

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
À L'OBTENTION DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
CÉLINE VAN THEMSCHE B.Sc.

PURIFICATION PARTIELLE DES PHOSPHOLIPASES A2 DE L'ÉPITHÉLIUM  
PIGMENTAIRE RÉTINIEN HUMAIN: IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION  
DE DEUX NOUVELLES PHOSPHOLIPASES A2 INTRACELLULAIRES ET D'UNE  
PHOSPHOLIPASE A2 SÉCRÉTÉE

NOVEMBRE 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mes parents, qui ont éveillé en moi la curiosité d'apprendre et de comprendre, qui les premiers m'ont inculqué le sens du travail bien fait et la persévérance et qui toujours m'encouragent et me soutiennent.

Je suis profondément reconnaissante envers la Dr Michèle Jacob, dont les travaux m'ont ouvert une belle voie de recherche. Sa supervision pendant les débuts de ma maîtrise et sa disponibilité par la suite pour me prodiguer de précieux conseils ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais remercier Hugo, Stéphanie P., Judith, Sonya, Philippe B., Eric, Stéphanie C., Caroline, Philippe D., Vicky et Marc-André, pour les agréables moments passés parmi eux.

Je désire enfin remercier mon superviseur de maîtrise, le Dr Christian Salesse, pour m'avoir offert la possibilité de faire partie de son équipe et de travailler sur un projet de recherche aussi intéressant; de plus, ses qualités de chercheur resteront pour moi une source d'inspiration tout au long de ma carrière.

## RÉSUMÉ

Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) jouent un rôle de premier ordre dans le maintien de la structure et, par voie de conséquence, de la fonction normale de la rétine. Le mauvais fonctionnement de la machinerie enzymatique cellulaire de l'EPR pourrait donc engendrer une incapacité de ce tissu à accomplir son rôle, pour ainsi contribuer ou même être directement à l'origine de certaines dystrophies rétinienne. Une équipe de chercheurs a récemment démontré la présence de deux nouveaux types de phospholipases A2 (PLA2) dans l'épithélium pigmentaire rétinien bovin: ces nouvelles enzymes semblent uniques à l'EPR, ce qui suggère qu'elles auraient un rôle spécifique à ce tissu et contribueraient donc au rôle global de l'EPR dans le maintien de la fonction rétinienne. La caractérisation des PLA2 de l'EPR chez l'humain ouvre donc une porte sur la compréhension de l'apparition et du développement de certaines pathologies rétinienne telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, qui rendent aveugle une importante proportion des gens âgés des pays occidentaux.

Le présent mémoire contient des évidences expérimentales qui soutiennent l'hypothèse stipulant que l'EPR humain contient des PLA2 qui lui sont spécifiques. En

effet, les résultats de la caractérisation des propriétés immunologiques et biochimiques des cellules de l'EPR humain démontrent que ces dernières contiennent deux nouvelles PLA2 intracellulaires, qui pourraient appartenir à une nouvelle classe ou groupe de PLA2 qu'il faudrait définir. De plus, les cellules de l'EPR humain sécrètent une phospholipase A2 dans le milieu extracellulaire; cette PLA2 appartiendrait à une classe bien connue de PLA2 et pourrait avoir une interaction directe avec d'autres cellules de la rétine. Des fonctions possibles des différentes PLA2 de l'EPR humain dans le maintien de la fonction normale de la rétine sont suggérées dans le dernier chapitre.

## TABLES DES MATIÈRES

Remerciements .....	i
Résumé .....	ii
Table des matières .....	iv
Liste des schémas .....	viii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations .....	xi

### CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1	Structure de l'œil .....	2
1.1.1	La rétine neurale .....	5
1.1.2	L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).....	10
1.1.2.1	La morphologie et la composition de l'EPR .....	10
1.1.2.2	Les fonctions des cellules de l'EPR .....	14
1.1.2.3	La dégénérescence maculaire liée à l'âge .....	18
1.2	Les phospholipases A2 .....	21
1.2.1	Les phospholipases A2 sécrétées (sPLA2) .....	24

1.2.2	La phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) .....	28
1.2.3	Les phospholipases A2 calcium-indépendantes (iPLA2) .....	30
1.2.4	Nouvelles PLA2 .....	32
1.3	Hypothèses de recherche .....	34
1.4	Objectifs de recherche .....	35
1.5	Références .....	36

