, with several ng of mGX protein per million of sperm. This value appears very high when compared to the level of mGX protein in various mouse tissues (55) and fits with the very high level of mGX mRNA in testis versus other tissues (56). Our finding is important since there have been numerous

biochemical reports during the past 40 years showing the presence of an sPLA₂ protein in sperm from several mammalian species, of which the molecular identity was never clarified (18,27-29). This enzyme was of low molecular mass, reported as a proenzyme, resistant to heat and acid extraction, Ca²⁺-dependent, could hydrolyze both phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, and was sensitive to non specific sPLA₂ inhibitors such as mepacrine, p-bromophenacyl bromide, aristolochic acid, Ro-4493 and Ro-4639. Many of these features match those of group X sPLA₂ (43,56,57). However, the presence of group X sPLA₂ in the sperm acrosome in other species including humans remains to be determined. Our preliminary data obtained by PCR (58) and by immunohistochemistry (Figure S1) on human testis suggest that group X sPLA₂ is a likely candidate, but a more thorough analysis should be performed at the protein level on purified human sperm. Interestingly, a proenzyme form was detected in human sperm (28), and this would fit with human group X sPLA₂ which has a propeptide sequence (57). More recently, the presence and release of an sPLA₂ from human sperm has been reported (29,38), but the two studies were performed using antibodies with unclear specificity towards the different sPLA₂ isoforms, and were thus inconclusive regarding the identity of the human sperm sPLA₂. Finally, there are evidence suggesting that other PLA₂s including group VIA iPLA₂ and likely a cPLA₂ member are present in sperm (17,18). The locations of these intracellular PLA₂s and their likely distinct roles in sperm function remain to be investigated using inhibitors specifically targeting these enzymes.

We then investigated the role of mGX during in vitro capacitation and found that the sPLA₂ controls to a large extent the percentage of sperm undergoing “spontaneous” or premature AR, thereby inactivating them for the fertility race. Our experiments with WT versus mGX-deficient sperm indicate a delayed paracrine role of endogenous mGX sPLA₂ on the rate of spontaneous AR (Figure 4A). Since different lipid mediators such as PGE₁ and PAF can trigger AR and are produced at the onset of in vitro capacitation (30,59), it is tempting to

speculate that such lipid mediators are produced by an intracellular PLA₂-dependent mechanism in a subpopulation of “excessively primed” or damaged sperm, trigger initial AR and release mGX sPLA₂ which in turn amplifies spontaneous AR in a paracrine loop of activation. Recombinant mGX sPLA₂ can promote AR at low nM concentrations and all over the time course of capacitation (Figure 4B and C), demonstrating its high potency on AR. Interestingly, the effect of mGX reaches a plateau (Figure 4B), and leaves intact a subpopulation of sperm showing a normal morphology (Figure 6) and capable of fertilizing oocytes (Figure 8). Together, our results indicate that mGX contributes an important factor during in vitro capacitation, at least by triggering AR in a subpopulation of likely damaged sperm. This suggests a role of mGX in sperm cell sorting during capacitation as a mechanism to improve fertility outcome. Our current view of the in vivo situation is that the heterogeneous population of ejaculated sperm becomes exposed to mGX sPLA₂ (and possibly other sPLA₂ activities) after their mixing with seminal plasma secretions and/or during their swimming through the female tract. Indirect evidence supporting this view include the fact that i) various populations of sperm with a different lipid composition, a damaged plasma membrane and externalization of phosphatidylserine associated to spontaneous AR have been identified (12,13) ii) seminal plasma and female tract secretions contain endogenous PLA₂ regulators, (26,60-62) iii) a relationship was found between PLA₂ activity in human sperm, semen fluid and male fertility (63).

The mechanism by which mGX promotes AR clearly depends on its enzymatic activity because i) the catalytically-inactive mutant H48Q and the proenzyme form of mGX are inactive and ii) the specific sPLA₂ inhibitor LY329722 prevents mGX-induced AR (Figure 5A and B). The fact that the two major products of mGX sPLA₂, LPC and free fatty acids are able to trigger AR also supports this mechanism (35,36,48). This direct mechanism also fits with our results showing that mGX-induced AR does not require intracellular Ca²⁺ (Figure

5C). Based on the specificity and action of group X sPLA₂ on different cells (43,64), the phospholipid targets of mGX on sperm are likely phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, especially those enriched in polyunsaturated fatty acids at the sn-2 position. Such phospholipids are present in caudae epididymal sperm and reorganized into microdomains in the sperm head plasma membrane during capacitation (9,10,65-68). The fact that about 30% of the sperm population is insensitive to mGX sPLA₂ while the other 70% is gradually sensitive (Figure 4) is likely related to the heterogeneous lipid nature of the sperm plasma membrane producing various subpopulations of sperm with different levels of cholesterol, lipid peroxidation, lipid dynamics, and phospholipid asymmetry (69). Indeed, the enzymatic activity of group X sPLA₂ has been shown to be influenced by the lipid composition of the plasma membrane, notably by the ratio between sphingolipids and PC (70). Furthermore, it has been shown that the enzymatic activity of several sPLA₂s is dependent on lipid packing and phospholipid asymmetry (71). The ratio of phospholipids to sphingomyelin is changed during sperm maturation and this is likely a way to control mGX activity on distinct sperm subpopulations. Interestingly, sphingomyelinase speeds up sperm capacitation and increases spontaneous AR (72). Whether mGX may be acting on a particular population of damaged sperm with altered plasma phospholipid asymmetry including externalized phosphatidylserine or oxidized phospholipids associated with a decreased fertility potential remains to be determined (14,69,73,74).

We have clearly demonstrated that mGX sPLA₂ is a potent regulator of spontaneous AR during capacitation, and a defect in this process or its inhibition reduces fertility outcome, by increasing the rate of aborted embryos and decreasing the rate of 2-cell embryos. We have indeed demonstrated that i) decreasing AR by inhibition of mGX decreases fertility outcome while increasing AR by addition of recombinant mGX increases fertility outcome, and ii)

mGX^{-/-} sperm shows simultaneously a lower rate of spontaneous AR and a higher rate of aborted embryos. In sperm from CD46-deficient mice, a positive link between the rate of spontaneous AR and fertility has also been mentioned but not demonstrated (3). It is important to note that the effectors used to modify the rate of spontaneous AR have been applied only during capacitation and then washed out, and thus these effectors or mGX catalytic products are unlikely to affect the downstream fertilization events. Our experiments thus support a model where mGX sPLA₂ targets a subpopulation of sperm, triggers their premature AR during capacitation, and thereby discards them from the competition race for fertilization, since only non-acrosome-reacted sperm can cross zona pellucida (ZP). Therefore, the so-called “spontaneous AR” would correspond in part to the premature AR triggered by mGX, and this latter would represent a physiological mechanism of sperm cell sorting, that compensates for the unreliability in sperm production and quality (74,75).

Our experiments also provide evidence for a second role of mGX during fertilization, after ZP-induced AR and the release of mGX in the sperm-egg environment. Indeed, we have shown that mGX^{-/-} sperm presented fertilization rates much lower than those of mGX^{+/+} sperm with mean decreases of 44% to 68% (Figure 3D and 3E). In comparison, blocking mGX activity during capacitation of mGX^{+/+} sperm also produced a decrease of the fertilization rate, but lower than that with mGX^{-/-} sperm, with mean decreases of only 24% (with LY329722, Figure 7A), 39% (with YM26734, Figure 9A) and 37% (with mGX antibody, Figure 9B). These results clearly support a second role of mGX downstream of capacitation. Assuming that mGX has two different mechanisms of action, one during capacitation and another during fertilization, one should expect to see a more robust effect on fertility when using mGX^{-/-} sperm than when using an sPLA₂ inhibitor or an antibody which were only added during capacitation and would block only released mGX sPLA₂. Indeed, it is important to note that in the experiments using LY329722 or mGX antibody, the acrosomal

mGX of non-acrosome reacted sperm should remain fully active since LY329722 analogs have low permeability (52), antibodies are impermeant, and these compounds were washed out before gamete mixing. The fact that addition of LPC during the fertilization step was able to restore the fertilizing potential of sperm capacitated in conditions where mGX was inhibited, also supports a role of mGX when secreted during ZP-induced AR. Besides, LPC increases both sperm binding to ZP and sperm-oocyte fusion (37,38). The targets of the mGX metabolites allowing sperm to efficiently fertilize egg remain however to be determined. In conclusion, we have demonstrated that the in vitro fertility outcome is controlled by mGX, acting at two different stages, and any defects in mGX activity at these stages produces a drop in fertility.

We have however observed no defect in fertility when crossing mGX-deficient male mice with WT females. This would argue for a non critical role of mGX in sperm function, but given the essential role of sperm in the propagation of life, a redundancy of systems would not be unexpected. Indeed, there are many examples of knockout mice lacking important genes in sperm physiology and AR which are apparently fertile because of redundant or compensatory mechanisms. A non-exhaustive list of such genes include Ca^{2+} channels (76,77), acrosin (78), caveolin-1 (79) or a sperm specific aminophospholipid transporter (14). The lack of obvious reproductive defect in mGX^{-/-} mice may be linked to the presence and role of multiple extra or intracellular PLA₂ activities in sperm physiology which may act in concert or may be partially redundant (16-18). However, we observed a lower fertility when crossing male and female mGX-deficient mice (Figure 3). This result suggests that mGX is also present in the female tract and may compensate for the deficit of mGX in sperm. This view is supported by our preliminary data showing the presence of mGX sPLA₂ in the female reproductive tract, notably in the uterine and endometrial epithelium (unpublished data). Similar observations have been made for group VIA phospholipase A₂ knockout mice, where

crossings between group VIA-deficient males and females produced almost no offspring while crossings between group VIA-deficient males and WT females did (17). More generally, this mGX^{-/-} sperm phenotype illustrates a well-known human infertility situation where the infertility of a couple is due to the combination of male and female deficits. Such a cause is involved in 20% of infertile couples (78).

Finally, we have demonstrated that recombinant mGX boosts the endogenous effect of mGX on spontaneous AR and significantly improves the rate of success of IVF, improvement being higher in inbred mice known to present a sub-fertile phenotype. Moreover, non-acrosome-reacted sperm which are resistant to mGX treatment showed a normal ultrastructural morphology and the oocytes fertilized with this sperm developed normally up to the blastocyst stage in vitro and gave rise to normal pups when re-implanted. Thus, mGX is a peculiar sPLA₂ that represents a hope for new therapeutic strategies to fight against human male infertility: mGX could be used as a potent therapeutic agent in assisted reproduction techniques, either to improve IVF outcome or to select sperm for intra-cytoplasmic sperm injection based on its acrosomal status.

Methods

Animals. All animal procedures were run according to the French and Japanese guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the respective local Ethical Review Committee. *mGX*-deficient mice on a C57BL/6J background were obtained from Lexicon Inc. as described (45). All other animals were from Charles River laboratories. All animals used were 2- to 6-months old.

In situ hybridization. Paraffin-embedded sections of mouse testis (8-wk-old) were de-waxed, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS, treated with 8 µg/ml proteinase K in PBS, re-fixed with 4% PFA in PBS, and placed in 0.2 N HCl. The sections were then acetylated by incubation in 0.1 M tri-ethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.25% acetic anhydride for 10 min and were dehydrated through a series of ethanol. Sense and antisense cRNA probes for *mGX* (residues 221-576; GenBank Accession # NM_011987) were prepared by random priming with a digoxigenin (DIG) RNA Labeling kit (Roche). Hybridization was performed with the probes (300 ng/ml) in the Probe Diluent-1 (Genostaff) at 60°C for 16 h. Then, the sections were treated with HybriWash buffer, 0.5% blocking reagent (Roche), and then anti-DIG alkaline phosphatase conjugate (Roche), according to the manufacture's instruction (Genostaff). Coloring reactions were performed with NBT/BCIP solution (Sigma) overnight and then washed with PBS. The sections were counterstained with Kernechtrot stain solution (Mutoh), and mounted with Crystal/Mount (Biomedica).

Quantitative RT-PCR. Total RNAs were isolated from testis and epididymis of 8-week old male C57BL/6J mice with TRIzol reagent (Invitrogen) and purified using an RNeasy Purification Kit (Qiagen). First-strand cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR analysis was carried out on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the Taqman probe for *mGX*

(Mm00449530_m1). The thermal cycling conditions comprised initial steps at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 20 s, 55°C for 20 s, and 72°C for 30 s. The expression of 18S mouse ribosomal RNA (Accession # X00686) was used for normalization.

Immunohistochemistry. Mouse testis samples were fixed in 4% PFA and embedded in paraffin. The tissue sections (4 µm thick) were incubated with Target Retrieval Solution (Dako Cytomation) as required, and then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-mGX antibody (from Pr. M. H. Gelb, University of Washington, Seattle) or normal rabbit IgG at 1:100 dilution in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.15 M NaCl (TBS). The sections were then treated with a catalyzed signal-amplified System Staining Kit (Dako Cytomation) with diaminobenzidine substrate, followed by counterstaining with hematoxylin and eosin. Human testis sections (from 16-yr-old male) were obtained by surgery at Toho University Ohmori Hospital (Tokyo, Japan) following approval from the ethical committee of the Faculty and informed consent from the patients.

Immunofluorescent microscopy. Epididymal spermatozoa from C57BL/6J mice were washed with PBS and fixed on glass slides with 3% (v/v) PFA in TBS for 1 h. After 3 washes with PBS, fixed cells were treated with blocking solution (1% (w/v) bovine serum albumin and 0.5% (w/v) saponin in TBS) for 1 h, then with rabbit anti-mGX or control antibody at 1:200 dilution in blocking solution for 2 h, and then with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody at 1:200 dilution in blocking solution for 2 h, with 3 washes between each incubation. After 6 washes with TBS, immunofluorescent signals were visualized with a laser scanning confocal microscope (IX70; Olympus).

Capacitation and acrosome reaction assay. Sperm from caudae epididymes were allowed to swim in M2 medium for 10 min. When specified, sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid free BSA (Bovine Serum Albumin) at 37°C in a 5% CO₂ incubator for

various times. For sPLA₂ treatment, sperm were incubated with sPLA₂ in M16 medium at 37°C for the last 10 min. Cells were transferred in PBS solution and then fixed with 4% PFA solution for 2 min. Sperm were washed (100 mM ammonium acetate, 2 min), wet-mounted on slides and air dried. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2 min, and finally rinsed. Slides were counted and at least 150 sperm were scored.

Electron microscopy. Sperm were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M Na⁺ cacodylate pH 7.4 during 2 h at room temperature. Cells were washed with buffer and post fixed with 1% Osmium tetroxyde in the same buffer for 1 h at 4°C. After washing with water, cells were stained overnight at 4°C with 0.5% uranile acetate pH 4.0. Cells were dehydrated through graded alcohol (30, 60, 90, 100, 100, and 100%) and infiltrate with a mix of 1/1 epon/alcohol 100% during 1 h before several baths of fresh epon (Flukka) during 3 h. Finally, cells were centrifugated and immersed in fresh Epon and polymerized during 3 days at 60°C. Ultrathin sections of the cell pellet were cut with an ultramicrotome (Leica). Sections were post-stained with 4% uranile acetate and 1% lead citrate before being observed in an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX).

Detection of sPLA₂ proteins in sperm. Sperm from caudae epididymes of different mouse strains (mGX^{-/-} or WT C57BL/6J littermates, OF1 and BalbC) were allowed to swim for 15 min at 37°C in 2.5 ml of M2 medium. Sperm were then washed by centrifugation at 1,000 g twice with M2 medium, then resuspended in 2.5 ml of M16 medium. Five hundreds µl of sperm were then diluted in 4.5 ml of M16 medium containing 2% fatty acid free BSA and further incubated at 37°C for 10, 45 and 90 min. In some assays, A23187 Ca²⁺ ionophore (5 µM) was added between 60 and 90 min of incubation. After incubation, sperm were spun down for 8 min at 1,200 rpm, and supernatants and cell pellets were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. sPLA₂ protein and enzymatic activity were analyzed on crude supernatants and cell pellets after resuspension in 500 µl of M16 medium containing a

cocktail of protease inhibitors (EDTA-free complete inhibitor set, Roche Biochemicals) and lysis with a Branson 350 Sonifier Cell disrupter. Time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) for sPLA₂ was performed as described with minor modifications (55). Briefly, 1 to 5 µl of protein sample were diluted in 100 µl of Delfia assay buffer (Tris-HCl buffered NaCl solution, pH 7.8, containing NaN₃, BSA, bovine gamma globulins, Tween 40, DTPA and inert red dye, Perkin Elmer Wallac) and added to sPLA₂ IgG-coated microtiter wells previously washed twice with TR-FIA washing solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.9% NaCl, 0.04% NaN₃ and 0.02% Tween 20). After incubation at room temperature with constant shaking at 200 cycles/min for 30 min, wells were washed four times with TR-FIA washing solution, incubated with 100 µl of Eu-labeled mGX IgG tracer (0.5 µg/ml diluted in Delfia Assay Buffer), and washed again four times as above. After washing, 100 µl of Delfia enhancement solution were added to wells, incubated at room temperature for 5 min with shaking at 200 cycles/min and thereafter for 10 min without shaking. Time-resolved fluorescence was measured using a Wallac Envision Perkin Elmer plate reader and optimized optical modules for DELFIA assays. sPLA₂ enzymatic activity was measured using radiolabeled *E. coli* membranes as substrate (43). Briefly, 5-50 µl of cell lysates or supernatants were incubated for 60 min in 300 µl of sPLA₂ activity buffer (0.1 M Tris pH 8.0, 10 mM CaCl₂, and 0.1% BSA containing 100,000 dpm of [3H]oleate-radiolabeled *E. coli* membranes. Reactions were stopped by addition of 300 µl of stop buffer (0.1 M EDTA pH 8.0 and 0.5% fatty acid-free BSA). Mixtures were centrifuged at 10,000 g for 5 min, and supernatants containing released [3H]oleate were counted.

Production of recombinant sPLA₂s and sPLA₂ antibodies. Recombinant mouse group IIA, IID, IIE, IIF, V and X sPLA₂s were produced as described previously (80). PromGX sPLA₂ and the H48Q mutant of mGX sPLA₂ were produced as for mature WT mGX sPLA₂ using the pAB3 vector in which the full-length cDNA coding for PromGX was inserted in frame with

the Δ GST protein and the factor Xa cleavage site, which were removed by the factor Xa protease (80). The detailed procedure for the production and full characterization of promGX sPLA₂ will be reported elsewhere (Jemel et al., in preparation). All sPLA₂ antibodies were produced in rabbit as polyclonal antibodies raised against the different recombinant sPLA₂s (Eerola, 2006; Nevalainen, 2005 PMID 15863368). The IgG fractions used above for TRF-IA and experiments depicted in Figures 2E and 9 were obtained by purification on protein A-Sepharose as described (Eerola, 2006).

In vitro fertilization. Sperm, obtained by manual trituration of caudae epididymes from male mice (OF1,C57BL/6J, mGX^{-/-} or WT littermates), were allowed to swim in M2 medium for 10 min. Eggs were collected from mature OF1 females (6-weeks old) synchronized with 7.5 units of PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin) and 7.5 units of hCG (human chorionic gonadotrophin) before collection. The number of scored oocytes per condition was 43 +/- 19 (mini 20; max 109). We carried out IVF using standard protocols (81). Eggs were incubated with 1.5 to 5.10⁵ sperm/ml (37°C, 5% CO₂) in M16 medium for 4 h. Unbound sperms were washed away after incubation. Twenty four hours after fertilization, we scored the different stages (unfertilized oocytes, aborted embryos and 2-cell embryos as an indication of successful fertilization). The schematic course of IVF experiments is presented in Figure S3: after swimming, sperm were capacitated for 35 to 60 min in M16 2% BSA (37°C, 5% CO₂). When specified, sPLA₂ inhibitors or mGX antibody was added during the full period of capacitation. For treatment with recombinant mGX, sperm were incubated after capacitation for the last 10 min in M16 medium containing 200 nM mGX (or 1 μ M LY329722 or mGX + LY329722 in some experiments). After treatment, sperm were washed by centrifugation (1,200 rpm, 5 min) to remove unbound drug, possible lipid metabolites and all acrosomal compounds released during sPLA₂-induced AR. The rationale for this procedure was to avoid a subsequent and uncontrolled effect on IVF outcome by an uncharacterized compound

released during AR like PAF (30). After drug washing, the concentration of remaining unbound mGX was estimated to be lower than 1 nM, based on dilution calculation. We checked that 1 nM mGX did not induce effects on sperm-oocyte fusion (37). For this purpose, we performed IVF experiments in which sperm and oocytes were incubated with 1 nM mGX throughout capacitation and fertilization: no difference was found between control and treated gametes (not shown). Finally, washed sperm were introduced into droplets containing between 20 and 109 oocytes. For LPC rescue experiments, LPC was introduced in the fertilization droplets at the same time as sperm. After 4 h of incubation, unbound sperm were washed away and IVF outcomes were scored at 24 h.

Chemical compounds. M2, M16 medium and BSA (Cohn Fraction V-low fatty acid) were from Sigma. PMSG and HCG were from Ceva santé animal and Intervet, respectively. LPC (L-alpha-lysophosphatidylcholine from chicken egg) was from Avanti and YM26734 from Yamanouchi Pharmaceuticals.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with SigmaPlot. T-test and paired t-test were used to compare the effect of various compounds on AR and fertility, respectively. Data presented represent mean \pm SEM. Statistical tests with a p values < 0.05 were considered as statistically significant (***) .

Acknowledgments

This work was supported in part by the Région Rhône-Alpes (to C.A.), CNRS (to C.A. and G.L.), INSERM (M.D.W.), the Association pour la Recherche sur le cancer [grant 3977] and the Agence Nationale de la Recherche (to G.L.), and by grants-in aid for scientific research from the Ministry of Education, Science, Culture, Sports and Technology of Japan and PRESTO from the Japan Science and Technology Agency (to M.M. and S.H.), the NOVARTIS Foundation for the Promotion of Science, and the Toray Science Foundation

(M.M.). J.E. was supported by a fellowship by the Région Rhône-Alpes. We thank Lexicon Genetics Inc. for providing us mGX-deficient mouse and Pr. Michael Gelb for providing LY329722, indoxam and mGX antibody. We thank H. de Pomyers and Latoxan for their support.

Reference List

1. Austin,C.R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170**:326.
2. Jungnickel,M.K., Sutton,K.A., and Florman,H.M. 2003. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms. *Cell* **114**:401-404.
3. Inoue,N., Ikawa,M., Nakanishi,T., Matsumoto,M., Nomura,M., Seya,T., and Okabe,M. 2003. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol.Cell Biol.* **23**:2614-2622.
4. Travis,A.J. and Kopf,G.S. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J.Clin.Invest.* **110**:731-736.
5. Aitken,R.J. and Baker,M.A. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod.Fertil.Dev.* **16**:581-588.
6. O'Flaherty,C., De Lamirande,E., and Gagnon,C. 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic.Biol.Med.* **41**:528-540.
7. Fraser,L.R., Adeoya-Osiguwa,S.A., Baxendale,R.W., and Gibbons,R. 2006. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci.* **11**:1636-1645.
8. Salicioni,A.M., Platt,M.D., Wertheimer,E.V., Arcelay,E., Allaire,A., Sosnik,J., and Visconti,P.E. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc.Reprod.Fertil.Suppl.* **65**:245-259.
9. Gadella,B.M., Tsai,P.S., Boerke,A., and Brewis,I.A. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int.J.Dev.Biol.* **52**:473-480.
10. Jones,R., James,P.S., Howes,L., Bruckbauer,A., and Klenerman,D. 2007. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J.Androl.* **9**:438-444.
11. Lenzi,A., Picardo,M., Gandini,L., and Dondero,F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum.Reprod.Update.* **2**:246-256.

12. Buffone,M.G., Verstraeten,S.V., Calamera,J.C., and Doncel,G.F. 2009. High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa are Associated with Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *J.Androl.* **30**:552-558.
13. Zalata,A., Hassan,A., Christophe,A., Comhaire,F., and Mostafa,T. 2009. Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int.J.Androl.* **in press**.
14. Wang,L., Beserra,C., and Garbers,D.L. 2004. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev.Biol.* **267**:203-215.
15. Masuda,S., Murakami,M., Matsumoto,S., Eguchi,N., Urade,Y., Lambeau,G., Gelb,M.H., Ishikawa,Y., Ishii,T., and Kudo,I. 2004. Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim.Biophys.Acta.* **1686**:61-76.
16. Koizumi,H., Yamaguchi,N., Hattori,M., Ishikawa,T.O., Aoki,J., Taketo,M.M., Inoue,K., and Arai,H. 2003. Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J.Biol.Chem.* **278**:12489-12494.
17. Bao,S., Miller,D.J., Ma,Z., Wohltmann,M., Eng,G., Ramanadham,S., Moley,K., and Turk,J. 2004. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J.Biol.Chem.* **279**:38194-38200.
18. Roldan,E.R. and Shi,Q.X. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* **12**:89-104.
19. Schaloske,R.H. and Dennis,E.A. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**:1246-1259.
20. Lambeau,G. and Gelb,M.H. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu.Rev.Biochem.* **77**:495-520.
21. Leslie,C.C. 2004. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem.Cell Biol.* **82**:1-17.
22. Kita,Y., Ohto,T., Uozumi,N., and Shimizu,T. 2006. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**:1317-1322.
23. Kikawada,E., Bonventre,J.V., and Arm,J.P. 2007. Group V secretory PLA2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2alpha activation. *Blood.* **110**:561-567.
24. Yan,W., Assadi,A.H., Wynshaw-Boris,A., Eichele,G., Matzuk,M.M., and Clark,G.D. 2003. Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**:7189-7194.
25. Ohto,T., Uozumi,N., Hirabayashi,T., and Shimizu,T. 2005. Identification of novel cytosolic phospholipase A(2)s, murine cPLA(2){delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA(2){beta}. *J.Biol.Chem.* **280**:24576-24583.
26. Kallajoki,M., Alanen,K.A., Nevalainen,M., and Nevalainen,T.J. 1998. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. *Prostate.* **35**:263-272.
27. Thakkar,J.K., East,J., Seyler,D., and Franson,R.C. 1983. Surface-active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim.Biophys.Acta.* **754**:44-50.
28. Antaki,P., Guerette,P., Chapdelaine,A., and Roberts,K.D. 1989. Detection of pro-phospholipase A2 in human spermatozoa. *Biol.Reprod.* **41**:241-246.

29. Lessig,J., Reibetanz,U., Arnhold,J., and Glander,H.J. 2008. Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A2 from human spermatozoa. *Asian J.Androl.* **10**:829-836.
30. Wu,C., Stojanov,T., Chami,O., Ishii,S., Shimizu,T., Li,A., and O'Neill,C. 2001. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J.Biol.Chem.* **276**:26962-26968.
31. Roldan,E.R. and Fraggio,C. 1993. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J.Biol.Chem.* **268**:13962-13970.
32. Yuan,Y.Y., Chen,W.Y., Shi,Q.X., Mao,L.Z., Yu,S.Q., Fang,X., and Roldan,E.R. 2003. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol.Reprod.* **68**:904-913.
33. Pietrobon,E.O., Soria,M., Dominguez,L.A., Monclus,M.L., and Fornes,M.W. 2005. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol.Reprod.Dev.* **70**:58-63.
34. Shi,Q.X., Chen,W.Y., Yuan,Y.Y., Mao,L.Z., Yu,S.Q., Chen,A.J., Ni,Y., and Roldan,E.R. 2005. Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *J.Cell Physiol.* **205**:344-354.
35. Fleming,A.D. and Yanagimachi,R. 1984. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J.Exp.Zool.* **229**:485-489.
36. Llanos,M.N., Morales,P., and Riffo,M.S. 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J.Exp.Zool.* **267**:209-216.
37. Riffo,M. and Nieto,A. 1999. Lysophosphatidylcholine induces changes in physicochemical, morphological, and functional properties of mouse zona pellucida: a possible role of phospholipase A2 in sperm-zona pellucida interaction. *Mol.Reprod.Dev.* **53**:68-76.
38. Riffo,M.S. and Parraga,M. 1997. Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. *J.Exp.Zool.* **279**:81-88.
39. Sato,H., Taketomi,Y., Isogai,Y., Miki,Y., Yamamoto,K., Masuda,S., Hosono,T., Arata,S., Ishikawa,Y., Ishii,T. *et al.* 2009. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility. *J.Clin.Invest.* **co-submission**.
40. Nevalainen,T.J., Eerola,L.I., Rintala,E., Laine,V.J., Lambeau,G., and Gelb,M.H. 2005. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim.Biophys.Acta.* **1733**:210-223.
41. Kabre,E., Chaib,N., Boussard,P., Merino,G., Devleeschouwer,M., and Dehaye,J.P. 1999. Study on the activation of phospholipases A2 by purinergic agonists in rat submandibular ductal cells. *Biochim.Biophys.Acta.* **1436**:616-627.
42. Marshall,L.A. and Roshak,A. 1993. Coexistence of two biochemically distinct phospholipase A2 activities in human platelet, monocyte, and neutrophil. *Biochem.Cell Biol.* **71**:331-339.
43. Singer,A.G., Ghomashchi,F., Le Calvez,C., Bollinger,J., Bezzine,S., Rouault,M., Sadilek,M., Nguyen,E., Lazdunski,M., Lambeau,G. *et al.* 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J.Biol.Chem.* **277**:48535-48549.
44. Smart,B.P., Oslund,R.C., Walsh,L.A., and Gelb,M.H. 2006. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A2: elucidation of sites for enhanced binding. *J.Med.Chem.* **49**:2858-2860.

45. Henderson,W.R., Jr., Chi,E.Y., Bollinger,J.G., Tien,Y.T., Ye,X., Castelli,L., Rubtsov,Y.P., Singer,A.G., Chiang,G.K., Nevalainen,T. *et al.* 2007. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J.Exp.Med.* **204**:865-877.
46. Fujioka,D., Saito,Y., Kobayashi,T., Yano,T., Tezuka,H., Ishimoto,Y., Suzuki,N., Yokota,Y., Nakamura,T., Obata,J.E. *et al.* 2008. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation.* **117**:2977-2985.
47. Muller,C.H. 2000. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J.Androl.* **21**:10-30.
48. Meizel,S. and Turner,K.O. 1983. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **161**:315-318.
49. Surrel,F., Jemel,I., Boilard,E., Bollinger,J.G., Payre,C., Mounier,C.M., Talvinen,K.A., Laine,V.J., Nevalainen,T.J., Gelb,M.H. *et al.* 2009. Group X phospholipase A2 stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators. *Mol.Pharmacol.* **76**:778-790.
50. Morioka,Y., Saiga,A., Yokota,Y., Suzuki,N., Ikeda,M., Ono,T., Nakano,K., Fujii,N., Ishizaki,J., Arita,H. *et al.* 2000. Mouse group X secretory phospholipase A2 induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A2 receptor. *Arch.Biochem.Biophys.* **381**:31-42.
51. Green,D.P. 1978. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J.Cell Sci.* **32**:137-151.
52. Mounier,C.M., Ghomashchi,F., Lindsay,M.R., James,S., Singer,A.G., Parton,R.G., and Gelb,M.H. 2004. Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A(2) occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A(2)-alpha. *J.Biol.Chem.* **279**:25024-25038.
53. Hamaguchi,K., Kuwata,H., Yoshihara,K., Masuda,S., Shimbara,S., Oh-ishi,S., Murakami,M., and Kudo,I. 2003. Induction of distinct sets of secretory phospholipase A(2) in rodents during inflammation. *Biochim.Biophys.Acta.* **1635**:37-47.
54. Mitsuishi,M., Masuda,S., Kudo,I., and Murakami,M. 2007. Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim.Biophys.Acta.* **1771**:1389-1396.
55. Eerola,L.I., Surrel,F., Nevalainen,T.J., Gelb,M.H., Lambeau,G., and Laine,V.J. 2006. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**:745-756.
56. Valentin,E., Ghomashchi,F., Gelb,M.H., Lazdunski,M., and Lambeau,G. 1999. On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J.Biol.Chem.* **274**:31195-31202.
57. Cupillard,L., Koumanov,K., Mattei,M.G., Lazdunski,M., and Lambeau,G. 1997. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* **272**:15745-15752.
58. Valentin,E., Singer,A.G., Ghomashchi,F., Lazdunski,M., Gelb,M.H., and Lambeau,G. 2000. Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **279**:223-228.
59. Schaefer,M., Hofmann,T., Schultz,G., and Gudermann,T. 1998. A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:3008-3013.
60. Morishita,T., Nozaki,M., Sano,M., Yokoyama,M., Nakamura,G., and Nakano,H. 1992. Regional differences of phospholipase A2 activity in the rabbit oviductal epithelium. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* **47**:199-202.

61. Manjunath,P., Soubeyrand,S., Chandonnet,L., and Roberts,K.D. 1994. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem.J.* **303**:121-128.
62. Upreti,G.C., Hall,E.L., Koppens,D., Oliver,J.E., and Vishwanath,R. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim Reprod.Sci.* **56**:107-121.
63. Wang,S.K., Huang,Y.F., Li,B.T., Xia,X.Y., and Wang,Z.Z. 2003. Detection and clinical significance of phospholipase A2 in semen of male infertile patients. *Zhonghua Nan.Ke.Xue.* **9**:90-93.
64. Mitsuishi,M., Masuda,S., Kudo,I., and Murakami,M. 2006. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem.J.* **393**:97-106.
65. Asano,A., Selvaraj,V., Buttke,D.E., Nelson,J.L., Green,K.M., Evans,J.E., and Travis,A.J. 2009. Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct subtypes of membrane rafts. *J.Cell Physiol.* **218** :537-548.
66. Parks,J.E., Arion,J.W., and Foote,R.H. 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol.Reprod.* **37**:1249-1258.
67. Thaler,C.D., Thomas,M., and Ramalie,J.R. 2006. Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Mol.Reprod.Dev.* **73**:1541-1549.
68. Wathes,D.C., Abayasekara,D.R., and Aitken,R.J. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol.Reprod.* **77**:190-201.
69. Silva,P.F. and Gadella,B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* **65**:958-978.
70. Singh,D.K. and Subbaiah,P.V. 2007. Modulation of the activity and arachidonic acid selectivity of group X secretory phospholipase A2 by sphingolipids. *J.Lipid Res.* **48**:683-692.
71. Jensen,L.B., Burgess,N.K., Gonda,D.D., Spencer,E., Wilson-Ashworth,H.A., Driscoll,E., Vu,M.P., Fairbourn,J.L., Judd,A.M., and Bell,J.D. 2005. Mechanisms governing the level of susceptibility of erythrocyte membranes to secretory phospholipase A2. *Biophys.J.* **88**:2692-2705.
72. Cross,N.L. 2000. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. *Biol.Reprod.* **63**:1129-1134.
73. Kurz,A., Viertel,D., Herrmann,A., and Muller,K. 2005. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction.* **130**:615-626.
74. de Vantery Arrighi,C., Lucas,H., Chardonens,D., and de Agostini,A. 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod.Biol.Endocrinol.* **7**:in press.
75. Marti,E., Perez-Pe,R., Colas,C., Muino-Blanco,T., and Cebrian-Perez,J.A. 2008. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim Reprod.Sci.* **106**:113-132.
76. Jungnickel,M.K., Marrero,H., Birnbaumer,L., Lemos,J.R., and Florman,H.M. 2001. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat.Cell Biol.* **3**:499-502.
77. Escoffier,J., Boisseau,S., Serres,C., Chen,C.C., Kim,D., Stambouliau,S., Shin,H.S., Campbell,K.P., De Waard,M., and Arnoult,C. 2007. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J.Cell Physiol.* **212**:753-763.
78. Nayernia,K., Adham,I.M., Shamsadin,R., Muller,C., Sancken,U., and Engel,W. 2002. Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol.Hum.Reprod.* **8**:434-440.

79. Drab,M., Verkade,P., Elger,M., Kasper,M., Lohn,M., Lauterbach,B., Menne,J., Lindschau,C., Mende,F., Luft,F.C. *et al.* 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. **293**:2449-2452.
80. Rouault,M., Le Calvez,C., Boilard,E., Surrel,F., Singer,A., Ghomashchi,F., Bezzine,S., Scarzello,S., Bollinger,J., Gelb,M.H. *et al.* 2007. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry*. **46**:1647-1662.
81. Fraser,L.R. 1993. In vitro capacitation and fertilization. *Methods in Enzymology: Guide to Techniques in Mouse Development* **225**:239-253.

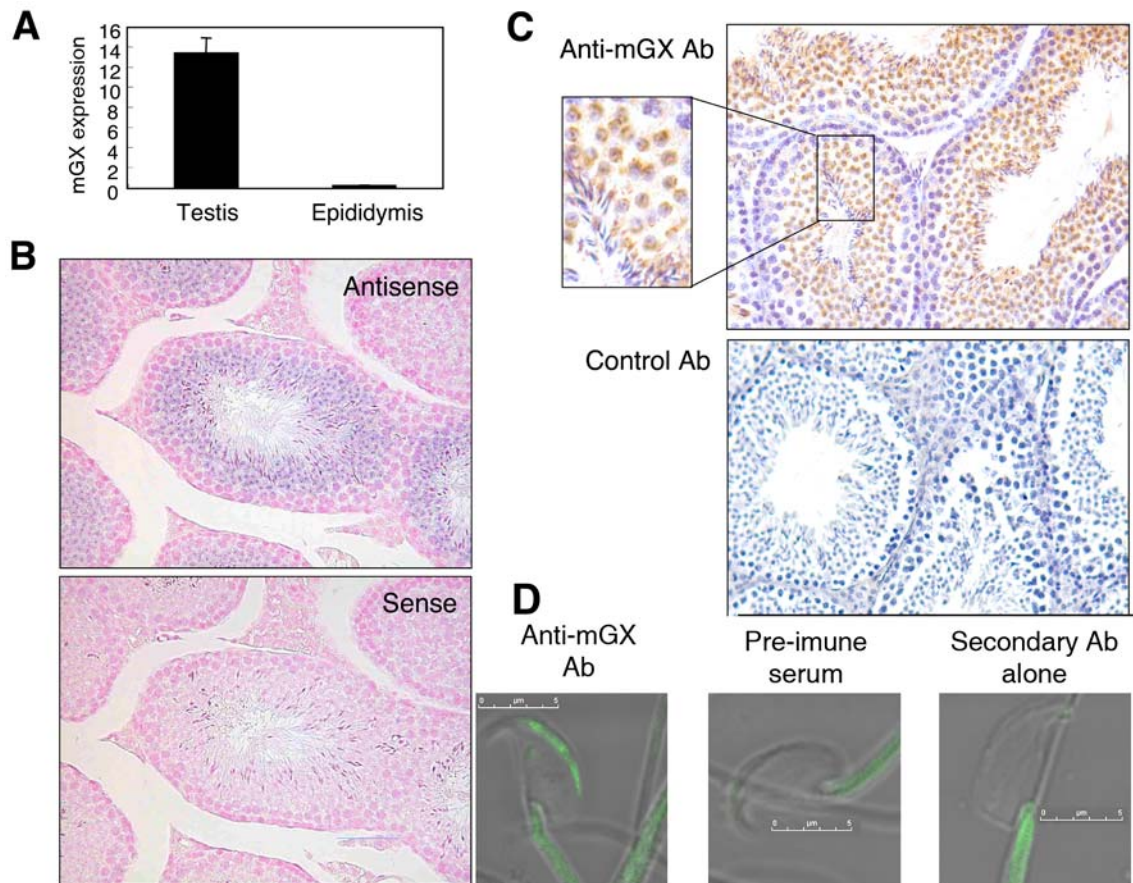


Figure 1

Expression of mGX sPLA₂ in mouse spermatogenic cells. (A) Quantitative RT-PCR analysis shows that mGX mRNA is expressed in the testis, but only minimally in the epididymis. (B) In situ hybridization. Sections of the testis from 8-weeks old C57BL/6J mice were hybridized with antisense and sense probes for mGX. Positive signal for mGX was detected in spermatogenic cells (spermatocytes and spermatids, but not spermatogonia) in the seminiferous tubules. (C) Immunohistochemistry. Sections of the testis from 8-weeks old C57BL/6J mice were stained with anti-mGX antibody or control antibody. Intense staining was found in spermatocytes and spermatids in the seminiferous tubules, but not in spermatogonia. In magnified views, scattered signals with crescent and elongated shapes were evident in spermatocytes and spermatids, suggesting labeling in the acrosomal area. (D) Spermatozoa from *caudae* epididymis were stained with anti-mGX antibody or control antibodies. Immunofluorescent signal for mGX sPLA₂ was confined to the sperm head. Note that the staining along the tail was non specific since sperm treated with pre-immune serum or only secondary antibody were also stained. Bar scale 5 μ m.