## CHAPITRE 2: HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM SECRETES A

### PHOSPHOLIPASE A2 AND CONTAINS TWO NOVEL INTRACELLULAR

#### PHOSPHOLIPASES A2

2.1	Contribution des co-auteurs de l'article de ce mémoire .....	57
2.2	Abbreviations used .....	57
2.3	Synopsis .....	58
2.4	Introduction .....	59
2.5	Materials and methods .....	62
2.5.1	Materials .....	62
2.5.2	Dissection of human eyes and culture of human RPE cells .....	63
2.5.3	Preparation of hRPE-cytosol .....	65
2.5.4	Preparation of hRPE-growth medium .....	65

2.5.5	Measurement of PLA2 activity .....	66
2.5.6	Determination of phospholipase C activity using bf-TLC .....	66
2.5.7	Cation-exchange chromatography .....	67
2.5.8	Immunoblotting .....	67
2.5.9	Determination of protein concentration .....	69
2.6	Results and discussion .....	69
2.6.1	Release of fatty acids in hRPE-cytosol and hRPE-growth medium results from PLA2 activity .....	69
2.6.2	Cultured human RPE cells contain different PLA2-active fractions .....	72
2.6.3	Cultured human RPE cells secrete a PLA2 and contain two different PLA2 enzymes .....	74
2.6.4	Human RPE intracellular PLA2 enzymes are different from sPLA2s, cPLA2 and iPLA2s but share similarities with bovine RPE PLA2s .....	77
2.6.5	RPE secreted PLA2 enzyme shares partial sequence similarity with both group I and group II sPLA2s .....	78
2.7	Acknowledgements .....	84
2.8	References .....	85
2.9	Tables and Figures .....	90



## CHAPITRE 3: CONCLUSION

3.1	Récapitulation des résultats et conclusions .....	99
3.2	Rôles possibles des PLA2 intracellulaires de l'EPR .....	110
3.2.1	Implication des PLA2 de l'EPR dans le processus de déacylation- réacylation des phospholipides membranaires de l'EPR .....	111
3.2.2	Implication des PLA2 de l'EPR dans le processus d'inflammation oculaire ...	113
3.2.3	Implication des PLA2 de l'EPR dans la digestion lysosomiale des disques membranaires des segments externes des photorécepteurs et le recyclage des acides gras .....	115
3.3	Rôles possibles de la PLA2 sécrétée de l'EPR .....	118
3.3.1	Implication de la PLA2 sécrétée de l'EPR dans le processus de fusion membranaire lors de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR .....	118
3.4	Perspectives de recherche .....	121
3.5	Références .....	123

LISTE DES SCHÉMAS

1.1	Structure de l'œil .....	3
1.2	Organisation de la rétine .....	4
1.3	Structure des photorécepteurs (bâtonnets) .....	6
1.4	Mécanisme de phototransduction d'un bâtonnet .....	8
1.5	Structure d'une cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien .....	13
1.6	Schéma du mécanisme de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien .....	16
1.7	Schéma de l'activité phospholipase A2 .....	22

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Effects of pBPB, EGTA, DTT, heat and H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> on RPE-PLA2 activity .....	90
Tableau 2.2	Comparison between the biochemical properties of sPLA2, cPLA2, iPLA2, as well as human and bovine PLA2s .....	91
Tableau 2.3	Reactivity of RPE-PLA2s with different PLA2 antisera or a monoclonal PLA2 antibody .....	92

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Micrographie électronique de l'épithélium pigmentaire rétinien .....	11
Figure 2.1	Discrimination between PLA2 and PLC activity in hRPE-cytosol by bf-TLC .....	93
Figure 2.2	Discrimination between PLA2 and PLC activity in hRPE-growth medium by bf-TLC .....	94
Figure 2.3	Cation-exchange chromatography of hRPE-cytosol .....	95
Figure 2.4	Cation-exchange chromatography of hRPE-growth medium .....	96
Figure 2.5	Immunoblot analysis .....	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS

bf-TLC	chromatographie 'avant-arrière' sur couche mince
BpBP	bromure de para-bromophénol
DAG lipase	diacylglycerol lipase
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DTT	dithiothréitol
EPR	épithélium pigmentaire rétinien
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PI	phosphatidylinositol
PLA2	phospholipase A2
sPLA2	PLA2 sécrétée
cPLA2	PLA2 cytosolique
iPLA2	PLA2 $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante
PLC	phospholipase C
PS	phosphatidylsérine