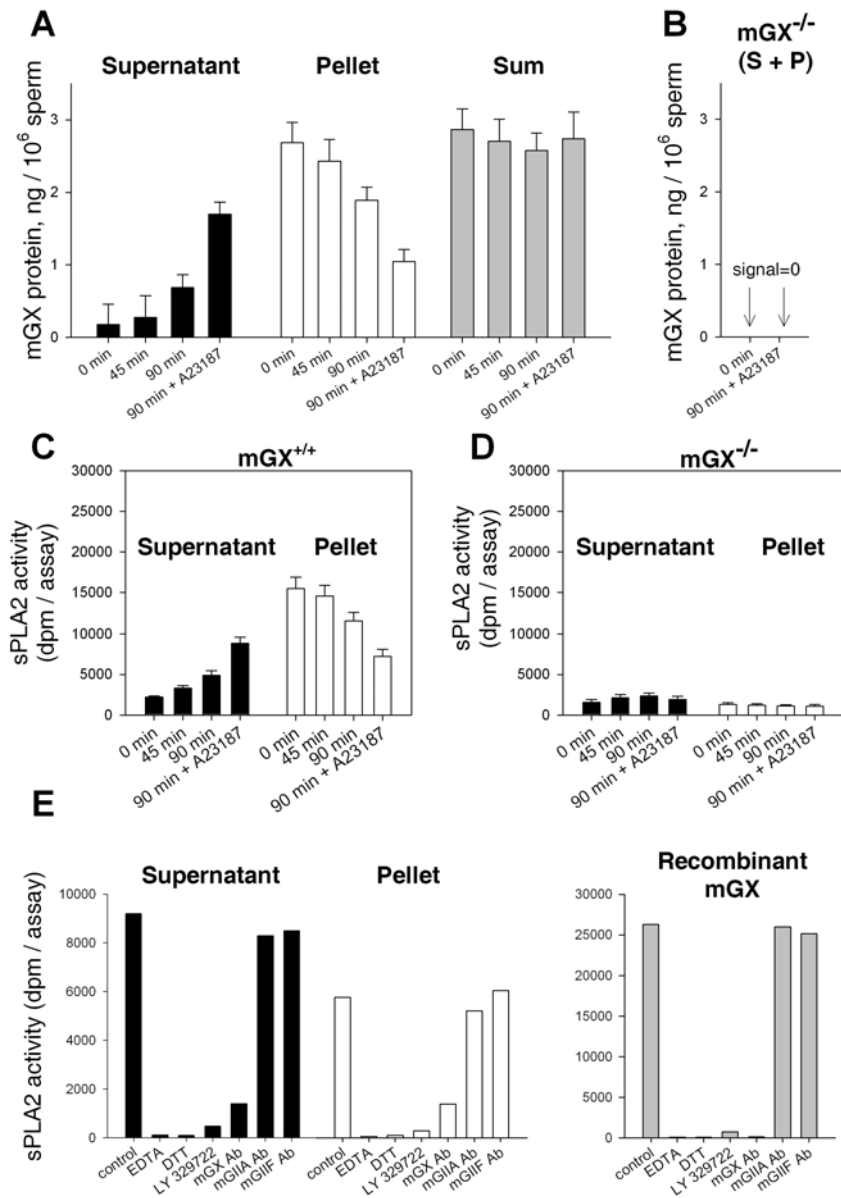


Figure 2 Catalytically-active mGX sPLA₂ is released from sperm during AR. (A) Total amount of mGX protein measured by time-resolved fluoroimmunoassays in supernatants and cell pellets of WT sperm during capacitation (up to 90 min) and after AR triggered by addition of the Ca²⁺ ionophore A23187 (5 μ M) between 60 and 90 min. “Sum” corresponds to the total amount of mGX in both fractions at various times. (B) Similar assays using mGX^{-/-} sperm, showing no mGX signal (sum of S + P) before capacitation (0 min) and after A23187-induced AR. (C) total sPLA₂ enzymatic activity measured using *E. coli* radiolabeled enzymatic assays in supernatants and cell pellets of WT sperm during capacitation (n=5). (D) Similar enzymatic assays using mGX^{-/-} sperm, showing no variation of sPLA₂ enzymatic activity throughout capacitation in both fractions (n=4). (E) sPLA₂ enzymatic activities of supernatants and cell pellets of WT sperm (at 90 min + A23187) and of recombinant mGX (0.1 nM, n=2) are inhibited by EDTA (20 mM), DTT (10 mM), LY329722 (10 μ M) and anti-mGX antibody (IgG fraction, 5 μ g), but not by anti-mGIIA and anti-mGIIF antibodies (n=2).

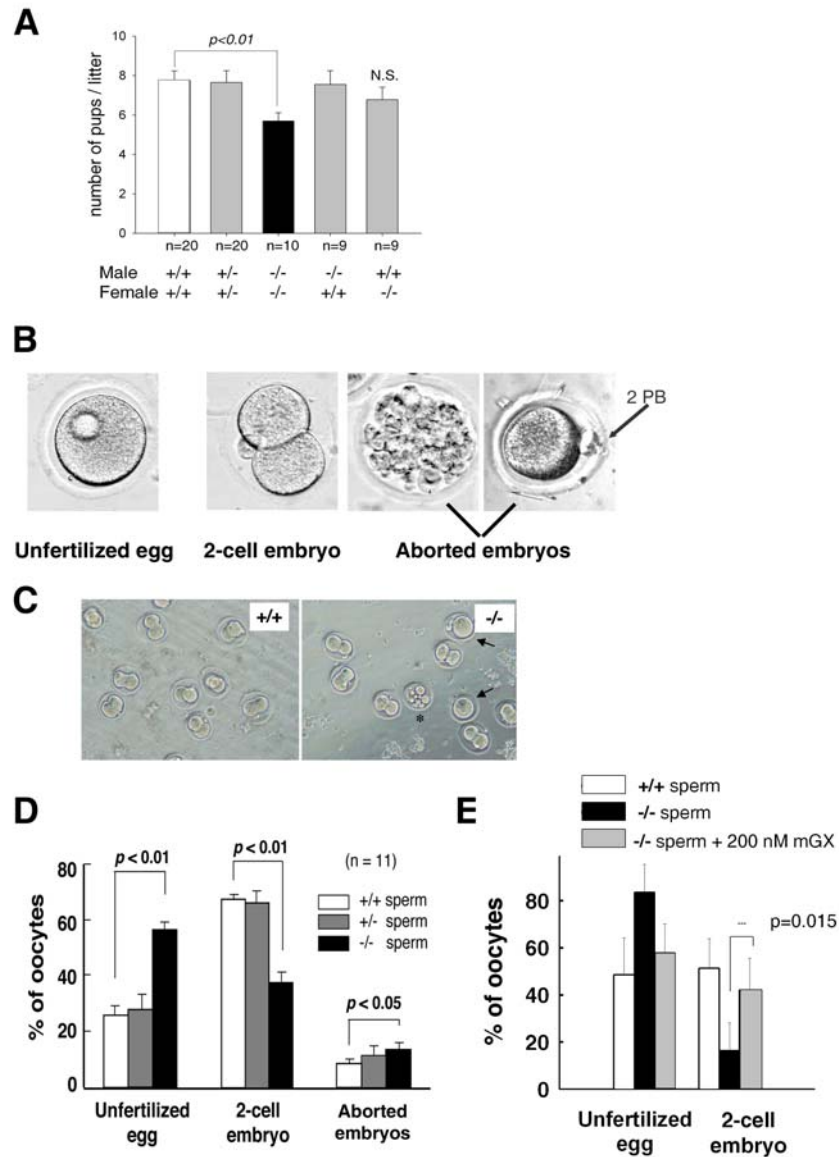


Figure 3

The lack of mGX in sperm affects male fertility. (A) The litter sizes of intercrosses between male and female mGX-deficient mice are lower than those of littermates WT mice. Note that male and female mGX^{-/-} mice produced normal litter size when mated with wild-type (WT) C57BL/6J mice (B) Pictures of the different stages obtained after IVF at 24 h: unfertilized oocytes; 2-cell embryos (normal development); aborted embryos corresponding to oocytes with either multiple and uncontrolled divisions or presenting a second polar body (2 PB) but no cell division (arrows). (C) Pictures of embryo development 24 h after fertilization: (+/+), WT sperm crossed with WT oocytes; (-/-), mGX^{-/-} sperm crossed with WT oocytes; arrows show unfertilized oocytes and asterix show aborted embryos (D) IVFs performed with mGX^{-/-} sperm and WT oocytes have a lower rate of 2-cell embryos and higher rate of aborted embryos compared to IVFs performed with WT littermate sperm and WT oocytes (n=11). (E) The low fertilizing potential of mGX^{-/-} sperm is rescued by recombinant mGX. IVF was performed by mixing WT oocytes with (i) WT sperm from littermates (n=4), (ii) mGX^{-/-} sperm (n=4), or (iii) mGX^{-/-} sperm briefly treated with 200 nM mGX (treatment for 10 min at the end of the capacitation period (grey bars, n=4)). The development of eggs was evaluated after 24 h by counting the different stages. *** statistically significant, p as indicated.

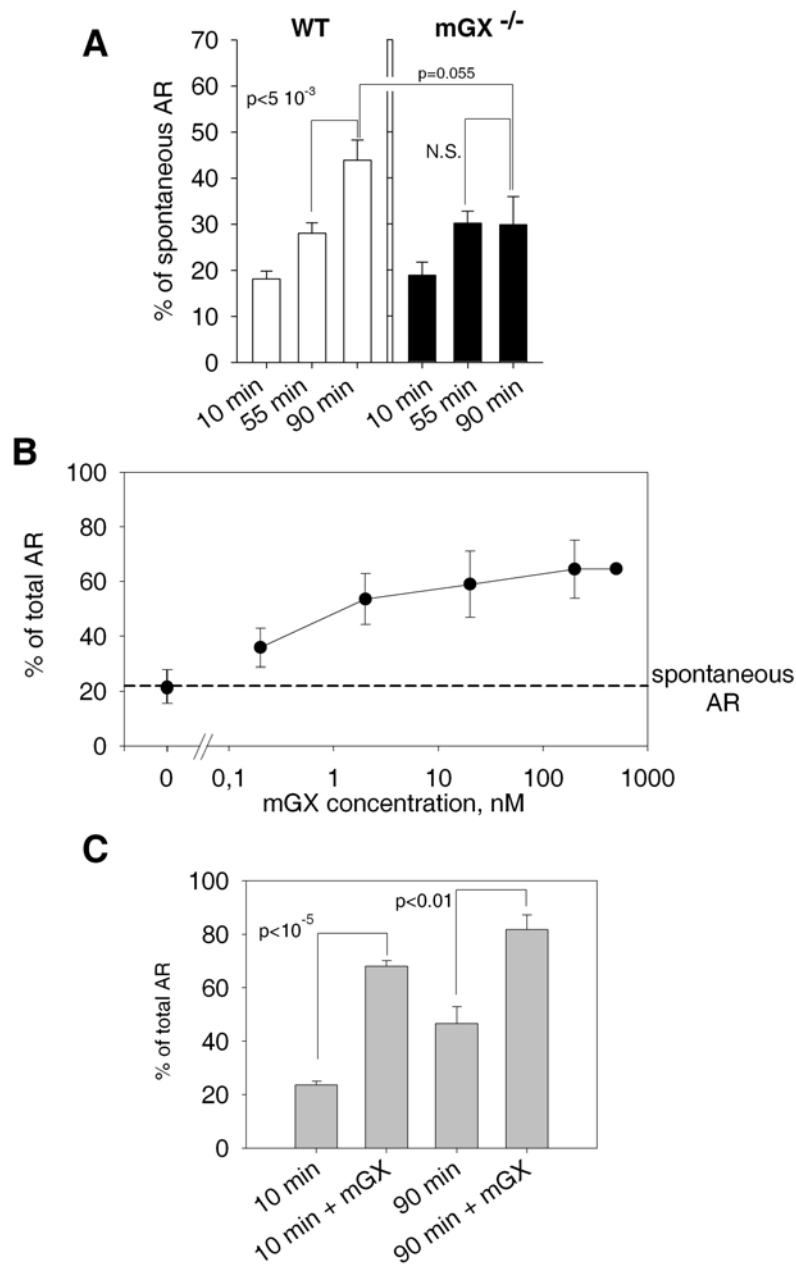


Figure 4

Endogenous and recombinant mGX both regulate spontaneous AR during capacitation. (A) Spontaneous AR of mGX^{-/-} sperm does not progress beyond 55 min of in vitro capacitation. Spontaneous AR was quantified during capacitation at 10, 55 and 90 min in mGX^{+/+} littermate sperm (n=11) and mGX^{-/-} sperm (n=6). (B) Recombinant mGX sPLA2 is a potent inducer of AR. Dose-response curve for AR of non-capacitated sperm triggered by mGX (n=3 to 8). (C) Treatment with mGX sPLA2 (200 nM) for 10 min triggers AR of both uncapacitated sperm (23.7 ± 1.4% to 68.1 ± 2.1% for control and mGX-treated sperm, respectively. n=23) and sperm capacitated for 90 min (46.5 ± 6.3% to 81.8 ± 5.4% for control and mGX-treated sperm, respectively. n=3).

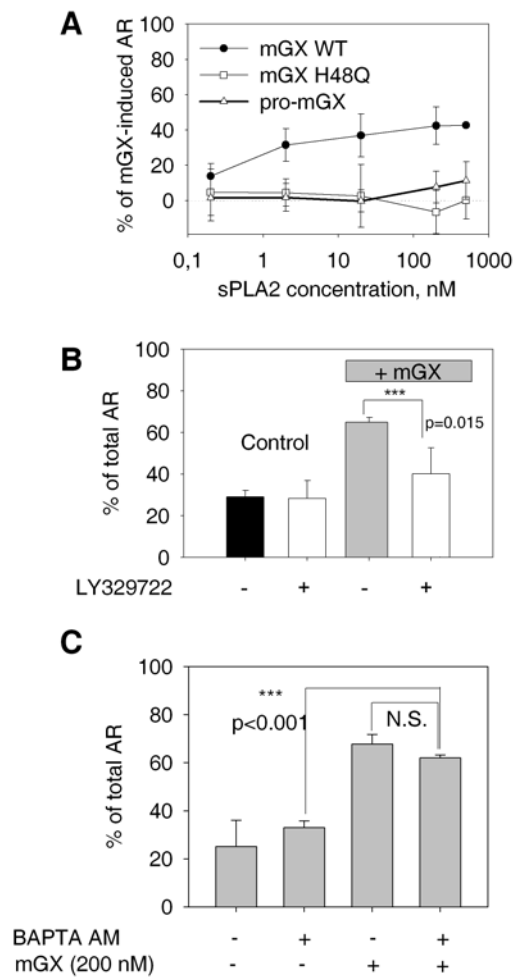


Figure 5

mGX triggered AR via its catalytic activity and independently of cytosolic Ca^{2+} rise. (A) Dose-response curves for AR of non-capacitated sperm triggered by mGX (n=3 to 8), mGX-H48Q (n=3) and pro-mGX (n=3). Results are expressed as sPLA₂-specific AR, i.e. total AR minus spontaneous AR. (B) The specific sPLA₂ inhibitor LY329722 (1 μM) blocked the ability of 200 nM mGX to trigger AR of sperm capacitated during 45 min (n=3). Results correspond to total AR. (C) Loading sperm with 10 μM BAPTA did not modify spontaneous AR (two left columns, n=3) and mGX-induced AR (two right columns, t-test N.S., n=3) of sperm incubated in a non capacitating medium (no BSA). In the presence of BAPTA, the level of AR between non-treated and mGX treated sperm is statistically significant.

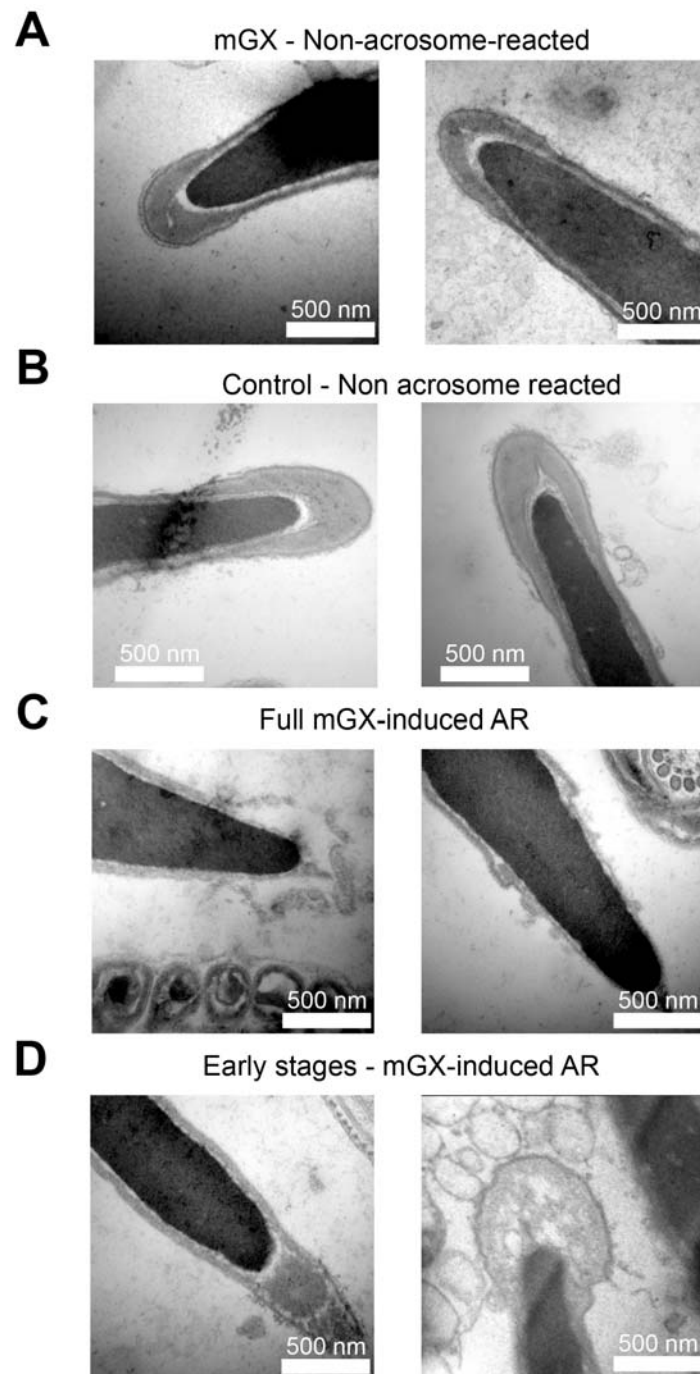


Figure 6

Ultrastructure of the head of mGX-sPLA₂ treated sperm (A) Electron micrographs of non acrosome-reacted sperm treated by 200 nM mGX (non capacitated sperm). (B) Electron micrographs of non acrosome-reacted control (untreated) sperm (non capacitated sperm). (C) Acrosome-reacted sperm (non capacitated sperm) in the presence of 200 nM mGX presented a normal morphological feature of sperm undergoing AR: fusion between the plasma and acrosomal membrane produced vesiculation (left picture), and the outer acrosomal membrane was fused with the plasma membrane and presented a typical double hairpin shape at the base of the acrosome (right picture) or (D) presented early stages of AR, *i.e.* cavitation.

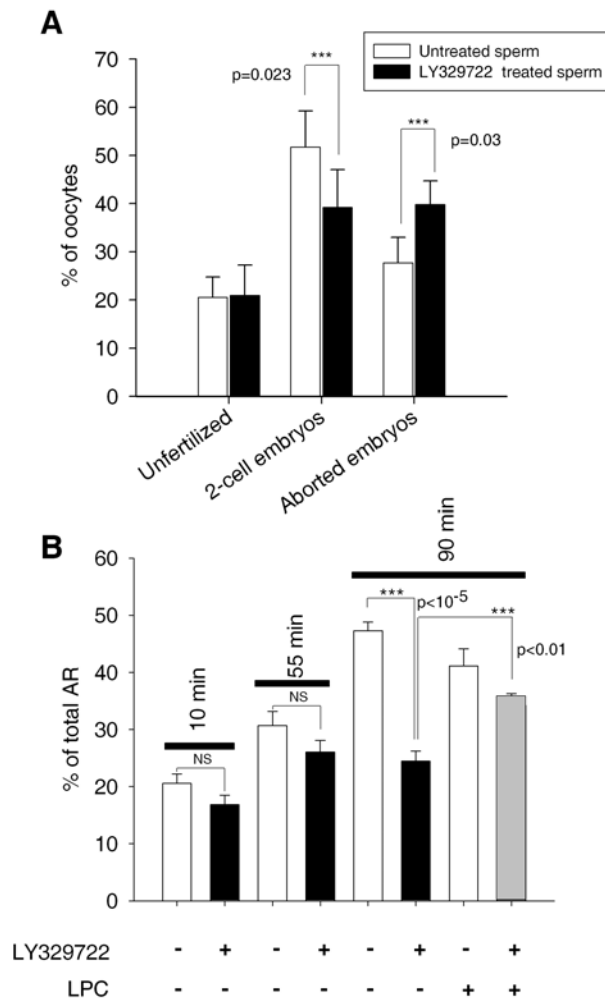


Figure 7

Blocking endogenous mGX with the specific inhibitor LY329722 impacts both fertility outcome and spontaneous AR.

(A) Endogenous mGX, secreted during spontaneous AR, controls the yield of viable embryos, without changing the rate of fertilization. IVF experiments were performed with either control sperm (white bars) or the same sperm treated throughout capacitation with 1 μ M LY329722 (n=8) and unfertilized oocytes. Two-cell embryos and aborted embryos were scored. Inhibiting mGX decreases 2-cell embryos and increases aborted embryos. The design of the experiment clearly indicates that LY329722 controls the yield of viable embryos by inhibiting endogenous mGX secreted during spontaneous AR. (B) The sPLA₂ inhibitor LY329722 blocked the late phase of spontaneous AR. Spontaneous AR was quantified during capacitation at 10, 55 and 90 min in the absence or presence of 1 μ M LY329722 (n=10-14). Incubation of sperm with 1 μ M LPC during the last 45 min partially rescued the inhibition of spontaneous AR induced by LY329722 (n=7).

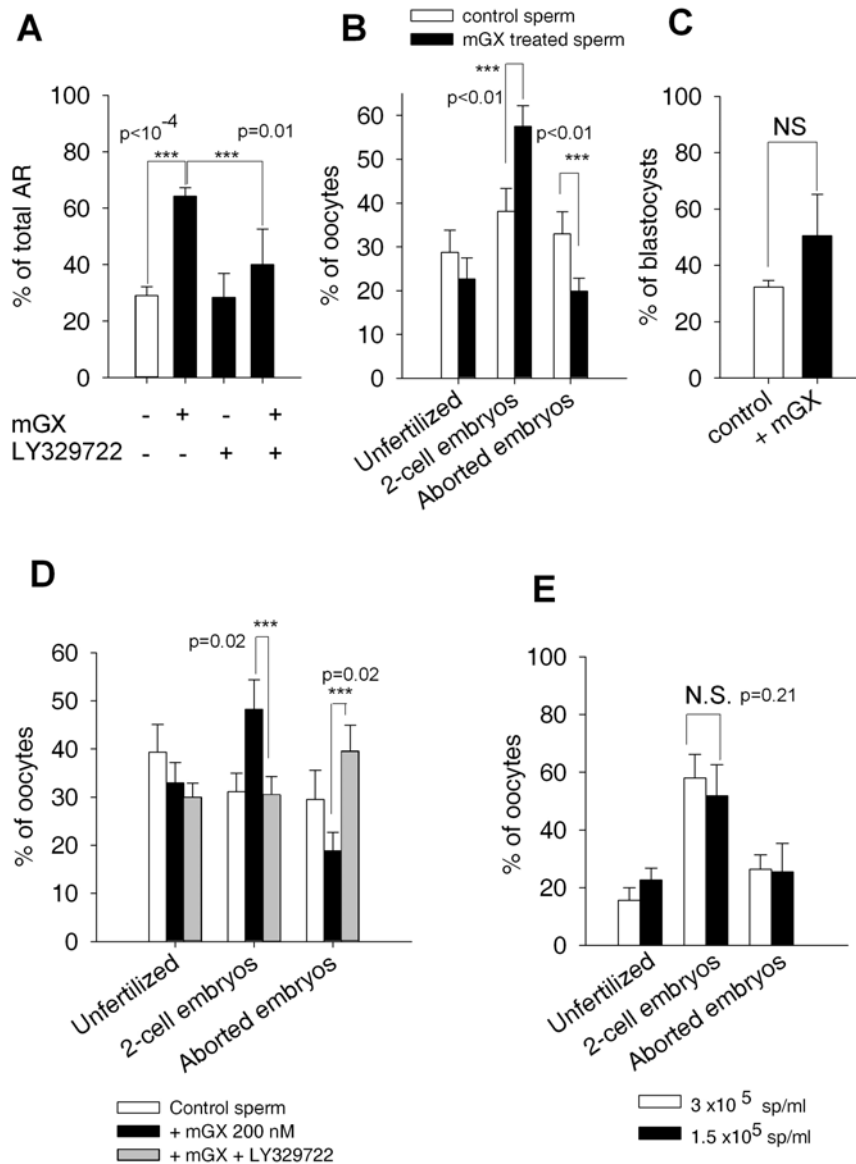


Figure 8

Exogenous mGX reinforces the effect of endogenous mGX on spontaneous AR and improves fertility outcome. (A)

Sperm used for IVF and briefly pretreated with exogenous mGX presents a higher rate of spontaneous AR. WT sperm were incubated during the last 10 min of capacitation with mGX alone (200 nM), LY329722 alone (1 μ M), or mGX preincubated with LY329722. Only mGX treatment triggered significant AR over the untreated condition (n=6). (B) Recombinant mGX controls the yield of viable embryos, without changing the rate of fertilization. IVF was performed either with OFI control sperm or with the same sperm briefly treated with 200 nM mGX and IVF outcome was scored (n=13). Recombinant mGX increases 2-cell embryos and decreases aborted embryos. (C) Two-cell embryos obtained with mGX-treated sperm developed normally to the blastocyst stage (D) LY329722 blocks the mGX-dependent increase in fertility. IVF was performed with either control sperm or the same sperm treated briefly with 200 nM mGX or with the same sperm treated with 200 nM mGX but preincubated with 1 μ M LY329722 (n=6). (E) The number of sperm incubated with oocytes does not impact fertility outcome. IVF was performed at two different concentrations: 1.5 10^5 and 3 10^5 sperm (n=4).

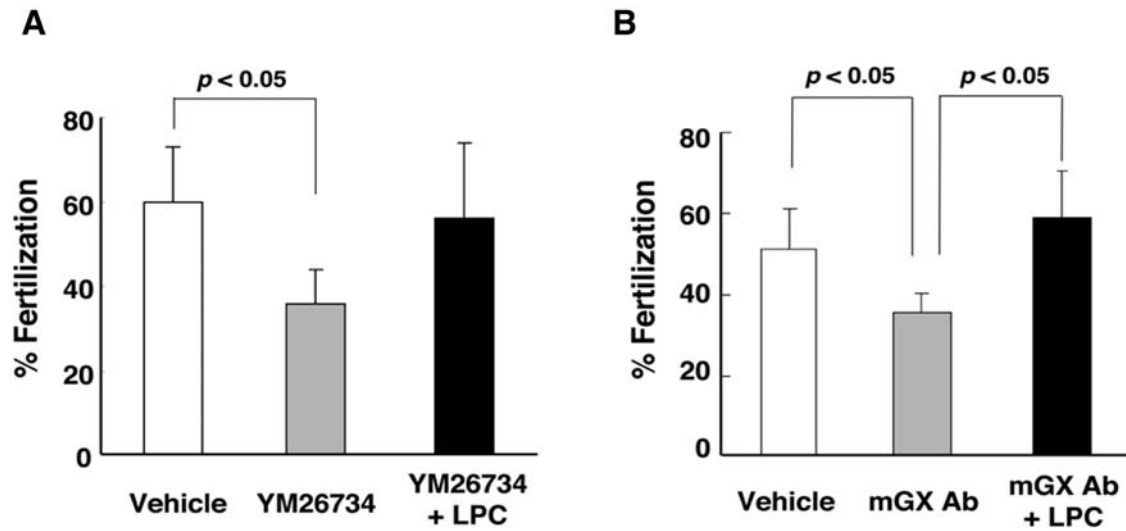


Figure 9

Addition of LPC during fertilization rescues the fertilization potential of sperm treated with sPLA₂ inhibitor or anti-mGX antibody during capacitation. (A) IVF experiments were performed with sperm treated or not with the sPLA₂ inhibitor YM26734 (1 μM) only during the capacitation period. LPC (1 μg/ml) was added only during gamete mixing. The ~40% reduction of IVF rate measured with YM26734-treated sperm (n=3, p<0.05) was restored by supplementation with LPC. (B) A similar reduction and recovery of IVF were observed with sperm treated with anti-mGX antibody (50 μg/ml) during capacitation and LPC added during gamete mixing (n=3, p<0.05), respectively.

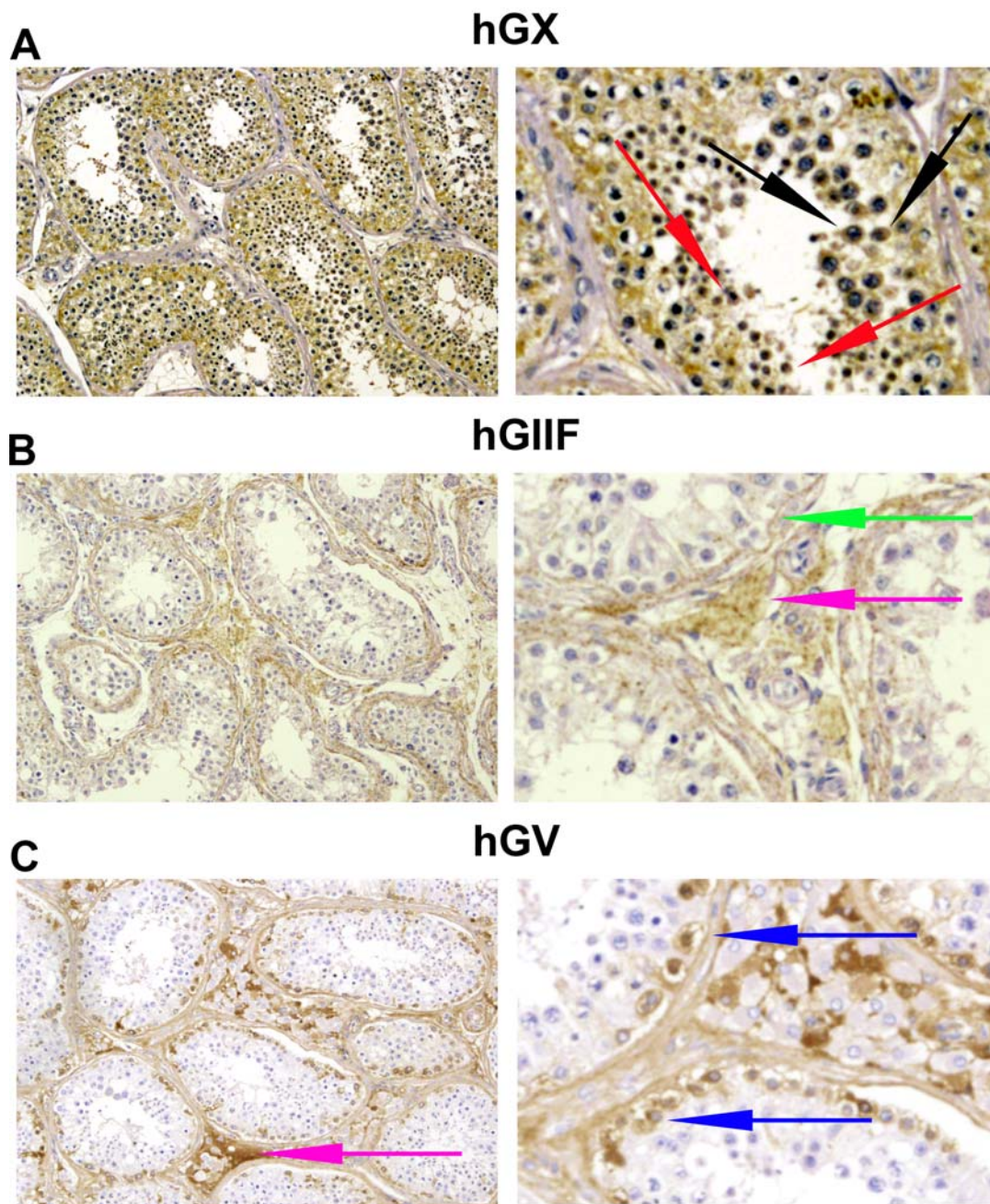


Figure S1

Group X sPLA2 is expressed in human spermatids.

Immunohistochemistry of human testis performed with different antibodies raised against human sPLA2s. **(A)** hGX sPLA2 is strongly expressed in spermatogenic cells except spermatogonia. Right: cross section of human seminiferous tubules at low magnification. Left: enlargement of the right panel: a strong staining surrounds spermatocytes (black arrows) and spermatids (red arrows). **(B)** Cross section of human seminiferous tubules at low magnification. Left: enlargement of the right panel: hGIIF sPLA2 is strongly expressed in Leydig cells (purple arrows) and in testis boundary layers (green arrows) **(C)** hGV sPLA2 is strongly expressed in Leydig cells (purple arrows) and spermatogonia (blue arrows).

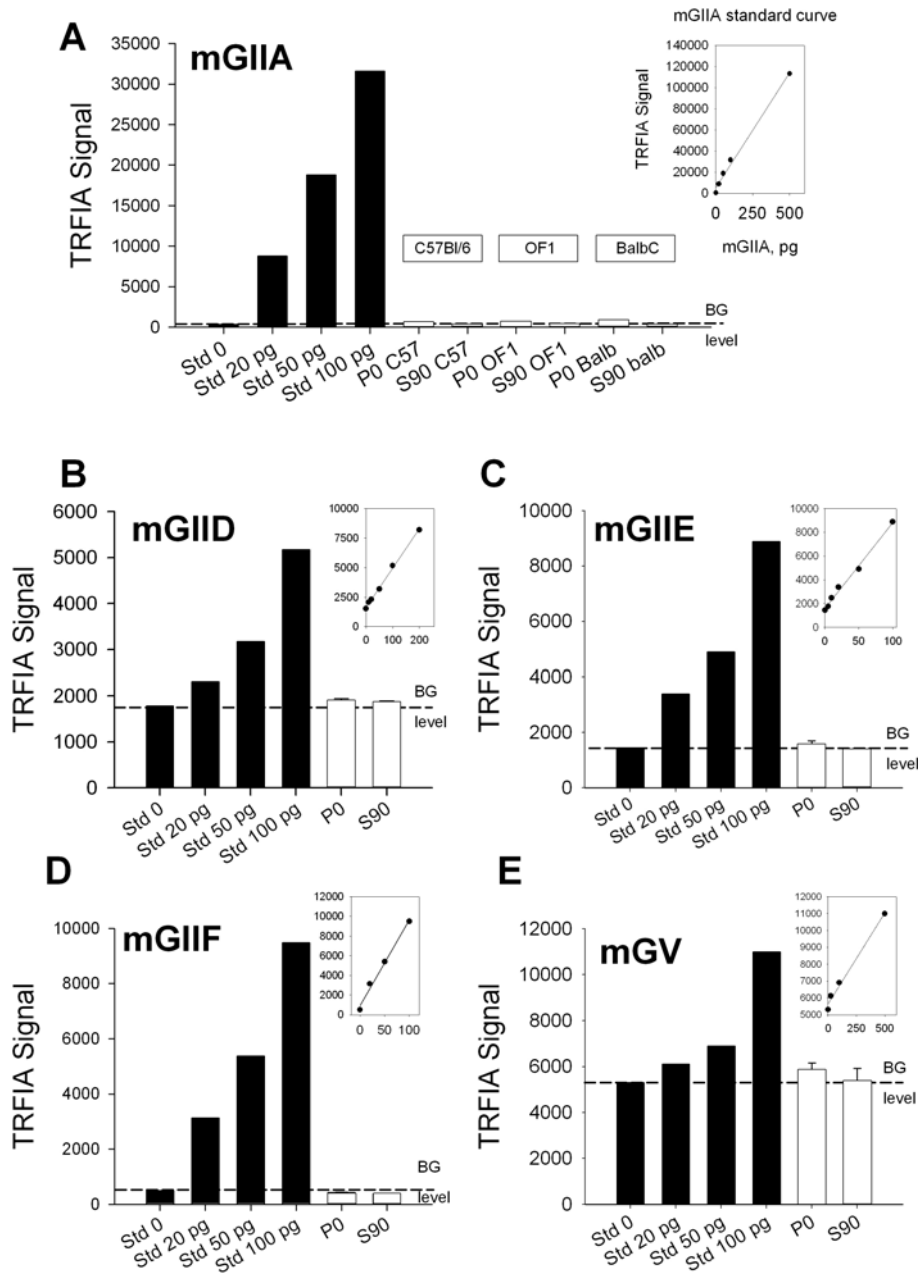


Figure S2

mGIIA, mGIID, mGIE, mGIIF and mGV are not detected by TR-FIA in mouse sperm cells.

(A) TR-FIA signals measured with different concentrations of recombinant mGIIA, and in the pellets at 0 min (P0) and the supernatants at 90 min + A23187 (S90) obtained with capacitated sperm from C57BL/6J, OF1 and BalbC males (n=3). No specific signal was measured above background level (BG level), as indicated by the dashed line. The inset shows the calibration curve with recombinant mGIIA, validating the sensitivity of the TR-FIA assay. (B, C, D and E) TR-FIA signals obtained with different concentrations of the indicated recombinant sPLA2s (n=2) and with the pellets at 0 min (P0) and the supernatants at 90 min + A23187 (S90) obtained with capacitated sperm from C57BL/6J (n=6). Insets show the calibration curves obtained with recombinant enzymes.

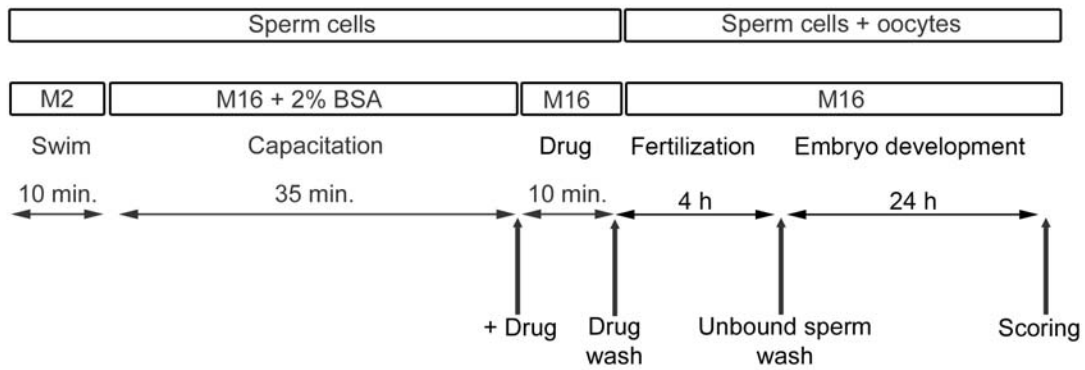


Figure S3

Schematic drawing of IVF experiments.

Sperm were first capacitated for 35 min in M16-2% BSA and then incubated for the last 10 min with the different effectors as specified in Figure legends, *i.e.* mGX recombinant protein, sPLA₂ inhibitors or a combination of both. After treatment, sperm were washed by centrifugation to remove unbound effectors, putative mGX catalytic products and all acrosomal compounds released during sPLA₂-induced AR. Finally, washed sperm were introduced into droplets containing oocytes (20-109 oocytes per experiment). After 4 h of gamete mixing, unbound sperm were washed away and IVF outcomes were scored at 24 h.

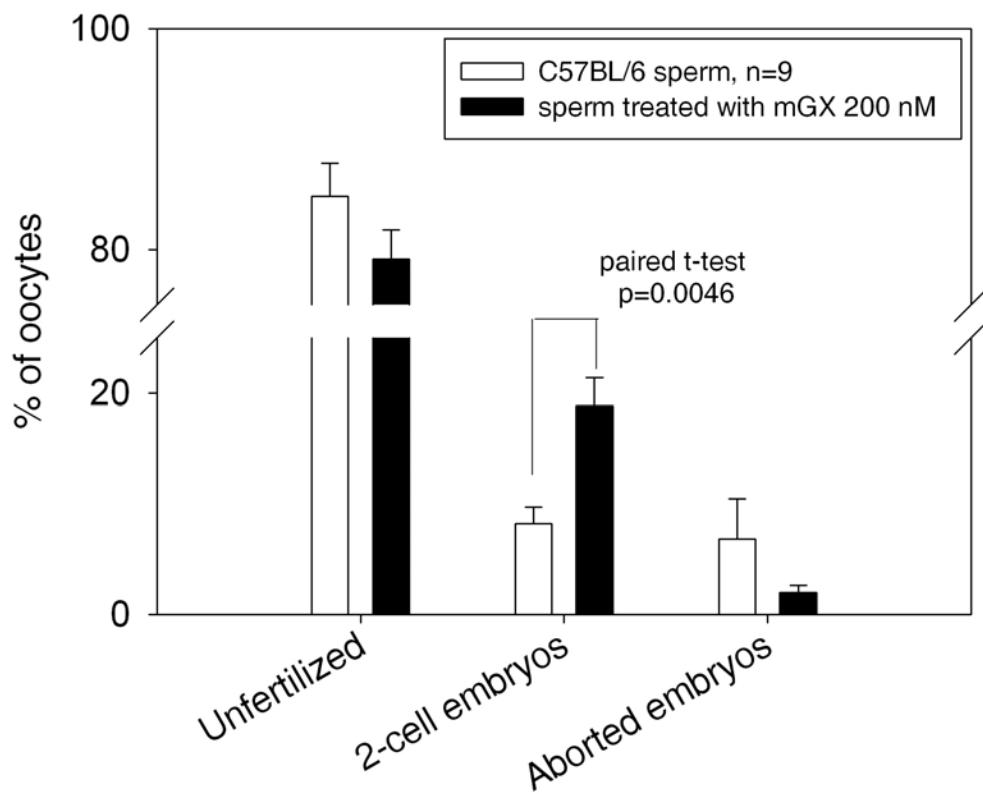


Figure S4

Recombinant mGX doubles the yield of viable mouse embryos in IVF experiments performed with sperm and oocytes obtained from C57BL/6J males and females, respectively.