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

### 1.1 Structure de l'œil

L'œil, tel qu'illustré sur le schéma 1.1, est le site du processus visuel et est composé de trois tuniques différentes (Spence et Mason, 1983; Ali et Klyne, 1986). La tunique fibreuse comprend la sclérotique, dont la grande rigidité permet de maintenir la forme de l'œil tout en protégeant les structures internes; elle comprend aussi la cornée, qui est formée d'une superposition de couches de cellules épithéliales et endothéliales et qui est totalement transparente, pouvant ainsi être traversée par les rayons lumineux. La tunique vasculaire est composée de la choroïde, un tissu fibreux très rigide parcouru par de nombreux vaisseaux sanguins qui lui confèrent une fonction nourricière; elle comprend aussi le corps ciliaire, qui contient surtout des muscles lisses qui contrôlent la forme du cristallin. Ce dernier, parfaitement transparent, peut être représenté par une lentille parce qu'il est déformable pour la focalisation de l'image. La tunique vasculaire comprend également l'iris, dont la composition variable en mélanine est à l'origine de la couleur des yeux. L'iris contient aussi des muscles lisses qui sont responsables de la contraction ou de la dilatation du cristallin; il assure également l'ouverture adéquate de la pupille (ouverture au centre de l'iris) en fonction de l'intensité lumineuse. La tunique interne comprend la rétine (illustrée sur le schéma 1.2), cette dernière étant subdivisée en deux parties: la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien.