IVF was performed either with control sperm (untreated, white bars) or the same sperm briefly treated with 200 nM mGX 10 min before the end of the capacitation period (black bars, n=9 males, p=0.004). Unfertilized oocytes, 2-cell embryos and aborted embryos were scored.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. ETUDE DE LA MATURATION DE LA sPLA2-X

I. Etude in vitro

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse m'ont permis d'explorer différents aspects de la maturation et de l'activité de la sPLA2-X. Cette enzyme a pour particularité d'être synthétisée sous forme proenzyme, possédant un propeptide de 11 acides aminés du côté N-terminal, mais seule la forme mature, débarrassée de ce propeptide possède une activité enzymatique forte. Il était donc d'un enjeu majeur de caractériser les acteurs de cette maturation ainsi que le lieu de cette maturation afin de mieux cerner les conditions dans lesquelles cette enzyme est fonctionnelle.

1. Maturation dans des cellules transfectées (HEK 293) Article 1

Nous avons donc dans un premier temps et par l'utilisation de différentes approches complémentaires in vitro pu identifier certaines protéases potentiellement impliquées dans la maturation de la sPLA2-X. De plus, nous avons montré que cette maturation a lieu essentiellement à l'intérieur de la cellule au cours de la sécrétion de la proPLA2.

Nous savons que la sPLA2-IIA ne présente pas de propeptide et se retrouve stockée dans des granules de sécrétion dans les plaquettes humaines (14) et les mastocytes (293) avant d'être rapidement sécrétée par différents stimuli. Cette sPLA2 est donc forcément stockée sous sa forme mature, mais les mécanismes permettant de la maintenir sous une forme catalytiquement inactive sont inconnus. La présence d'héparine (un inhibiteur naturel) ou l'absence d'un substrat de haute affinité ou encore des conditions de pH ou de calcium incompatibles avec l'activité de cette sPLA2 pourrait expliquer le maintien à l'état inactif. Dans le cas de la sPLA2-X qui se retrouve stockée dans des granules de sécrétion dans les neutrophiles de souris ou humains et dans l'acrosome des spermatozoïdes, nous ne savons pas si l'enzyme est présente sous forme proenzyme ou mature mais maintenue sans activité enzymatique.

2. Etude de maturation par différents surnageants cellulaires

En utilisant différents surnageants cellulaires et milieux conditionnés, nous avons pu montrer que la maturation de la proPLA2-X pourrait également se faire dans le milieu

extracellulaire. En effet, les différents surnageants conditionnés de cellules de mammifères, notamment les LOVO, HEK293 et des lavages broncho-alvéolaires contiennent différentes protéases capables d'activer la proPLA2-X. Dans le cas du surnageant HEK293, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de protéases a montré que la protéase responsable de la maturation appartient à la famille des proenzymes convertases de type furine. Dans le cas du surnageant LOVO, il semble qu'il y ait une protéase autre que la furine et différente de celle des HEK. En effet, contrairement aux HEK, la protéase des LOVO est capable d'activer la promGX-WT, mais pas la promGX-AR. Ceci suggère aussi que cette protéase est plus spécifique pour le site de clivage dibasique de la sPLA2-X.

Nous avons également observé que d'autres surnageants cellulaires sont dépourvus ou non d'une activité protéolytique activant la forme proenzyme, et donc que cette activité protéolytique sécrétée est probablement régulée. Les surnageants des cellules COS et les fibroblastes, mais pas ceux des cellules côlon-26, des PLB et des CHO contiennent une activité protéolytique capable de maturer la proPLA2-X.

L'activation plus importante de la promGX-WT par les lavages broncho-alvéolaires obtenus en conditions inflammatoires ou infectieuses et par un surnageant de spermatozoïdes de souris ayant fait leur réaction acrosomique suggère que la maturation de la proPLA2-X pourrait être régulée au cours de l'inflammation ou dans certaines fonctions physiologiques tels que la réaction acrosomique ou la fécondation. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Ohtsuki et al (155).

Enfin, nous avons observé que d'autres protéases dont la spécificité n'est pas connue sont présentes dans le surnageant des cellules HEK293 et sont capables de dégrader la promGX sauvage ou mutée en plusieurs formes dégradées qui sont vraisemblablement inactives. Il est donc envisageable que de telles protéases régulent *in vivo* la dégradation de la sPLA2-X mature, au delà des protéases capables d'activer la conversion de la forme proenzyme.

II. Etude *in vivo*

Afin de compléter ces études *in vitro*, nous avons tenté de déterminer sous quelle forme se trouve la sPLA2 de groupe X dans différents tissus de souris, et en particulier dans le milieu extracellulaire. Les quelques résultats obtenus ont montré que la sPLA2-X est présente dans plusieurs tissus de souris et qu'elle pourrait être sécrétée dans le milieu extracellulaire

sans forte activité enzymatique associée lorsque ces souris sont dans un état « normal », c'est à dire en l'absence de conditions pathologiques. Ceci nous conduit à penser que la maturation de la promGX dans différents tissus pourrait se faire lors de sa sécrétion selon les conditions physiologiques et physiopathologiques, et l'arsenal de protéases présent. Certaines conditions « activées » pourraient contribuer à l'activation de cette enzyme. L'analyse de la « sur-activation » de la sPLA2-X endogène de souris dans des conditions « activées » au sein de différents tissus tels qu'un asthme sévère ou une infection dans le poumon, tels qu'une colite inflammatoire dans le côlon, ou dans le cas d'un cancer de l'estomac restent des expériences à effectuer.

III. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du polymorphisme pour la phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Article 2

Nous avons contribué à mettre en évidence un polymorphisme particulier de la sPLA2-X chez l'homme. Ce polymorphisme est caractérisé par une mutation non silencieuse R38C au niveau du propeptide qui conduit à la formation d'une protéine inactive qui est probablement rapidement dégradée. Ceci est vraisemblablement dû à la formation de ponts disulfures aléatoires et au mauvais repliement de la protéine du fait de la présence de cette cystéine 38 dans le propeptide. Ce polymorphisme ne semble pas associé aux évènements cardiovasculaires dans une cohorte de patients atteints d'athérosclérose, mais son association avec d'autres maladies inflammatoires impliquant le sPLA2-X dont l'asthme ou l'infection par le virus HIV reste à étudier (167, 294).

Différents polymorphismes présents dans les gènes des sPLA2-IIA, IID et V ont été associés à des pathologies. Par exemple, différents polymorphismes sur les gènes IIA et V relient ces sPLA2 avec le développement de pathologies cardiovasculaires et leurs niveaux d'expression ou leurs effets sur l'hydrolyse des lipoprotéines circulantes (295-296). Par ailleurs, différents polymorphismes dans le gène de la sPLA2-IIA pourraient aussi jouer un rôle dans la polypose familiale adénomateuse ou FAP (297). Enfin, le polymorphisme G80S de la sPLA2-IID est associé à une perte de poids chez des patients atteints d'une maladie pulmonaire chronique (COPD). Cette perte de poids pourrait être liée l'induction de certaines cytokines pro-inflammatoires, notamment IL6 et IL8 (165, 298). L'impact de ce polymorphisme sur l'activité de la sPLA2-IID n'a pas été étudié.

B. ETUDE FONCTIONNELLE DE LA sPLA2-X ET MATURATION

Nous avons essayé de coupler ces études de maturation de la sPLA2-X à son rôle dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. En effet, celui-ci est encore peu connu.

I. Etude de la prolifération des cellules côlon-26 d'adénocarcinome colique murin induite par la sPLA2-X : Article 3

Nous avons pu montrer que la sPLA2-X exerce un effet mitogène sur la lignée côlon-26 de souris. La capacité de certaines sPLA2 à stimuler la prolifération pourrait être liée soit à leur activité enzymatique par hydrolyse de la phosphatidylcholine et production d'acide arachidonique et de lysophosphatidylcholine (36, 151), soit à leur capacité à se lier au récepteur de type M (228, 299).

Dans cet article, nous avons pu montrer que l'effet prolifératif de la sPLA2-X est dû essentiellement à son activité catalytique et pas à la liaison au récepteur de type M ou à l'activation de la cPLA2- α . Nous avons aussi observé que la promGX ne présente pas d'effet prolifératif sur ces cellules lorsque celle-ci est ajoutée dans le milieu de culture. Ramené à un contexte *in vivo*, ce résultat indique que seule la sPLA2-X sous forme active pourrait induire la prolifération de cellules cancéreuses et que les protéases responsables de sa maturation doivent être activées au cours de la tumorigénèse.

Par ailleurs, la sPLA2-X induit sur les côlon-26 l'expression de différents gènes impliqués dans le processus de cancérogénèse (données obtenues par Fanny Surrel au laboratoire). L'analyse du rôle *in vivo* de la sPLA2-X en utilisant deux modèles murins AOM (azoxyméthane) et Apc et des souris KO pour cette sPLA2 est toujours en cours au laboratoire.

II. Les propriétés anti-malariales de la phospholipase A2 de groupe X et IIF : Article 4

En collaboration avec le Dr Deregnacourt, nous avons montré un rôle de la sPLA2-X contre le parasite de la malaria *P. falciparum*.

Parmi toutes les sPLA2 humaines, seules les sPLA2-X, IIF et V ont la capacité d'inhiber le développement du parasite dans le globule rouge humain. Il est connu que la

sPLA2-IIA joue un rôle important dans la défense contre les bactéries in vitro et in vivo (110), mais cette sPLA2 apparaît inactive contre le parasite de la malaria. Les sPLA2-V et X possèdent aussi une activité antibactérienne, mais moins forte que celle de la sPLA2-IIA, et leur rôle in vivo n'est pas démontré. Ces deux sPLA2 ont aussi une activité antivirale in vitro contre le VIH et certains adénovirus (221, 300). La sPLA2 humaine de groupe III possède aussi une activité anti-adénovirale (222), mais celle-ci n'a pas d'effet sur *P. falciparum*. Enfin, l'effet anti-malariale de la sPLA2-IIF est nouveau puisque cette sPLA2 n'a pas d'effets antimicrobiens connus.

L'expression de la sPLA2-X dans les macrophages et les neutrophiles est en accord avec un rôle de cette sPLA2 dans la réaction inflammatoire et dans la défense antimicrobienne (110, 301). D'autres sPLA2, notamment les sPLA2-IIA, V et IIF ont également été détectées au niveau des plaquettes, les mastocytes, les macrophages (sPLA2-IIA) et les cellules endothéliales (sPLA2-IIF) (301).

Ceci suggère leur implication potentielle dans cette réaction anti-malariale. La surexpression de la sPLA2-IIA dans le sérum de patients infectés par *P. falciparum* reste obscure puisque cette sPLA2 n'a pas d'effet direct anti-malarial dans les conditions in vitro utilisées (224). Il est possible que cette sPLA2 nécessite des cofacteurs in vivo pour agir comme anti-paludique, ou bien que sa surexpression soit un marqueur de l'inflammation associée à la malaria, ou bien encore qu'elle soit induite par la présence de bactéries opportunistes contre lesquelles cette sPLA2 pourrait agir.

Un autre fait important de cette étude est que les sPLA2 exercent leur effet anti-malarial via l'hydrolyse des lipoprotéines et la production de médiateurs lipidiques toxiques pour le cycle du parasite dans le globule rouge humain. Ces résultats sont à rapprocher de ceux montrant l'hydrolyse des lipoprotéines par la sPLA2-X et entraînant l'activation des cellules endothéliales et la formation de macrophages spumeux dans un contexte d'athérosclérose (172). De façon générale, il est donc possible que la sPLA2-X et certaines autres sPLA2 exercent leurs fonctions de façon indirecte en hydrolysant des substrats « non cellulaires » tels que les lipoprotéines ou les phospholipides du surfactant pulmonaire, ou encore des exosomes et des microvésicules (302). L'action bactéricide et virucide des sPLA2 en présence de lipoprotéines ou de lipides du surfactant n'a pas été étudiée.

III. Implication de la sPLA2-X dans la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris : Article 5

Enfin, nous avons découvert un nouveau rôle de la sPLA2-X murine dans la réaction acrosomale et la fécondation.

Nous avons observé que la sPLA2-X est la sPLA2 majeure présente dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris et que celle-ci se retrouve dans le milieu extracellulaire de spermatozoïdes capités, indiquant qu'elle est libérée lors de la capacitation *in vitro* et de la réaction acrosomique « spontanée ». L'ajout de sPLA2-X recombinante mature et active, mais pas de la forme proenzyme, permet d'induire une forte réaction acrosomale, et cet effet dépend de l'activité enzymatique. De façon importante, une fraction de la population de spermatozoïdes est insensible à l'effet de la sPLA2-X recombinante. Ceci pourrait être expliqué par des différences de composition lipidique des membranes plasmiques de sous-populations de spermatozoïdes (303), conduisant à une liaison interfaciale distincte de la sPLA2-X et à une « attaque » sélective. De façon importante, le traitement des spermatozoïdes par la sPLA2-X permet d'augmenter le niveau de viabilité des embryons obtenus par fécondation *in vitro*. Inversement, l'inhibition de l'activité enzymatique de la sPLA2-X par le LY329722, un inhibiteur de la sPLA2-X, conduit à une augmentation du taux d'embryons morts. Ces résultats montrent une fonction de la sPLA2-X sous forme active dans l'induction de la réaction acrosomale d'une sous-population de spermatozoïdes pendant la capacitation avec un effet indirect sur la fécondation *in vitro*. Enfin, nous avons proposé que la sPLA2-X présente dans l'acrosome des spermatozoïdes résistants à l'action de la sPLA2-X puisse aussi jouer un rôle au moment de fécondation, lorsque que la réaction acrosomique « physiologique » se fait, pour faciliter le passage du spermatozoïde au travers de la zone pellucide et sa fusion avec l'ovocyte.

Conclusion

Le travail de cette thèse a permis de mieux comprendre comment peut s'effectuer la maturation de la sPLA2 de groupe X et quels sont ses rôles physiologiques et physiopathologiques. Concernant la maturation, nos études *in vitro* sur protéines purifiées et en cellules transfectées (HEK293) ont permis de montrer qu'une protéase de type furine contribue de façon majeure à l'activation de l'enzyme, vraisemblablement au cours de sa sécrétion. Nos travaux suggèrent aussi qu'une maturation est possible dans le milieu extracellulaire comme par exemple dans les cellules LOVO. Nous avons aussi tenté de mettre en évidence cette maturation dans des tissus murins dans certaines conditions physiologiques et physiopathologiques. Nous avons notamment trouvé que la sPLA2-X était la sPLA2 majeure dans l'acrosome des spermatozoïdes. Enfin nous avons observé un polymorphisme présent dans le propeptide de la sPLA2 qui conduit à la formation d'une protéine inactive et rapidement dégradée.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons montré que la forme active de la sPLA2 de groupe X, mais pas son proenzyme était capable i) de stimuler la prolifération cellulaire dans un contexte de cancer colorectal, ii) d'exercer une action toxique contre le parasite de la malaria *P.falciparum* lors de l'infection de globules rouges humains, et iii) de contrôler en partie la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris son rôle dans certaines étapes de la reproduction, à savoir la maturation des spermatozoïdes, avec un impact important dans des tests de fécondation *in vitro*.

Références bibliographiques

1. Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D., and Jain, M. K. (2001) Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A2 paradigm, *Chem. Rev.* 101, 2613-2654.
2. Valentin, E., and Lambeau, G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 59-70.
3. Lee, H. Y., Bahn, S. C., Shin, J. S., Hwang, I., Back, K., Doelling, J. H., and Ryu, S. B. (2005) Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants, *Prog. Lipid Res.* 44, 52-67.
4. Burke, J. E., and Dennis, E. A. (2009) Phospholipase A2 biochemistry, *Cardiovasc Drugs Ther* 23, 49-59.
5. Kudo, I., and Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 68-69, 3-58.
6. Schaloske, R. H., and Dennis, E. A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246-1259.
7. Lambeau, G., and Gelb, M. H. (2008) Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A2, *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495-520.
8. Ghosh, M., Tucker, D. E., Burchett, S. A., and Leslie, C. C. (2006) Properties of the Group IV phospholipase A2 family, *Prog. Lipid Res.* 45, 487-510.
9. Wilkins, W. P., 3rd, and Barbour, S. E. (2008) Group VI phospholipases A2: homeostatic phospholipases with significant potential as targets for novel therapeutics, *Curr. Drug Targets* 9, 683-697.
10. McIntyre, T. M., Prescott, S. M., and Stafforini, D. M. (2009) The emerging roles of PAF acetylhydrolase, *J Lipid Res* 50 Suppl, S255-259.
11. Arai, H., Koizumi, H., Aoki, J., and Inoue, K. (2002) Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), *J Biochem* 131, 635-640.
12. Tjoelker, L. W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H. L., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., and Gray, P. W. (1995) Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad, *J. Biol. Chem.* 270, 25481-25487.
13. Verheij, H. M., Slotboom, A. J., and De Haas, G. (1981) Structure and function of phospholipase A2, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91, 91-203.
14. Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E. P., Tizard, R., and Pepinsky, R. B. (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 264, 5768-5775.
15. Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J. A., Kloss, J., and Johnson, L. K. (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 264, 5335-5338.
16. Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., and Tischfield, J. A. (1994) Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 269, 2365-2368.
17. Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) On the diversity of secreted phospholipases A2. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes, *J. Biol. Chem.* 274, 31195-31202.
18. Valentin, E., Koduri, R. S., Scimeca, J.-C., Carle, G., Gelb, M. H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) Cloning and recombinant expression of a novel mouse secreted phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 274, 19152-19160.
19. Seilhamer, J. J., Randall, T. L., Johnson, L. K., Heinzmann, C., Klisak, I., Sparkes, R. S., and Lusic, A. J. (1989) Novel gene exon homologous to pancreatic phospholipase A2: sequence and chromosomal mapping of both human genes, *J. Cell. Biochem.* 39, 327-337.
20. Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., and Tischfield, J. A. (1994) Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A2, *Biochim. Biophys. Acta* 1215, 115-120.
21. Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kawamoto, K., Fujii, N., Arita, H., and Hanasaki, K. (1999) Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipases A2, *J. Biol. Chem.* 274, 24973-24979.
22. Valentin, E., Singer, A. G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., Gelb, M. H., and Lambeau, G. (2000) Cloning and recombinant expression of human group IIF secreted phospholipase A2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 223-228.

-
-
23. Krizaj, I., Faure, G., Gubensek, F., and Bon, C. (1997) Neurotoxic phospholipases A2 ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ, *Biochemistry* 36, 2779-2787.
 24. Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (2000) Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme, *J. Biol. Chem.* 275, 7492-7496.
 25. Murakami, M., Masuda, S., Shimbara, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2005) Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 280, 24987-24998.
 26. Six, D. A., and Dennis, E. A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization, *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 1-19.
 27. Cupillard, L., Koumanov, K., Mattéi, M. G., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1997) Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 272, 15745-15752.
 28. Hanasaki, K., Ono, T., Saiga, A., Morioka, Y., Ikeda, M., Kawamoto, K., Higashino, K., Nakano, K., Yamada, K., Ishizaki, J., and Arita, H. (1999) Purified group X secretory phospholipase A2 induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells, *J. Biol. Chem.* 274, 34203-34211.
 29. Gelb, M. H., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (2000) Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 275, 39823-39826.
 30. Rouault, M., Bollinger, J. G., Lazdunski, M., Gelb, M. H., and Lambeau, G. (2003) Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity, *Biochemistry* 42, 11494-11503.
 31. Verpy, E., Leibovici, M., and Petit, C. (1999) Characterization of otoconin-95, the major protein of murine otoconia, provides insights into the formation of these inner ear biominerals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 529-534.
 32. Wang, Y., Kowalski, P. E., Thalmann, I., Ornitz, D. M., Mager, D. L., and Thalmann, R. (1998) Otoconin-90, the mammalian otoconial matrix protein, contains two domains of homology to secretory phospholipase A2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 15345-15350.
 33. Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D., and Jain, M. K. (2001) Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm, *Chem Rev* 101, 2613-2654.
 34. Winget, J. M., Pan, Y. H., and Bahnson, B. J. (2006) The interfacial binding surface of phospholipase A2s, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1260-1269.
 35. Verger, R., and De Haas, G. H. (1973) Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers, *Chem Phys Lipids* 10, 127-136.
 36. Singer, A. G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G., and Gelb, M. H. (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2, *J. Biol. Chem.* 277, 48535-48549.
 37. Bezzine, S., Koduri, R. S., Valentin, E., Murakami, M., Kudo, I., Ghomashchi, F., Sadilek, M., Lambeau, G., and Gelb, M. H. (2000) Exogenously added human group X secreted phospholipase A2 but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 275, 3179-3191.
 38. Singh, D. K., and Subbaiah, P. V. (2007) Modulation of the activity and arachidonic acid selectivity of group X secretory phospholipase A2 by sphingolipids, *J. Lipid Res.* 48, 683-692.
 39. Kuksis, A., and Pruzanski, W. (2008) Phase composition of lipoprotein SM/cholesterol/PtdCho affects FA specificity of sPLA2s, *J. Lipid Res.* 49, 2161-2168.
 40. Baker, S. F., Othman, R., and Wilton, D. C. (1998) Tryptophan-containing mutant of human (group IIa) secreted phospholipase A2 has a dramatically increased ability to hydrolyze phosphatidylcholine vesicles and cell membranes, *Biochemistry* 37, 13203-13211.
 41. Han, S. K., Kim, K. P., Koduri, R., Bittova, L., Munoz, N. M., Leff, A. R., Wilton, D. C., Gelb, M. H., and Cho, W. (1999) Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 274, 11881-11888.
 42. Bezzine, S., Bollinger, J. G., Singer, A. G., Veatch, S. L., Keller, S. L., and Gelb, M. H. (2002) On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids, *J. Biol. Chem.* 277, 48523-48534.
 43. Koduri, R. S., Baker, S. F., Snitko, Y., Han, S. K., Cho, W., Wilton, D. C., and Gelb, M. H. (1998) Action of human group IIa secreted phospholipase A2 on cell membranes. Vesicle but not heparinoid binding determines rate of fatty acid release by exogenously added enzyme, *J. Biol. Chem.* 273, 32142-32153.

-
-
44. Gelb, M. H., Jain, M. K., and Berg, O. G. (1994) Inhibition of phospholipase A2, *FASEB J.* 8, 916-924.
 45. Reid, R. C. (2005) Inhibitors of secretory phospholipase A2 group IIA, *Curr. Med. Chem.* 12, 3011-3026.
 46. Oslund, R. C., Cermak, N., and Gelb, M. H. (2008) Highly specific and broadly potent inhibitors of mammalian secreted phospholipases A2, *J. Med. Chem.* 51, 4708-4714.
 47. Balsinde, J., Bianco, I. D., Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E. A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 8527-8531.
 48. Dal Piaz, F., Casapullo, A., Randazzo, A., Riccio, R., Pucci, P., Marino, G., and Gomez-Paloma, L. (2002) Molecular basis of phospholipase A2 inhibition by petrosaspongiolide M, *Chembiochem* 3, 664-671.
 49. Reynolds, L. J., Mihelich, E. D., and Dennis, E. A. (1991) Inhibition of venom phospholipases A2 by manoolide and manoolide analogue. Stoichiometry of incorporation, *J. Biol. Chem.* 266, 16512-16517.
 50. Schevitz, R. W., Bach, N. J., Carlson, D. G., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Dillard, R. D., Draheim, S. E., Hartley, L. W., Jones, N. D., Mihelich, E. D., and et al. (1995) Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A2, *Nat. Struct. Biol.* 2, 458-465.
 51. Snyder, D. W., Bach, N. J., Dillard, R. D., Draheim, S. E., Carlson, D. G., Fox, N., Roehm, N. W., Armstrong, C. T., Chang, C. H., Hartley, L. W., Johnson, L. M., Roman, C. R., Smith, A. C., Song, M., and Fleisch, J. H. (1999) Pharmacology of LY315920/S-5920, [[3-(aminooxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl]oxy] acetate, a potent and selective secretory phospholipase A2 inhibitor: A new class of anti-inflammatory drugs, SPI, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1117-1124.
 52. Eron, J. J., Yetzer, E. S., Ruane, P. J., Becker, S., Sawyer, G. A., Fisher, R. L., Tolson, J. M., and Shaefer, M. S. (2000) Efficacy, safety, and adherence with a twice-daily combination lamivudine/zidovudine tablet formulation, plus a protease inhibitor, in HIV infection, *AIDS* 14, 671-681.
 53. Rosenson, R. S. (2009) Future role for selective phospholipase A2 inhibitors in the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 93-101.
 54. Smart, B. P., Pan, Y. H., Weeks, A. K., Bollinger, J. G., Bahnson, B. J., and Gelb, M. H. (2004) Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A(2) by indole analogues: a structure-guided study, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 1737-1749.
 55. Pan, Y. H., Yu, B. Z., Singer, A. G., Ghomashchi, F., Lambeau, G., Gelb, M. H., Jain, M. K., and Bahnson, B. J. (2002) Crystal structure of human group X secreted phospholipase A2. Electrostatically neutral interfacial surface targets zwitterionic membranes, *J. Biol. Chem.* 277, 29086-29093.
 56. Smart, B. P., Oslund, R. C., Walsh, L. A., and Gelb, M. H. (2006) The first potent inhibitor of Mammalian group X secreted phospholipase A2: elucidation of sites for enhanced binding, *J. Med. Chem.* 49, 2858-2860.
 57. Muller, P., Lena, G., Boilard, E., Bezzine, S., Lambeau, G., Guichard, G., and Rognan, D. (2006) In silico-guided target identification of a scaffold-focused library: 1,3,5-triazepan-2,6-diones as novel phospholipase A2 inhibitors, *J. Med. Chem.* 49, 6768-6778.
 58. Karakas, M., and Koenig, W. (2009) Varespladib methyl, an oral phospholipase A2 inhibitor for the potential treatment of coronary artery disease, *IDrugs* 12, 585-592.
 59. Suckling, K. E. (2009) Phospholipase A2 inhibitors in the treatment of atherosclerosis: a new approach moves forward in the clinic, *Expert Opin Investig Drugs.*
 60. Wery, J. P., Schevitz, R. W., Clawson, D. K., Bobbitt, E. R., Dow, E. R., Gamboa, G., Goodson, T., Hermann, J., R. B., Kramer, R. M., McClure, D. B., Michelich, E. D., Putnam, J. E., Sharp, J. D., Stark, D. H., Teater, C., Warrick, M. W., and Jones, N. D. (1991) Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 at 2.2 Å resolution, *Nature* 352, 79-82.
 61. Cupillard, L., Mulherkar, R., Gomez, N., Kadam, S., Valentin, E., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) Both group IB and group IIA secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor, *J. Biol. Chem.* 274, 7043-7051.
 62. Morioka, Y., Saiga, A., Yokota, Y., Suzuki, N., Ikeda, M., Ono, T., Nakano, K., Fujii, N., Ishizaki, J., Arita, H., and Hanasaki, K. (2000) Mouse group X secretory phospholipase A2 induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A2 receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 31-42.
 63. Tremblay, N. M., Kennedy, B. P., Street, I. P., Kaupp, W. J., Laliberte, F., and Weech, P. K. (1993) Human group II phospholipase A2 expressed in *Trichoplusia ni* larvae--isolation and kinetic properties of the enzyme, *Protein Expr. Purif.* 4, 490-498.

-
-
64. van den Bergh, C. J., Bekkers, A. C., De Geus, P., Verheij, H. M., and de Haas, G. H. (1987) Secretion of biologically active porcine phospholipase A2 by *Saccharomyces cerevisiae*. Use of the prepro sequence of the alpha-mating factor, *Eur. J. Biochem.* 170, 241-246.
 65. Lefkowitz, L. J., Deems, R. A., and Dennis, E. A. (1999) Expression of group IA phospholipase A2 in *Pichia pastoris*: identification of a phosphatidylcholine activator site using site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 38, 14174-14184.
 66. Hackeng, T. M., Mounier, C. M., Bon, C., Dawson, P. E., Griffin, J. H., and Kent, S. (1997) Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7845-7850.
 67. Dong, C. Z., Romieu, A., Mounier, C. M., Heymans, F., Roques, B. P., and Godfroid, J. J. (2002) Total Direct Chemical Synthesis and Biological Activities of Human Group IIA Secretory Phospholipase A2, *Biochem. J.* 365, 505-511.
 68. De Geus, P., Van Den Bergh, C. J., Kuipers, O., Verheij, H. M., Hoekstra, W. P., and De Haas, G. H. (1987) Expression of porcine pancreatic phospholipase A2. Generation of active enzyme by sequence-specific cleavage of a hybrid protein from *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.* 15, 3743-3759.
 69. Hodgson, D., Gasparini, S., Drevet, P., Ducancel, F., Bouet, F., Boulain, J. C., Harris, J. B., and Menez, A. (1993) Production of recombinant notechis 11'2L, an enzymatically active mutant of a phospholipase A2 from *Notechis scutatus scutatus* venom, as directly generated by cleavage of a fusion protein produced in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 212, 441-446.
 70. Othman, R., Baker, S., Li, Y., Worrall, A. F., and Wilton, D. C. (1996) Human non-pancreatic (group II) secreted phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*: characterisation of N-terminal mutants, *Biochim. Biophys. Acta* 1303, 92-102.
 71. Han, S. K., Yoon, E. T., and Cho, W. (1998) Bacterial expression and characterization of human secretory class V phospholipase A2, *Biochem. J.* 331, 353-357.
 72. Rouault, M., Rash, L. D., Escoubas, P., Boilard, E., Bollinger, J., Lomonte, B., Maurin, T., Guillaume, C., Canaan, S., Deregnaucourt, C., Schrevel, J., Doglio, A., Gutierrez, J. M., Lazdunski, M., Gelb, M. H., and Lambeau, G. (2006) Neurotoxicity and Other Pharmacological Activities of the Snake Venom Phospholipase A2 OS2: The N-Terminal Region Is More Important Than Enzymatic Activity, *Biochemistry* 45, 5800-5816.
 73. Rouault, M., Le Calvez, C., Boilard, E., Surrel, F., Singer, A., Ghomashchi, F., Bezzine, S., Scarzello, S., Bollinger, J., Gelb, M. H., and Lambeau, G. (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor, *Biochemistry* 46, 1647-1662.
 74. Kini, R. M. (2003) Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes, *Toxicon* 42, 827-840.
 75. Lomonte, B., Angulo, Y., Sasa, M., and Gutierrez, J. M. (2009) The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles, *Protein Pept Lett* 16, 860-876.
 76. Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., and Lazdunski, M. (1989) Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the Taipan venom, *J. Biol. Chem.* 264, 11503-11510.
 77. Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1990) Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 265, 9526-9532.
 78. Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2, *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 162-170.
 79. Lambeau, G., Barhanin, J., and Lazdunski, M. (1991) Identification of different receptor types for toxic phospholipases A2 in rabbit skeletal muscle, *FEBS Lett.* 293, 29-33.
 80. Ancian, P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1995) Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2, *Biochemistry* 34, 13146-13151.
 81. Nicolas, J.-P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1995) Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180 kDa membrane receptor, *J. Biol. Chem.* 270, 28869-28873.
 82. Zvaritch, E., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1996) Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2, *J. Biol. Chem.* 271, 250-257.
 83. Ancian, P., Lambeau, G., Mattéi, M. G., and Lazdunski, M. (1995) The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization, *J. Biol. Chem.* 270, 8963-8970.
 84. Hanasaki, K., and Arita, H. (2002) Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 68-69, 71-82.

-
-
85. Silliman, C. C., Moore, E. E., Zallen, G., Gonzalez, R., Johnson, J. L., Elzi, D. J., Meng, X., Hanasaki, K., Ishizaki, J., Arita, H., Ao, L., England, K. M., and Banerjee, A. (2002) Presence of the M-type sPLA2 receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283, C1102-1113.
 86. Granata, F., Petraroli, A., Boilard, E., Bezzine, S., Bollinger, J., Del Vecchio, L., Gelb, M. H., Lambeau, G., Marone, G., and Triggiani, M. (2005) Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor, *J. Immunol.* 174, 464-474.
 87. Augert, A., Payre, C., de Launoit, Y., Gil, J., Lambeau, G., and Bernard, D. (2009) The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway, *EMBO Rep.* 10, 271-277.
 88. Rys-Sikora, K. E., Konger, R. L., Schoggins, J. W., Malaviya, R., and Pentland, A. P. (2000) Coordinate expression of secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in activated human keratinocytes, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278, C822-833.
 89. Scott, G. A., Jacobs, S. E., and Pentland, A. P. (2006) sPLA(2)-X Stimulates Cutaneous Melanocyte Dendricity and Pigmentation Through a Lysophosphatidylcholine-Dependent Mechanism, *J. Invest. Dermatol.* 126, 855-861.
 90. Fayard, J. M., Tessier, C., Pageaux, J. F., Lagarde, M., and Laugier, C. (1998) Nuclear location of PLA2-I in proliferative cells, *J. Cell. Sci.* 111, 985-994.
 91. Yokota, Y., Notoya, M., Higashino, K., Ishimoto, Y., Nakano, K., Arita, H., and Hanasaki, K. (2001) Clearance of group X secretory phospholipase A2 via mouse phospholipase A2 receptor, *FEBS Lett.* 509, 250-254.
 92. Murakami, M., Koduri, R. S., Enomoto, A., Shimbara, S., Seki, M., Yoshihara, K., Singer, A., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lambeau, G., Gelb, M. H., and Kudo, I. (2001) Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipases A2 in fibroblastic and mastocytoma cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms, *J. Biol. Chem.* 276, 10083-10096.
 93. Mounier, C. M., Hackeng, T. M., Schaeffer, F., Faure, G., Bon, C., and Griffin, J. H. (1998) Inhibition of prothrombinase by human secretory phospholipase A2 involves binding to factor Xa, *J. Biol. Chem.* 273, 23764-23772.
 94. Mounier, C. M., Luchetta, P., Lecut, C., Koduri, R. S., Faure, G., Lambeau, G., Valentin, E., Singer, A., Ghomashchi, F., Beguin, S., Gelb, M. H., and Bon, C. (2000) Basic Residues of Human Group IIA Phospholipase A2 are important for Binding to Factor Xa and Prothrombinase Inhibition. Comparison with Other Mammalian Secreted Phospholipases A2, *Eur. J. Biochem.* 267, 4960-4969.
 95. Touqui, L., and Alaoui-El-Azher, M. (2001) Mammalian secreted phospholipases A2 and their pathophysiological significance in inflammatory diseases, *Curr. Mol. Med.* 1, 739-754.
 96. Kitsioulis, E., Nakos, G., and Lekka, M. E. (2009) Phospholipase A(2) subclasses in acute respiratory distress syndrome, *Biochim Biophys Acta.*
 97. Nakos, G., Kitsioulis, E., Hatzidaki, E., Koulouras, V., Touqui, L., and Lekka, M. E. (2005) Phospholipases A2 and platelet-activating-factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome, *Crit. Care Med.* 33, 772-779.
 98. Chabot, S., Koumanov, K., Lambeau, G., Gelb, M. H., Chignard, M., Whitsett, J. A., and Touqui, L. (2003) Inhibitory effects of surfactant protein A on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2, *J. Immunol.* 171, 995-1000.
 99. Hamaguchi, K., Kuwata, H., Yoshihara, K., Masuda, S., Shimbara, S., Oh-ishi, S., Murakami, M., and Kudo, I. (2003) Induction of distinct sets of secretory phospholipase A2 in rodents during inflammation, *Biochim. Biophys. Acta* 1635, 37-47.
 100. Eerola, L. I., Surrel, F., Nevalainen, T. J., Gelb, M. H., Lambeau, G., and Laine, V. J. (2006) Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 745-756.
 101. Kikawada, E., Bonventre, J. V., and Arm, J. P. (2007) Group V secretory PLA2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2alpha activation, *Blood* 110, 561-567.
 102. Henderson, W. R., Jr., Chi, E. Y., Bollinger, J. G., Tien, Y. T., Ye, X., Castelli, L., Rubtsov, Y. P., Singer, A. G., Chiang, G. K., Nevalainen, T., Rudensky, A. Y., and Gelb, M. H. (2007) Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model, *J. Exp. Med.* 204, 865-877.
 103. Hurley, B. P., and McCormick, B. A. (2008) Multiple roles of phospholipase A2 during lung infection and inflammation, *Infect. Immun.* 76, 2259-2272.

-
-
104. Piris-Gimenez, A., Paya, M., Lambeau, G., Chignard, M., Mock, M., Touqui, L., and Goossens, P. L. (2005) In vivo protective role of human group IIA phospholipase A2 against experimental anthrax, *J. Immunol.* 175, 6786-6791.
 105. Balestrieri, B., Maekawa, A., Xing, W., Gelb, M. H., Katz, H. R., and Arm, J. P. (2009) Group V secretory phospholipase A2 modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*, *J. Immunol.* 182, 4891-4898.
 106. Cormier, R. T., Hong, K. H., Halberg, R. B., Hawkins, T. L., Richardson, P., Mulherkar, R., Dove, W. F., and Lander, E. S. (1997) Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis, *Nat. Genet.* 17, 88-91.
 107. Scott, K. F., Graham, G. G., and Bryant, K. J. (2003) Secreted phospholipase A2 enzymes as therapeutic targets, *Expert Opin. Ther. Targets* 7, 427-440.
 108. Cummings, B. S. (2007) Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs, *Biochem. Pharmacol.* 74, 949-959.
 109. Koduri, R. S., Gronroos, J. O., Laine, V. J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T. J., and Gelb, M. H. (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2, *J. Biol. Chem.* 277, 5849-5857.
 110. Nevalainen, T. J., Graham, G. G., and Scott, K. F. (2008) Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review, *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 1-9.
 111. Fenard, D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J. C., Lazdunski, M., and Doglio, A. (1999) Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells., *J. Clin. Invest.* 104, 611-618.
 112. Deregnaucourt, C., and Schrevel, J. (2000) Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components, *J. Biol. Chem.* 275, 39973-39980.
 113. Leslie, C. C. (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 373-376.
 114. Bonventre, J. (2004) Cytosolic phospholipase A2alpha reigns supreme in arthritis and bone resorption, *Trends Immunol.* 25, 116-119.
 115. Kita, Y., Ohto, T., Uozumi, N., and Shimizu, T. (2006) Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1317-1322.
 116. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., and Shimizu, T. (1997) Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition, *Nature* 390, 618-622.
 117. Hegen, M., Sun, L., Uozumi, N., Kume, K., Goad, M. E., Nickerson-Nutter, C. L., Shimizu, T., and Clark, J. D. (2003) Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis, *J Exp Med* 197, 1297-1302.
 118. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kume, K., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2000) Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2, *Nat. Immunol.* 1, 42-46.
 119. Nakanishi, M., and Rosenberg, D. W. (2006) Roles of cPLA2alpha and arachidonic acid in cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1335-1343.
 120. Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M. V., Tischfield, J. A., and Kudo, I. (1998) The functions of five distinct mammalian phospholipase A2s in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipases A2 are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 273, 14411-14423.
 121. Murakami, M., Hara, N., Kudo, I., and Inoue, K. (1993) Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A2, *J. Immunol.* 151, 5675-5684.
 122. Murakami, M., Nakatani, Y., and Kudo, I. (1996) Type II secretory phospholipase A2 associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation, *J. Biol. Chem.* 271, 30041-30051.
 123. Kuwata, H., Nakatani, Y., Murakami, M., and Kudo, I. (1998) Cytosolic phospholipase A2 is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A2 that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in rat 3Y1 fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 273, 1733-1740.
 124. Mounier, C. M., Ghomashchi, F., Lindsay, M. R., James, S., Singer, A. G., Parton, R. G., and Gelb, M. H. (2004) Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A2 occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A2-alpha, *J. Biol. Chem.* 279, 25024-25038.
 125. Kim, Y. J., Kim, K. P., Han, S. K., Munoz, N. M., Zhu, X., Sano, H., Leff, A. R., and Cho, W. (2002) Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 277, 36479-36488.