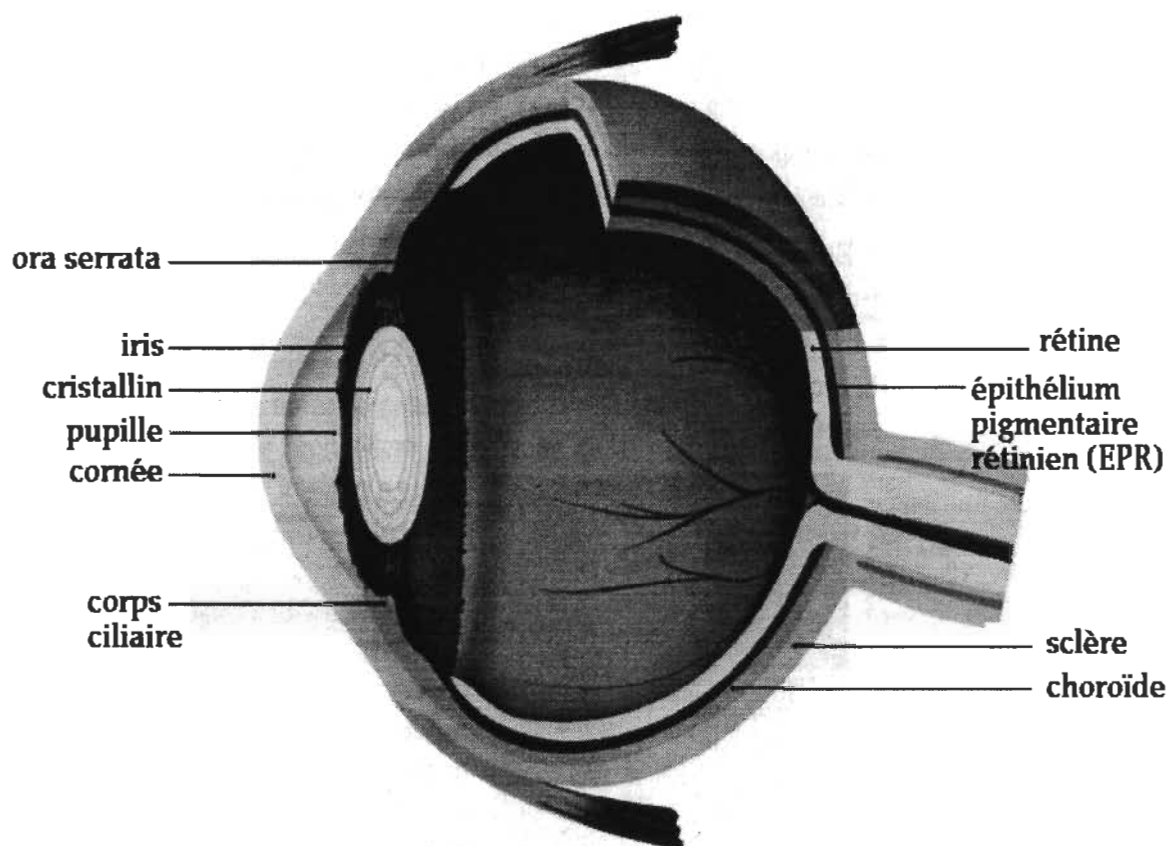


Schéma 1.1: Structure de l'oeil



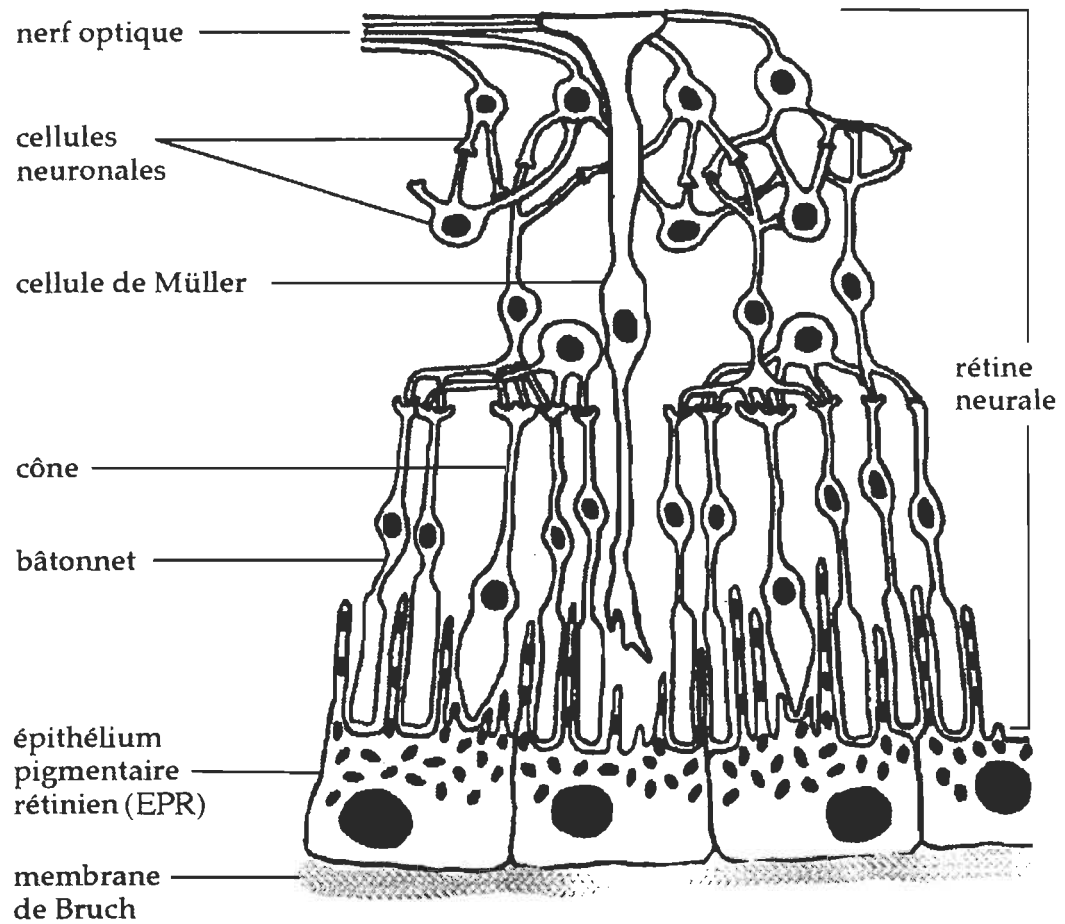


Schéma 1.2: Organisation de la rétine

### 1.1.1 La rétine neurale

Cette partie de la rétine est le site du processus visuel, où la lumière qui a pénétré l'œil est transformée en de multiples influx nerveux qui seront dirigés vers l'aire visuelle corticale, via le nerf optique. La rétine neurale comprend les cellules de Müller, qui parcourent la rétine neurale d'une extrémité à l'autre (schéma 1.2). Ces cellules gliales exercent un rôle de soutien, en étant responsables du transport de métabolites du système sanguin vers quatre types de cellules neuronales, soit les cellules bipolaires, horizontales, amacrines et ganglionnaires (schéma 1.2). La rétine neurale contient aussi deux types de cellules photoréceptrices, les cônes et les bâtonnets. Les photorécepteurs sont étroitement associés aux cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (voir schéma 1.2).

Les photorécepteurs sont responsables du processus de phototransduction, au cours duquel un signal lumineux est transformé en un signal électrique (influx nerveux). Ils sont composés d'un segment interne, qui contient les organites cellulaires, et d'un segment externe, composé d'un empilement de disques membranaires (schéma 1.3). Ces membranes discales comportent 50% de phospholipides et 50% de protéines (en poids sec); une protéine, la rhodopsine, qui est le pigment visuel, constitue 85% des protéines des disques membranaires (Krebs et Kühn, 1977). La rhodopsine est composée de deux éléments distincts: l'opsine, au sein de laquelle est situé le rétinol. Suite à l'absorption de lumière, le

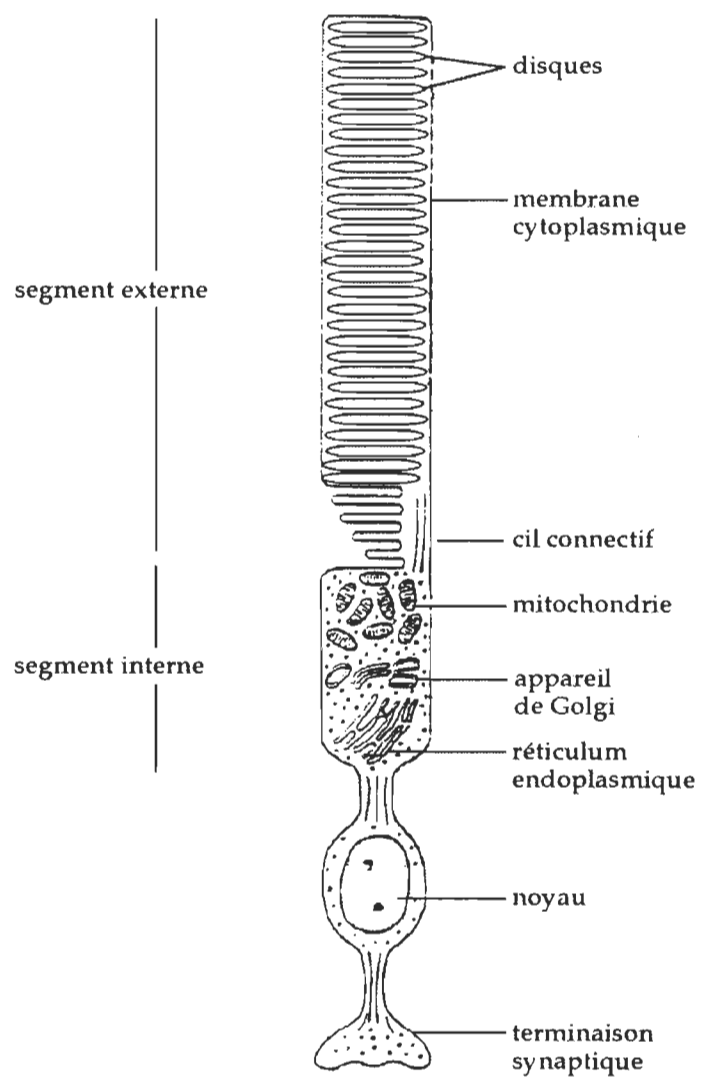


Schéma 1.3: Structure des photorécepteurs (bâtonnets)

chromophore 11-cis-rétinal est isomérisé sous forme de tout-trans-rétinal, ce qui déclenche une cascade d'événements cellulaires conduisant à l'hyperpolarisation des photorécepteurs (schéma 1.4) et à la génération d'un influx nerveux (pour une revue, voir Helmreich et Hofmann, 1996). Il est à noter que chaque molécule de rhodopsine ne peut absorber qu'un seul photon lumineux; la rhodopsine photoblanchie n'est plus fonctionnelle. Mentionnons enfin que les bâtonnets sont responsables de la vision à faible intensité lumineuse et permettent la perception visuelle en différentes teintes de gris, alors que les cônes fonctionnent à plus forte intensité lumineuse et permettent la perception des couleurs.

Les phospholipides constituant les disques membranaires des segments externes des photorécepteurs sont caractérisés par une composition particulièrement élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI); l'acide docosahexaénoïque (22:6 $\omega$ 3) compte pour plus de 50% de ce type d'acides gras (Salesse *et al.*, 1984). Puisque les acides gras polyinsaturés sont très susceptibles à la peroxydation (van Kuijk *et al.*, 1987), cette grande proportion d'AGPI rend les disques membranaires très vulnérables aux dommages reliés à la peroxydation lipidique, qui sont reconnus pour altérer la structure et la fonction membranaire. À cet égard, il a été démontré que la peroxydation lipidique entraîne une augmentation de l'anisotropie, de la microhétérogénéité et du désordre structural des phospholipides mem-