-
-
126. Hernandez, M., Burillo, S. L., Sanchez Crespo, M. S., and Nieto, M. L. (1998) Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1, *J. Biol. Chem.* 273, 606-612.
 127. Huwiler, A., Staudt, G., Kramer, R. M., and Pfeilschifter, J. (1997) Cross-talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 257-272.
 128. Han, W. K., Sapirstein, A., Hung, C. C., Alessandrini, A., and Bonventre, J. V. (2003) Cross-talk between cPLA2a and sPLA2 in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells. sPLA2 regulates cPLA2a activity which is responsible for arachidonic acid release, *J. Biol. Chem.* 3, 3.
 129. Ruiperez, V., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2009) Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A2s, *J. Immunol.* 182, 3877-3883.
 130. Saiga, A., Uozumi, N., Ono, T., Seno, K., Ishimoto, Y., Arita, H., Shimizu, T., and Hanasaki, K. (2005) Group X secretory phospholipase A2 can induce arachidonic acid release and eicosanoid production without activation of cytosolic phospholipase A2 alpha, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 75, 79-89.
 131. Seilhamer, J. J., Randall, T. L., Yamanaka, M., and Johnson, L. K. (1986) Pancreatic phospholipase A2: isolation of the human gene and cDNAs from porcine pancreas and human lung, *DNA* 5, 519-527.
 132. Richmond, B. L., Boileau, A. C., Zheng, S., Huggins, K. W., Granholm, N. A., Tso, P., and Hui, D. Y. (2001) Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice, *Gastroenterology* 120, 1193-1202.
 133. Huggins, K. W., Boileau, A. C., and Hui, D. Y. (2002) Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E994-E1001.
 134. Labonte, E. D., Kirby, R. J., Schildmeyer, N. M., Cannon, A. M., Huggins, K. W., and Hui, D. Y. (2006) Group IB Phospholipase A2-Mediated Lysophospholipid Absorption Directly Contributes to Postprandial Hyperglycemia, *Diabetes* 55, 935-941.
 135. Hui, D., Cope, M., Labonte, E., Chang, H. T., Shao, J., Goka, E., Abousalham, A., Charmot, D., and Buysse, J. (2009) The phospholipase A inhibitor methyl indoxam suppresses diet-induced obesity and glucose intolerance in mice, *Br. J. Pharmacol.*
 136. Kerns, R. T., Kini, R. M., Stefansson, S., and Evans, H. J. (1999) Targeting of venom phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A(2) from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex, *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 107-113.
 137. Enomoto, A., Murakami, M., Valentin, E., Lambeau, G., Gelb, M. H., and Kudo, I. (2000) Redundant and segregated functions of granule-associated heparin-binding group II subfamily of secretory phospholipases A2 in the regulation of degranulation and prostaglandin D2 synthesis in mast cells, *J. Immunol.* 165, 4007-4014.
 138. Boilard, E., Rouault, M., Surrel, F., Le Calvez, C., Bezzine, S., Singer, A., Gelb, M. H., and Lambeau, G. (2006) Secreted phospholipase A2 inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor, *Biochemistry* 45, 13203-13218.
 139. Kudo, I., Murakami, M., Hara, S., and Inoue, K. (1993) Mammalian non-pancreatic phospholipases A2, *Biochim. Biophys. Acta.* 1170, 217-231.
 140. Minami, T., Tojo, H., Shinomura, Y., Matsuzawa, Y., and Okamoto, M. (1994) Increased group II phospholipase A(2) in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, *Gut* 35, 1593-1598.
 141. Hulkower, K. I., Wertheimer, S. J., Levin, W., Coffey, J. W., Anderson, C. M., Chen, T., DeWitt, D. L., Crowl, R. M., Hope, W. C., and Morgan, D. W. (1994) Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. Evidence for their roles in the production of prostaglandin E2, *Arthritis Rheum* 37, 653-661.
 142. Bowton, D. L., Seeds, M. C., Fasano, M. B., Goldsmith, B., and Bass, D. A. (1997) Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics, *Am J Respir Crit Care Med* 155, 421-425.
 143. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., and Kudo, I. (1997) Regulatory functions of phospholipase A2, *Crit. Rev. Immunol.* 17, 225-283.
 144. Koenig, W., Vossen, C. Y., Mallat, Z., Brenner, H., Benessiano, J., and Rothenbacher, D. (2009) Association between type II secretory phospholipase A2 plasma concentrations and activity and cardiovascular events in patients with coronary heart disease, *Eur. Heart J. in press.*
 145. Murakami, M., and Kudo, I. (2004) Secretory phospholipase A2, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1158-1164.
 146. Couturier, C., Brouillet, A., Couriaud, C., Koumanov, K., Bereziat, G., and Andreani, M. (1999) Interleukin 1beta induces type II-secreted phospholipase A(2) gene in vascular smooth muscle cells by

-
- a nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process, *J Biol Chem* 274, 23085-23093.
147. Massaad, C., Paradon, M., Jacques, C., Salvat, C., Bereziat, G., Berenbaum, F., and Olivier, J. L. (2000) Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors, *J Biol Chem* 275, 22686-22694.
 148. Nakano, T., and Arita, H. (1990) Enhanced expression of group II phospholipase A2 gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoid, *FEBS Lett.* 273, 23-26.
 149. Oka, S., and Arita, H. (1991) Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression, *J. Biol. Chem.* 266, 9956-9960.
 150. Peilot, H., Rosengren, B., Bondjers, G., and Hurt-Camejo, E. (2000) Interferon-gamma induces secretory group IIA phospholipase A2 in human arterial smooth muscle cells. Involvement of cell differentiation, STAT-3 activation, and modulation by other cytokines, *J. Biol. Chem.* 275, 22895-22904.
 151. Masuda, S., Murakami, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2005) Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A(2) enzymes in several human tissues, *Biochim. Biophys. Acta.*
 152. Grass, D. S., Felkner, R. H., Chiang, M. Y., Wallace, R. E., Nevalainen, T. J., Bennett, C. F., and Swanson, M. E. (1996) Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate, *J. Clin. Invest.* 97, 2233-2241.
 153. Sato, H., Taketomi, Y., Isogai, Y., Masuda, S., Kobayashi, T., Yamamoto, K., and Murakami, M. (2009) Group III secreted phospholipase A2 transgenic mice spontaneously develop inflammation, *Biochem. J. in press.*
 154. Curfs, D. M., Ghesquiere, S. A., Vergouwe, M. N., van der Made, I., Gijbels, M. J., Greaves, D. R., Verbeek, J. S., Hofker, M. H., and de Winther, M. P. (2008) Macrophage secretory phospholipase A2 group X enhances anti-inflammatory responses, promotes lipid accumulation, and contributes to aberrant lung pathology, *J. Biol. Chem.* 283, 21640-21648.
 155. Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., and Murakami, M. (2006) Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction, *J. Biol. Chem.* 281, 36420-36433.
 156. Kennedy, B. P., Payette, P., Mudgett, J., Vadas, P., Pruzanski, W., Kwan, M., Tang, C., Rancourt, D. E., and Cromlish, W. A. (1995) A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains, *J. Biol. Chem.* 270, 22378-22385.
 157. Satake, Y., Diaz, B. L., Balestrieri, B., Lam, B. K., Kanaoka, Y., Grusby, M. J., and Arm, J. P. (2004) Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption, *J Biol Chem* 279, 16488-16494.
 158. Arbibe, L., Koumanov, K., Vial, D., Rougeot, C., Faure, G., Havet, N., Longacre, S., Vargaftig, B. B., Bereziat, G., Voelker, D. R., Wolf, C., and Touqui, J. (1998) Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction, *J. Clin. Invest.* 102, 1152-1160.
 159. Furue, S., Mikawa, K., Nishina, K., Shiga, M., Ueno, M., Tomita, Y., Kuwabara, K., Teshirogi, I., Ono, T., Hori, Y., Matsukawa, A., Yoshinaga, M., and Obara, H. (2001) Therapeutic time-window of a group IIA phospholipase A2 inhibitor in rabbit acute lung injury: correlation with lung surfactant protection, *Crit. Care Med.* 29, 719-727.
 160. Yokota, Y., Hanasaki, K., Ono, T., Nakazato, H., Kobayashi, T., and Arita, H. (1999) Suppression of murine endotoxic shock by sPLA2 inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA2-independent mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 213-222.
 161. Bomalaski, J. S., Lawton, P., and Browning, J. L. (1991) Human extracellular recombinant phospholipase A2 induces an inflammatory response in rabbit joints, *J. Immunol.* 146, 3904-3910.
 162. Kakutani, M., Murakami, M., Okamoto, H., Kudo, I., and Inoue, K. (1994) Role of type II phospholipase A2 in the inflammatory process of carrageenan-induced pleurisy in rats, *FEBS Lett.* 339, 76-78.
 163. Murakami, M., Kudo, I., Nakamura, H., Yokoyama, Y., Mori, H., and Inoue, K. (1990) Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A2, *FEBS Lett.* 268, 113-116.
 164. von Allmen, C. E., Schmitz, N., Bauer, M., Hinton, H. J., Kurrer, M. O., Buser, R. B., Gwerder, M., Muntwiler, S., Sparwasser, T., Beerli, R. R., and Bachmann, M. F. (2009) Secretory phospholipase A2-IIID is an effector molecule of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 11673-11678.

-
-
165. Igarashi, A., Shibata, Y., Yamauchi, K., Osaka, D., Takabatake, N., Abe, S., Inoue, S., Kimura, T., Yamaguchi, Y., Ishizaki, J., Hanasaki, K., and Kubota, I. (2009) Gly80Ser polymorphism of phospholipase A2-III is associated with cytokine inducibility in A549 cells, *Respiration* 78, 312-321.
 166. Touqui, L., and Arbibe, L. (1999) A role for phospholipase A2 in ARDS pathogenesis, *Mol. Med. Today* 5, 244-249.
 167. Hallstrand, T. S., Chi, E. Y., Singer, A. G., Gelb, M. H., and Henderson, W. R., Jr. (2007) Secreted phospholipase A2 group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 1072-1078.
 168. Munoz, N. M., Meliton, A. Y., Arm, J. P., Bonventre, J. V., Cho, W., and Leff, A. R. (2007) Deletion of secretory group V phospholipase A2 attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice, *J. Immunol.* 179, 4800-4807.
 169. Triggiani, M., Giannattasio, G., Calabrese, C., Loffredo, S., Granata, F., Fiorello, A., Santini, M., Gelb, M. H., and Marone, G. (2009) Lung mast cells are a source of secreted phospholipases A2, *J Allergy Clin Immunol* 124, 558-565, 565 e551-553.
 170. Murakami, M., and Kudo, I. (2003) New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 431-436.
 171. Webb, N. R. (2005) Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis, *Curr. Opin. Lipidol.* 16, 341-344.
 172. Karabina, S. A., Brocheriou, I., Le Naour, G., Agrapart, M., Durand, H., Gelb, M., Lambeau, G., and Ninio, E. (2006) Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function, *Faseb J.* 20, 2547-2549.
 173. Rosengren, B., Jonsson-Rylander, A. C., Peilot, H., Camejo, G., and Hurt-Camejo, E. (2006) Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1301-1308.
 174. Kimura-Matsumoto, M., Ishikawa, Y., Komiyama, K., Tsuruta, T., Murakami, M., Masuda, S., Akasaka, Y., Ito, K., Ishiguro, S., Morita, H., Sato, S., and Ishii, T. (2008) Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development, *Atherosclerosis* 196, 81-91.
 175. Hurt-Camejo, E., Andersen, S., Standal, R., Rosengren, B., Sartipy, P., Stadberg, E., and Johansen, B. (1997) Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 300-309.
 176. Flood, C., Gustafsson, M., Pitas, R. E., Arnaboldi, L., Walzem, R. L., and Boren, J. (2004) Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 564-570.
 177. Ivandic, B., Castellani, L. W., Wang, X. P., Qiao, J. H., Mehrabian, M., Navab, M., Fogelman, A. M., Grass, D. S., Swanson, M. E., de Beer, M. C., de Beer, F., and Lusis, A. J. (1999) Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIA phospholipase A2, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1284-1290.
 178. Rosengren, B., Peilot, H., Umaerus, M., Jonsson-Rylander, A. C., Mattsson-Hulten, L., Hallberg, C., Cronet, P., Rodriguez-Lee, M., and Hurt-Camejo, E. (2006) Secretory phospholipase A2 group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1579-1585.
 179. Webb, N. R., Bostrom, M. A., Szilvassy, S. J., van der Westhuyzen, D. R., Daugherty, A., and de Beer, F. C. (2003) Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 263-268.
 180. Hanasaki, K., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Saiga, A., Ono, T., Ikeda, M., Notoya, M., Kamitani, S., and Arita, H. (2002) Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation, *J. Biol. Chem.* 277, 29116-29124.
 181. Pruzanski, W., Lambeau, G., Lazdunski, M., Cho, W., Kopilov, J., and Kuksis, A. (2005) Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A2, *Biochim. Biophys. Acta* 1736, 38-50.
 182. Gesquiere, L., Cho, W., and Subbiah, P. V. (2002) Role of group IIA and group V secretory phospholipases A(2) in the metabolism of lipoproteins. Substrate specificities of the enzymes and the regulation of their activities by sphingomyelin, *Biochemistry* 41, 4911-4920.
 183. Bostrom, M. A., Boyanovsky, B. B., Jordan, C. T., Wadsworth, M. P., Taatjes, D. J., de Beer, F. C., and Webb, N. R. (2007) Group v secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis: evidence from genetically altered mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 600-606.

-
-
184. Boyanovsky, B., Zack, M., Forrest, K., and Webb, N. R. (2009) The capacity of group V sPLA2 to increase atherogenicity of ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mouse LDL in vitro predicts its atherogenic role in vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 532-538.
 185. Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., and Murakami, M. (2008) Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis, *J. Biol. Chem.* 283, 33483-33497.
 186. Lee, C., Park, D. W., Lee, J., Lee, T. I., Kim, Y. J., Lee, Y. S., and Baek, S. H. (2006) Secretory phospholipase A2 induces apoptosis through TNF-alpha and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells, *Eur. J. Pharmacol.* 536, 47-53.
 187. Brueseke, T. J., and Bell, J. D. (2006) A new hat for an old enzyme: waste management, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1270-1279.
 188. Boilard, E., Bourgoin, S. G., Bernatchez, C., Poubelle, P. E., and Surette, M. E. (2003) Interaction of low molecular weight group IIA phospholipase A2 with apoptotic human T cells: role of heparan sulfate proteoglycans, *Faseb J.* 17, 1068-1080.
 189. Menschikowski, M., Hagelgans, A., Gussakovsky, E., Kostka, H., Paley, E. L., and Siegert, G. (2008) Differential expression of secretory phospholipases A2 in normal and malignant prostate cell lines: regulation by cytokines, cell signaling pathways, and epigenetic mechanisms, *Neoplasia* 10, 279-286.
 190. Saegusa, J., Akakura, N., Wu, C. Y., Hoogland, C., Ma, Z., Lam, K. S., Liu, F. T., Takada, Y. K., and Takada, Y. (2008) Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins alpha5beta3 and alpha4beta1 and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 283, 26107-26115.
 191. MacPhee, M., Chepenik, P. K., Liddel, A. R., Nelson, K. K., Siracusa, D. L., and Buchberg, M. A. (1995) The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the mom1 locus, a major modifier of Apc^{min}-induced intestinal neoplasia, *Cell* 81, 957-966.
 192. Papanikolaou, A., Wang, Q. S., Mulherkar, R., Bolt, A., and Rosenberg, D. W. (2000) Expression analysis of the group IIA secretory phospholipase A2 in mice with differential susceptibility to azoxymethane-induced colon tumorigenesis, *Carcinogenesis* 21, 133-138.
 193. Leung, S. Y., Chen, X., Chu, K. M., Yuen, S. T., Mathy, J., Ji, J., Chan, A. S., Li, R., Law, S., Troyanskaya, O. G., Tu, I. P., Wong, J., So, S., Botstein, D., and Brown, P. O. (2002) Phospholipase A2 group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 16203-16208.
 194. Aggarwal, A., Guo, D. L., Hoshida, Y., Yuen, S. T., Chu, K. M., So, S., Boussioutas, A., Chen, X., Bowtell, D., Aburatani, H., Leung, S. Y., and Tan, P. (2006) Topological and functional discovery in a gene coexpression meta-network of gastric cancer, *Cancer Res.* 66, 232-241.
 195. Dong, Q., Patel, M., Scott, K. F., Graham, G. G., Russell, P. J., and Sved, P. (2006) Oncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer, *Cancer Lett.* 240, 9-16.
 196. Mounier, C. M., Wendum, D., Greenspan, E., Flejou, J. F., Rosenberg, D. W., and Lambeau, G. (2008) Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate, *Br. J. Cancer* 98, 587-595.
 197. Menschikowski, M., Hagelgans, A., Kostka, H., Eisenhofer, G., and Siegert, G. (2008) Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of secreted phospholipase A2 expressions in Jurkat leukemia cells, *Neoplasia* 10, 1195-1203.
 198. Morioka, Y., Ikeda, M., Saiga, A., Fujii, N., Ishimoto, Y., Arita, H., and Hanasaki, K. (2000) Potential role of group X secretory phospholipase A2 in cyclooxygenase-2-dependent PGE2 formation during colon tumorigenesis, *FEBS Lett.* 487, 262-266.
 199. Tribler, L., Jensen, L. T., Jorgensen, K., Brunner, N., Gelb, M. H., Nielsen, H. J., and Jensen, S. S. (2007) Increased expression and activity of group IIA and X secretory phospholipase A2 in peritumoral versus central colon carcinoma tissue, *Anticancer Res.* 27, 3179-3185.
 200. Osterstrom, A., Dimberg, J., Fransen, K., and Soderkvist, P. (2002) Expression of cytosolic and group X secretory phospholipase A(2) genes in human colorectal adenocarcinomas, *Cancer Lett.* 182, 175-182.
 201. Takaku, K., Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T., and Taketo, M. M. (2000) Suppression of intestinal polyposis in ApcDelta 716 knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A2 gene, *J. Biol. Chem.* 275, 34013-34016.
 202. Surrel, F., Jemel, I., Boilard, E., Bollinger, J., Payré, C., Mounier, C., Talvinen, K. A., Laine, J. O., Nevalainen, T., Gelb, M. H., and Lambeau, G. (2009) Group X secreted phospholipase A2 stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators, *Molecular Pharmacology* in press.

-
-
203. Kim, H. J., Kim, K. S., Kim, S. H., Baek, S. H., Kim, H. Y., Lee, C., and Kim, J. R. (2009) Induction of cellular senescence by secretory phospholipase A2 in human dermal fibroblasts through an ROS-mediated p53 pathway, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *64*, 351-362.
 204. Collado, M., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2007) Cellular senescence in cancer and aging, *Cell* *130*, 223-233.
 205. Elsbach, P., Weiss, J., Franson, R. C., Beckerdite-Quagliata, S., Schneider, A., and Harris, L. (1979) Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. Observations on their relationship, *J. Biol. Chem.* *254*, 11000-11009.
 206. Ganz, T., and Weiss, J. (1997) Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia, *Semin. Hematol.* *34*, 343-354.
 207. Nevalainen, T. J., Aho, H. J., and Peuravuori, H. (1994) Secretion of group 2 phospholipase A2 by lacrimal glands, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *35*, 417-421.
 208. Qu, X. D., and Lehrer, R. I. (1998) Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears, *Infect. Immun.* *66*, 2791-2797.
 209. Saari, K. M., Aho, V., Paavilainen, V., and Nevalainen, T. J. (2001) Group II PLA(2) content of tears in normal subjects, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 318-320.
 210. Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L. M., Foreman, A., and Weiss, J. (1996) The potent anti-Staphylococcus aureus activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2, *J. Clin. Invest.* *97*, 250-257.
 211. Beers, S. A., Buckland, A. G., Koduri, R. S., Cho, W., Gelb, M. H., and Wilton, D. C. (2002) The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall, *J. Biol. Chem.* *277*, 1788-1793.
 212. Buckland, A. G., and Wilton, D. C. (2000) The antibacterial properties of secreted phospholipases A2, *Biochim. Biophys. Acta* *1488*, 71-82.
 213. Foreman-Wykert, A. K., Weinrauch, Y., Elsbach, P., and Weiss, J. (1999) Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria, *J. Clin. Invest.* *103*, 715-721.
 214. Koprivnjak, T., Peschel, A., Gelb, M. H., Liang, N. S., and Weiss, J. P. (2002) Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against Staphylococcus aureus, *J. Biol. Chem.* *277*, 47636-47644.
 215. Elsbach, P., Weiss, J., and Levy, O. (1994) Integration of antimicrobial host defenses: role of the bactericidal/permeability-increasing protein, *Trends Microbiol.* *2*, 324-328.
 216. Laine, V. J., Grass, D. S., and Nevalainen, T. J. (1999) Protection by group II phospholipase A2 against Staphylococcus aureus, *J. Immunol.* *162*, 7402-7408.
 217. Zallen, G., Moore, E. E., Johnson, J. L., Tamura, D. Y., Barkin, M., Stockinger, H., and Silliman, C. C. (1998) New mechanisms by which secretory phospholipase A2 stimulates neutrophils to provoke the release of cytotoxic agents, *Arch. Surg.* *133*, 1229-1233.
 218. Huhtinen, H. T., Gronroos, J. O., Gronroos, J. M., Uksila, J., Gelb, M. H., Nevalainen, T. J., and Laine, V. J. (2006) Antibacterial effects of human group IIA and group XIIA phospholipase A2 against Helicobacter pylori in vitro, *Apmis* *114*, 127-130.
 219. Fenard, D., Lambeau, G., Maurin, T., Lefebvre, J. C., and Doglio, A. (2001) A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of t-cell tropic hiv-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor, *Mol. Pharmacol.* *60*, 341-347.
 220. Kim, J. O., Chakrabarti, B. K., Guha-Niyogi, A., Louder, M. K., Mascola, J. R., Ganesh, L., and Nabel, G. J. (2007) Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2, *J. Virol.* *81*, 1444-1450.
 221. Mitsuishi, M., Masuda, S., Kudo, I., and Murakami, M. (2006) Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells, *Biochem. J.* *393*, 97-106.
 222. Mitsuishi, M., Masuda, S., Kudo, I., and Murakami, M. (2007) Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species, *Biochim. Biophys. Acta* *1771*, 1389-1396.
 223. Ishikawa, S., Uozumi, N., Shiibashi, T., Izumi, T., Fukayama, M., Shimizu, T., Watanabe, J., and Nogami, S. (2004) Short report: Lethal malaria in cytosolic phospholipase A2- and phospholipase A2IIA-deficient mice, *Am J Trop Med Hyg* *70*, 645-650.
 224. Vadas, P., Keystone, J., Stefanski, E., Scott, K., and Pruzanski, W. (1992) Induction of circulating group II phospholipase A2 expression in adults with malaria, *Infect. Immun.* *60*, 3928-3931.