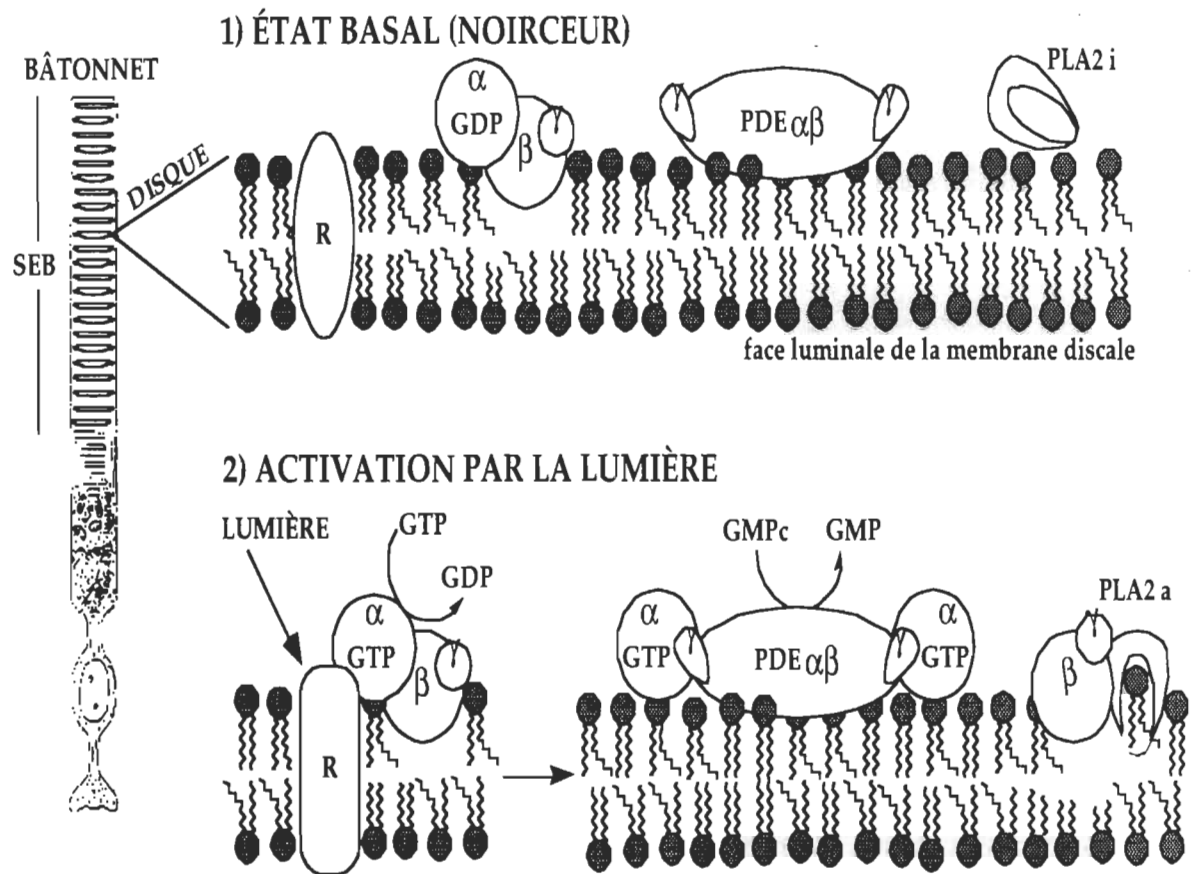


Schéma 1.4: Mécanisme de phototransduction d'un bâtonnet

branaires (Sevanian *et al.*, 1988; Wratten *et al.*, 1989); de plus, elle peut causer un changement de fluidité membranaire tel que des transitions de phase de l'état liquide cristallin à l'état gel (Coolbear et Keough, 1983). Parmi les fonctions membranaires importantes affectées par la peroxydation lipidique se trouvent la perte de l'activité du cytochrome P-450 du réticulum endoplasmique (Hogberg *et al.*, 1973) et de l'activité enzymatique impliquée dans le transport ionique, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire (Bartosz *et al.*, 1977).

Les segments externes des photorécepteurs sont caractérisés par une synthèse constitutive de nouveaux disques membranaires à leur extrémité basale (Young et Bok, 1969). Ce renouvellement rapide (Feeney, 1973) est nécessaire pour pallier à la dégradation de leur état fonctionnel, qui est engendrée par le photoblanchiment de la rhodopsine, de même que par la peroxydation probable des AGPI qui les composent. Young et Bok en 1969 ont démontré de façon fort élégante que, suite à leur synthèse, les nouveaux disques membranaires migrent vers l'extrémité distale des segments externes des photorécepteurs pour finalement être phagocytés par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Un équilibre essentiel entre la quantité de disques membranaires phagocytés à une extrémité des segments externes des photorécepteurs et la quantité de disques synthétisés

quotidiennement à l'autre extrémité permet de maintenir constante la longueur de ces derniers. Il a également été démontré que, suite à la digestion lysosomiale des disques phagocytés, certains de leurs éléments constitutifs sont retournés vers le segment interne des photorécepteurs (Gordon *et al.*, 1992; Chen et Anderson, 1993). Ainsi, l'acide docosahexaénoïque provenant de disques membranaires phagocytés est soumis à une telle boucle de recyclage, où il est retourné au segment interne des photorécepteurs pour être recyclé; les phospholipides ainsi formés migrent ensuite vers la portion basale des segments externes des photorécepteurs pour être incorporés dans de nouveaux disques membranaires en formation (Bazan *et al.*, 1992).