-
-
225. Vadas, P., Taylor, T. E., Chimsuku, L., Goldring, D., Stefanski, E., Pruzanski, W., and Molyneux, M. E. (1993) Increased serum phospholipase A2 activity in Malawian children with falciparum malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 455-459.
 226. Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement, *Biochem J* 294 (Pt 1), 1-14.
 227. Singh, D. K., Gesquiere, L. R., and Subbaiah, P. V. (2007) Role of sphingomyelin and ceramide in the regulation of the activity and fatty acid specificity of group V secretory phospholipase A2, *Arch. Biochem. Biophys.* 459, 280-287.
 228. Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., and Matsumoto, K. (1991) Novel proliferative effect of phospholipase A2 in Swiss 3T3 cells via specific binding site, *J. Biol. Chem.* 266, 19139-19141.
 229. Haas, U., Podda, M., Behne, M., Gurrieri, S., Alonso, A., Furstenberger, G., Pfeilschifter, J., Lambeau, G., Gelb, M. H., and Kaszkin, M. (2005) Characterization and differentiation-dependent regulation of secreted phospholipases A in human keratinocytes and in healthy and psoriatic human skin, *J. Invest. Dermatol.* 124, 204-211.
 230. Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B. P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T. F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., Lambeau, G., Arm, J., Tischfield, J., Gelb, M. H., and Rubin, B. B. (2002) Groups IV, V and X phospholipases A2 in human neutrophils. Role in eicosanoid production and gram negative bacterial phospholipid hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 277, 5061-5073.
 231. Giannattasio, G., Lai, Y., Granata, F., Mounier, C. M., Nallan, L., Oslund, R., Leslie, C. C., Marone, G., Lambeau, G., Gelb, M. H., and Triggiani, M. (2009) Expression of phospholipases A2 in primary human lung macrophages Role of cytosolic phospholipase A2-alpha in arachidonic acid release and platelet activating factor synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 92-102.
 232. Seeds, M. C., Jones, K. A., Duncan Hite, R., Willingham, M. C., Borgerink, H. M., Woodruff, R. D., Bowton, D. L., and Bass, D. A. (2000) Cell-specific expression of group X and group V secretory phospholipases A(2) in human lung airway epithelial cells [In Process Citation], *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23, 37-44.
 233. Schadow, A., Scholz, K., Lambeau, G., Gelb, M. H., Furstenberger, G., Pfeilschifter, J., and Kaszkin, M. (2001) Characterization of group X phospholipase A2 as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA., *J. Invest. Dermatol.* 116, 31-39.
 234. Lindbom, J., Ljungman, A. G., Lindahl, M., and Tagesson, C. (2001) Expression of members of the phospholipase A2 family of enzymes in human nasal mucosa, *Eur. Respir. J.* 18, 130-138.
 235. Masuda, S., Murakami, M., Matsumoto, S., Eguchi, N., Urade, Y., Lambeau, G., Gelb, M. H., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2004) Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs, *Biochim. Biophys. Acta* 1686, 61-76.
 236. Fujioka, D., and Kugiyama, K. (2009) Novel insights of secretory phospholipase a(2) action in cardiology, *Trends Cardiovasc. Med.* 19, 100-103.
 237. Masuda, S., Murakami, M., Mitsuishi, M., Komiyama, K., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2005) Expression of secretory phospholipase A2 enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells, *Biochem. J.* 387, 27-38.
 238. Masuda, S., Murakami, M., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Arioka, M., and Kudo, I. (2005) Neuronal expression and neuritogenic action of group X secreted phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 280, 23203-23214.
 239. Kolko, M., Bruhn, T., Christensen, T., Lazdunski, M., Lambeau, G., Bazan, N. G., and Diemer, N. H. (1999) Secretory phospholipase A2 potentiates glutamate-induced rat striatal neuronal cell death in vivo, *Neurosci. Lett.* 274, 167-170.
 240. Yagami, T., Ueda, K., Asakura, K., Hata, S., Kuroda, T., Sakaeda, T., Takasu, N., Tanaka, K., Gemba, T., and Hori, Y. (2002) Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis, *Mol. Pharmacol.* 61, 114-126.
 241. Yagami, T., Ueda, K., Asakura, K., Hayasaki-Kajiwara, Y., Nakazato, H., Sakaeda, T., Hata, S., Kuroda, T., Takasu, N., and Hori, Y. (2002) Group IB secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis, *J. Neurochem.* 81, 449-461.
 242. Masuda, S., Murakami, M., Komiyama, K., Ishihara, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2005) Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells, *Febs J.* 272, 655-672.
 243. Miki, Y., Mukae, S., Murakami, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohki, H., Matsumoto, M., and Komiyama, K. (2007) Butyrate inhibits oral cancer cell proliferation and regulates expression of secretory phospholipase A2-X and COX-2, *Anticancer Res.* 27, 1493-1502.

-
-
244. Kolko, M., Christoffersen, N. R., Barreiro, S. G., and Bazan, N. G. (2004) Expression and location of mRNAs encoding multiple forms of secretory phospholipase A2 in the rat retina, *J. Neurosci. Res.* 77, 517-524.
 245. Kolko, M., Christoffersen, N. R., Barreiro, S. G., Miller, M. L., Pizza, A. J., and Bazan, N. G. (2006) Characterization and location of secretory phospholipase A2 groups IIE, V, and X in the rat brain, *J Neurosci Res* 83, 874-882.
 246. Menschikowski, M., Hagelgans, A., and Siegert, G. (2006) Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases?, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 79, 1-33.
 247. Triggiani, M., Granata, F., Frattini, A., and Marone, G. (2006) Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1289-1300.
 248. Solodkin-Szaingurten, I., Levy, R., and Hadad, N. (2007) Differential behavior of sPLA2-V and sPLA2-X in human neutrophils, *Biochim Biophys Acta* 1771, 155-163.
 249. Fujioka, D., Saito, Y., Kobayashi, T., Yano, T., Tezuka, H., Ishimoto, Y., Suzuki, N., Yokota, Y., Nakamura, T., Obata, J. E., Kanazawa, M., Kawabata, K., Hanasaki, K., and Kugiyama, K. (2008) Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice, *Circulation* 117, 2977-2985.
 250. Yeagle, P. L., Smith, F. T., Young, J. E., and Flanagan, T. D. (1994) Inhibition of membrane fusion by lysophosphatidylcholine, *Biochemistry* 33, 1820-1827.
 251. Gunther-Ausborn, S., and Stegmann, T. (1997) How lysophosphatidylcholine inhibits cell-cell fusion mediated by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus, *Virology* 235, 201-208.
 252. Guillaume, C., Jemel, I., Janvrin, P., Grellier, P., Schrével, J., Lambeau, G., and Deregnacourt, C. (2009) Anti-malarial properties of the full set of human secreted phospholipases A2 : potent effects of group IIF and X enzymes., *J. Lipid Res. in preparation.*
 253. Yu, B. Z., Pan, Y. H., Janssen, M. J., Bahnson, B. J., and Jain, M. K. (2005) Kinetic and structural properties of disulfide engineered phospholipase A2: insight into the role of disulfide bonding patterns, *Biochemistry* 44, 3369-3379.
 254. Ludescher, R. D., Johnson, I. D., Volwerk, J. J., de Haas, G. H., Jost, P. C., and Hudson, B. S. (1988) Rotational dynamics of the single tryptophan of porcine pancreatic phospholipase A2, its zymogen, and an enzyme/micelle complex. A steady-state and time-resolved anisotropy study, *Biochemistry* 27, 6618-6628.
 255. Funakoshi, A., Yamada, Y., Migita, Y., and Wakasugi, H. (1993) Simultaneous determinations of pancreatic phospholipase A2 and pro-phospholipase A2 in various pancreatic diseases, *Dig. Dis. Sci.* 38, 502-506.
 256. Rae, D., Beechey-Newman, N., Burditt, L., Sumar, N., and Hermon-Taylor, J. (1996) Activation of human granulocyte type 1-prophospholipase A2, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 219, 24-27.
 257. Nakano, T., Fujita, H., Kikuchi, N., and Arita, H. (1994) Plasmin converts pro-form of group I phospholipase A2 into receptor binding, active forms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 10-15.
 258. Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases, *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1111-1125.
 259. Miyata, S., Koshikawa, N., Higashi, S., Miyagi, Y., Nagashima, Y., Yanoma, S., Kato, Y., Yasumitsu, H., and Miyazaki, K. (1999) Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture, *J Biochem* 125, 1067-1076.
 260. Checler, F. (1999) Presenilins: multifunctional proteins involved in Alzheimer's disease pathology, *IUBMB Life* 48, 33-39.
 261. Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F., and Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis, *Trends Cell Biol* 9, 28-35.
 262. Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.
 263. Krysan, D. J., Rockwell, N. C., and Fuller, R. S. (1999) Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides, *J Biol Chem* 274, 23229-23234.
 264. Rholam, M., and Fahy, C. (2009) Processing of peptide and hormone precursors at the dibasic cleavage sites, *Cell Mol Life Sci* 66, 2075-2091.
 265. Izidoro, M. A., Gouvea, I. E., Santos, J. A., Assis, D. M., Oliveira, V., Judice, W. A., Juliano, M. A., Lindberg, I., and Juliano, L. (2009) A study of human furin specificity using synthetic peptides derived from natural substrates, and effects of potassium ions, *Arch Biochem Biophys* 487, 105-114.

-
-
266. Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins, *Biochem J* 327 (Pt 3), 625-635.
267. Chen, Y., Molloy, S. S., Thomas, L., Gambée, J., Bachinger, H. P., Ferguson, B., Zonana, J., Thomas, G., and Morris, N. P. (2001) Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7218-7223.
268. Basak, A. (2005) Inhibitors of proprotein convertases, *J Mol Med* 83, 844-855.
269. Scamuffa, N., Calvo, F., Chretien, M., Seidah, N. G., and Khatib, A. M. (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts, *FASEB J* 20, 1954-1963.
270. Bassi, D. E., Fu, J., Lopez de Cicco, R., and Klein-Szanto, A. J. (2005) Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression, *Mol Carcinog* 44, 151-161.
271. de Cicco, R. L., Bassi, D. E., Benavides, F., Conti, C. J., and Klein-Szanto, A. J. (2007) Inhibition of proprotein convertases: approaches to block squamous carcinoma development and progression, *Mol Carcinog* 46, 654-659.
272. Pal, P., Xi, H., Kaushal, R., Sun, G., Jin, C. H., Jin, L., Suarez, B. K., Catalona, W. J., and Deka, R. (2006) Variants in the HEPsin gene are associated with prostate cancer in men of European origin, *Hum Genet* 120, 187-192.
273. Planque, C., de Monte, M., Guyetant, S., Rollin, J., Desmazes, C., Panel, V., Lemarie, E., and Courty, Y. (2005) KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer, *Biochem Biophys Res Commun* 329, 1260-1266.
274. Page, M. J., and Di Cera, E. (2008) Serine peptidases: classification, structure and function, *Cell Mol Life Sci* 65, 1220-1236.
275. Lundwall, A., and Brattsand, M. (2008) Kallikrein-related peptidases, *Cell Mol Life Sci* 65, 2019-2038.
276. Thannhauser, T. W., Konishi, Y., and Scheraga, H. A. (1984) Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins, *Anal. Biochem.* 138, 181-188.
277. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
278. Yokota, Y., Higashino, K., Nakano, K., Arita, H., and Hanasaki, K. (2000) Identification of group X secretory phospholipase A2 as a natural ligand for mouse phospholipase A2 receptor, *FEBS Lett.* 478, 187-191.
279. Slotboom, A. J., and De Haas, G. (1975) Specific transformations at the N-terminal region of phospholipase A2, *Biochemistry* 14, 5394-5399.
280. Xu, W., Yi, L., Feng, Y., Chen, L., and Liu, J. (2009) Structural insight into the activation mechanism of human pancreatic pro-phospholipase A2, *J Biol Chem* 284, 16659-16666.
281. Cheng, H. Q., and Xu, G. J. (2004) The role of propeptide in the refolding of human group IB phospholipase A2, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36, 583-588.
282. Ohnishi, Y., Shioda, T., Nakayama, K., Iwata, S., Gotoh, B., Hamaguchi, M., and Nagai, Y. (1994) A furin-defective cell line is able to process correctly the gp160 of human immunodeficiency virus type 1, *J Virol* 68, 4075-4079.
283. Komada, M., Hatsuzawa, K., Shibamoto, S., Ito, F., Nakayama, K., and Kitamura, N. (1993) Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin, *FEBS Lett* 328, 25-29.
284. Traidej, M., Marquart, M. E., Caballero, A. R., Thibodeaux, B. A., and O'Callaghan, R. J. (2003) Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV. Importance of enzyme activity in autoprocessing and activation, *J Biol Chem* 278, 2549-2553.
285. Attalah, H. L., Wu, Y., Alaoui-El-Azher, M., Thouron, F., Koumanov, K., Wolf, C., Brochard, L., Harf, A., Delclaux, C., and Touqui, L. (2003) Induction of type-IIA secretory phospholipase A2 in animal models of acute lung injury, *Eur. Respir. J.* 21, 1040-1045.
286. Agassandian, M., Miakotina, O. L., Andrews, M., Mathur, S. N., and Mallampalli, R. K. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* and sPLA2 IB stimulate ABCA1-mediated phospholipid efflux via ERK-activation of PPARalpha-RXR, *Biochem J* 403, 409-420.
287. Gora, S., Perret, C., Jemel, I., Nicaud, V., Lambeau, G., Cambien, F., Ninio, E., Blankenberg, S., Tiret, L., and Karabina, S. A. (2009) Molecular and functional characterization of polymorphisms in the secreted phospholipase A2 group X gene: relevance to coronary artery disease, *J. Mol. Med.* 87, 723-733.
288. Adham, I. M., Nayernia, K., and Engel, W. (1997) Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization, *Mol Reprod Dev* 46, 370-376.
289. Liu, R. Z., Na, W. L., Zhang, H. G., Lin, Z. Y., Xue, B. G., and Xu, Z. G. (2008) Assessment of released acrosin activity as a measurement of the sperm acrosome reaction, *Asian J Androl* 10, 236-242.
290. Antaki, p., Guérette, P., Chapdelaine, A., and Roberts, K. D. (1989) Detection of pro-phospholipase A2 in human spermatozoa, *Biology of reproduction* 41, 241-246.

-
-
291. Guerette, P., Langlais, J., Antaki, P., Chapdelaine, A., and Roberts, K. D. (1988) Activation of phospholipase A2 of human spermatozoa by proteases, *Gamete Res.* 19, 203-214.
292. Lessig, J., Reibetanz, U., Arnhold, J., and Glander, H. J. (2008) Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A2 from human spermatozoa, *Asian J Androl* 10, 829-836.
293. Chock, S. P., Schmauder-Chock, E. A., Cordella-Miele, E., Miele, L., and Mukherjee, A. B. (1994) The localization of phospholipase A2 in the secretory granule, *Biochem. J.* 300, 619-622.
294. Limou, S., Coulonges, C., Foglio, M., Heath, S., Diop, G., Leclerc, S., Hirtzig, T., Spadoni, J. L., Therwath, A., Lambeau, G., Gut, I., and Zagury, J. F. (2008) Exploration of associations between phospholipase A2 gene family polymorphisms and AIDS progression using the SNPlextrade mark method, *Biomed. Pharmacother.* 62, 31-40.
295. Wootton, P. T., Arora, N. L., Drenos, F., Thompson, S. R., Cooper, J. A., Stephens, J. W., Hurel, S. J., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., Humphries, S. E., and Talmud, P. J. (2007) Tagging SNP haplotype analysis of the secretory PLA2-V gene, PLA2G5, shows strong association with LDL and oxLDL levels, suggesting functional distinction from sPLA2-IIA: results from the UDACS study, *Hum. Mol. Genet.* 16, 1437-1444.
296. Wootton, P. T., Drenos, F., Cooper, J. A., Thompson, S. R., Stephens, J. W., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., Humphries, S. E., and Talmud, P. J. (2006) Tagging-SNP haplotype analysis of the secretory PLA2IIa gene PLA2G2A shows strong association with serum levels of sPLA2IIa: results from the UDACS study, *Hum. Mol. Genet.* 15, 355-361.
297. Yanaru-Fujisawa, R., Matsumoto, T., Kukita, Y., Nakamura, S., Yao, T., Hayashi, K., and Iida, M. (2007) Impact of Phospholipase A2 group IIa gene polymorphism on phenotypic features of patients with familial adenomatous polyposis, *Dis Colon Rectum* 50, 223-231.
298. Takabatake, N., Sata, M., Inoue, S., Shibata, Y., Abe, S., Wada, T., Machiya, J., Ji, G., Matsuura, T., Takeishi, Y., Muramatsu, M., and Kubota, I. (2005) A novel polymorphism in secretory phospholipase A2-IIID is associated with body weight loss in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1097-1104.
299. Kinoshita, E., Handa, N., Hanada, K., Kajiyama, G., and Sugiyama, M. (1997) Activation of MAP kinase cascade induced by human pancreatic phospholipase A2 in a human pancreatic cancer cell line, *Febs Lett.* 407, 343-346.
300. Kim, J. W., and Hong, J. H. (2006) Synthesis and antiviral activity of novel phenyl branched apiosyl nucleosides, *Arch Pharm Res* 29, 464-468.
301. Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G., and Marone, G. (2005) Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 1000-1006.
302. Fourcade, O., Simon, M. F., Viode, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L., and Chap, H. (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells, *Cell* 80, 919-927.
303. Ramio, L., Rivera, M. M., Ramirez, A., Concha, I., Pena, A., Rigau, T., and Rodriguez-Gil, J. E. (2008) Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction, *Theriogenology* 69, 501-512.
304. Claria, J. (2006) Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators, *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 1, 369-382.
305. Levick, S. P., Loch, D. C., Taylor, S. M., and Janicki, J. S. (2007) Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation, *J. Immunol.* 178, 641-646.
306. Khanapure, S. P., Garvey, D. S., Janero, D. R., and Letts, L. G. (2007) Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers, *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 311-340.
307. Serhan, C. N., and Chiang, N. (2008) Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus, *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S200-215.

RESUMÉ

Les phospholipases A₂ constituent une superfamille de protéines comprenant au moins onze phospholipases A₂ sécrétées (sPLA₂) et douze phospholipases A₂ intracellulaires. Ces protéines catalysent l'hydrolyse des phospholipides en position sn-2, libérant un acide gras et un lysophospholipide. Elles contrôlent ainsi la production d'une variété de médiateurs lipidiques qui sont importants pour de multiples fonctions cellulaires (304-307) dans différents contextes physiologiques ou physiopathologiques (maladies inflammatoires et cancer). La sPLA₂ de groupe X a été clonée au laboratoire en 1997 et possède des propriétés moléculaires uniques. Son ARN messager est présent dans différents tissus, mais semble peu régulé par des stimuli proinflammatoires. L'enzyme est unique dans sa capacité à libérer des médiateurs lipidiques à partir des phospholipides cellulaires ou des lipoprotéines et possède aussi des propriétés antimicrobiennes variées. Un élément clé de la régulation fonctionnelle de la sPLA₂ de groupe X est vraisemblablement lié à la présence d'un propeptide dans sa partie N-terminale. Le lieu de la maturation protéolytique de la sPLA₂ de groupe X (dans la cellule avant sécrétion ou à l'extérieur après sécrétion du proenzyme), les protéases impliquées et la régulation de cette maturation dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques sont inconnus.

Le travail de cette thèse a permis de mieux comprendre comment peut s'effectuer la maturation de la sPLA₂ de groupe X et quels sont ses rôles physiologiques et physiopathologiques. Concernant la maturation, nos études *in vitro* sur protéines purifiées et en cellules transfectées (HEK293) ont permis de montrer qu'une protéase de type furine contribue de façon majeure à l'activation de l'enzyme, vraisemblablement au cours de sa sécrétion. Nos travaux suggèrent aussi qu'une maturation est possible par d'autres protéases et dans le milieu extracellulaire comme par exemple dans les cellules LOVO. Nous avons aussi tenté de mettre en évidence cette maturation dans des tissus murins dans certaines conditions physiologiques et physiopathologiques. Nous avons notamment trouvé que la sPLA₂-X était la sPLA₂ majeure présente dans l'acrosome des spermatozoïdes. Enfin nous avons observé un polymorphisme présent dans le propeptide de la sPLA₂ humaine qui conduit à la formation d'une protéine inactive et rapidement dégradée.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons montré que la forme active de la sPLA₂ de groupe X, mais pas son proenzyme était capable i) de stimuler la prolifération cellulaire dans un contexte de cancer colorectal, ii) d'exercer une action toxique contre le parasite de la malaria *P.falciparum* lors de l'infection de globules rouges humains, et iii) de contrôler la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris, avec un impact important sur le taux de fécondité dans des tests de fécondation *in vitro*.