### 1.1.2 L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

#### 1.1.2.1 La morphologie et la composition de l'EPR

L'épithélium pigmentaire rétinien, qui est situé entre la choroïde et la rétine neurale (schéma 1.1), est constitué d'une monocouche de cellules (figure 1.1). La membrane apicale des cellules de l'EPR est riche en deux types de microvilli qui s'allongent dans l'espace entre les photorécepteurs (Hogan *et al.*, 1971). Ainsi, la majorité de la surface api-



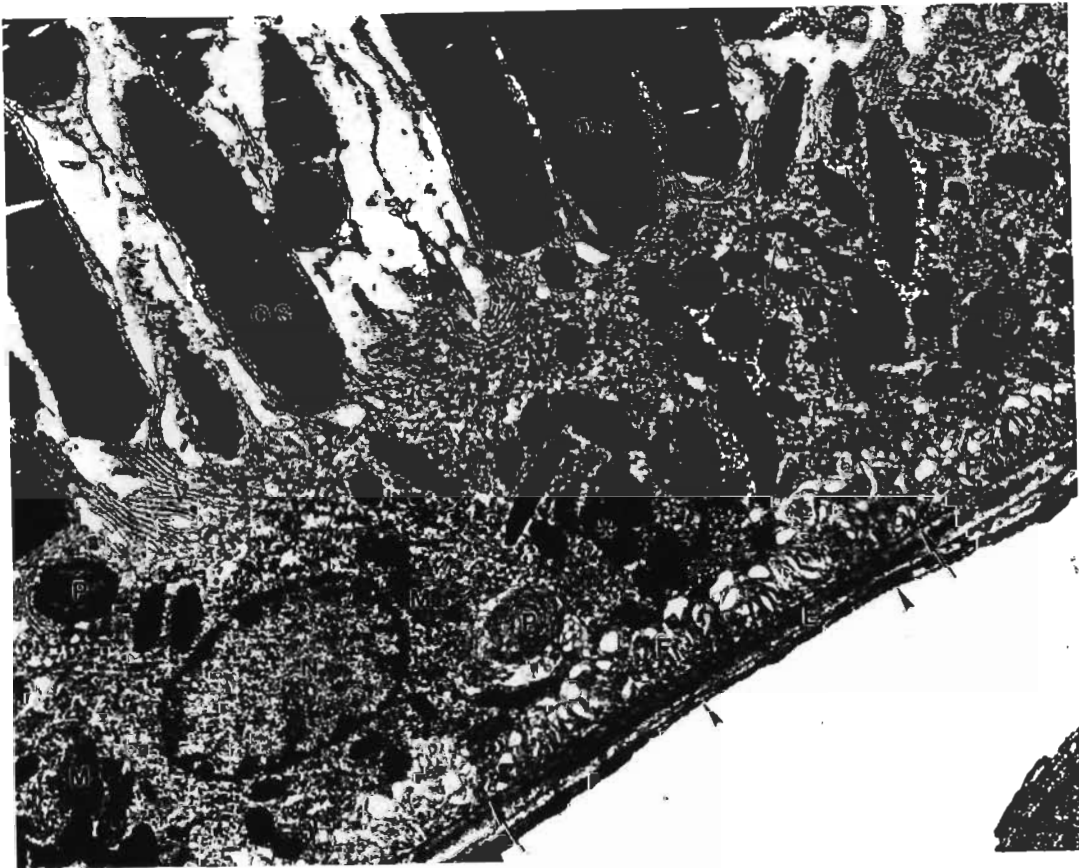


Figure 1.1: Micrographie électronique de l'épithélium pigmentaire rétinien.

(N), noyau; (F), membrane basale; (V), microvilli; (M), mitochondries; (P) phagosomes; (OS), segments externes des photorécepteurs; (E), membrane de Bruch de la choroïde; (\*), granules de mélanine; flèches larges, lame basale de l'EPR; têtes de flèches, choriocapillaires; flèches minces courtes, réticulum endoplasmique lisse; flèches minces longues, réticulum endoplasmique rugueux. Agrandissement: x13 200. (Tiré de Marmor et Wolfensberger, 1998).



cale est couverte de longs et minces microvilli (5 à 7  $\mu\text{m}$  de longueur) qui n'entrent pas en contact avec d'autres cellules. Une forme plus spécialisée de microvilli, d'une longueur de 3 à 4  $\mu\text{m}$ , est étroitement associée avec les segments externes des photorécepteurs alors qu'elle forme une véritable enveloppe autour de leur portion apicale. Ainsi, 30 à 50 segments externes des photorécepteurs sont associés à chaque cellule de l'EPR (Marmor et Wolfensberger, 1998). La membrane basale de chacune de ces dernières repose sur la lame basale de l'EPR, qui est mince et aplatie (0.3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) (Hogan *et al.*, 1971).

Les cellules de l'EPR possèdent une polarité morphologique et fonctionnelle: leurs différents organites et protéines membranaires sont distribués asymétriquement le long de l'axe apical-basal (Zinn et Benjamin-Henkind, 1979; Korte *et al.*, 1994). Tel qu'illustré dans le schéma 1.5, des granules de mélanine en forme de cigare et mesurant jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre et 2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur se retrouvent surtout dans la portion apicale et médiane des cellules. La mélanine exerce deux principaux rôles au sein des cellules de l'EPR, le premier étant l'absorption de l'excès des rayons lumineux qui pénètrent l'œil, pour ainsi prévenir la dégradation de l'image (Sarna, 1992). La mélanine a également la propriété d'absorber l'oxygène singulet, ce qui réduit les dommages oxydatifs que ce dernier inflige aux membranes organique et cellulaire de l'EPR (Ostrovsky *et al.*, 1987). L'asymétrie

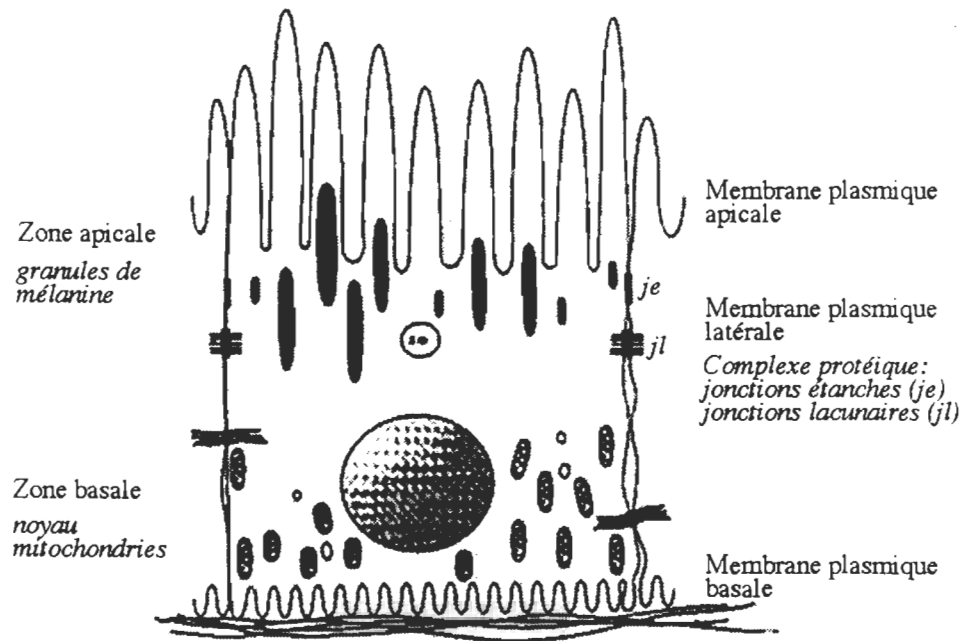


Schéma 1.5: Structure d'une cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien.  
(Tiré de Marmor et Wolfensberger, 1998).

dans la distribution des composantes cellulaires de l'EPR se manifeste aussi au niveau de leur noyau, qui est déplacé légèrement vers la base des cellules; enfin, plusieurs mitochondries occupent la portion basale des cellules (Boulton, 1991). Les portions apicale et basale des cellules de l'EPR sont séparées par une barrière de jonctions étanches. Ainsi, tel qu'illustré dans le schéma 1.5, la région apicale des parois latérales des cellules contient un complexe protéique composé d'un mélange de jonctions étanches et de jonctions lacunaires (Hudspeth et Yee, 1973). Alors que les jonctions lacunaires permettent aux petites molécules de diffuser d'une cellule vers ses voisines, les jonctions étanches contribuent à former une importante barrière de perméabilité appelée 'barrière sang-oculaire'. Cette barrière sélective contrôle le flot de nutriments qui se déplace des choriocapillaires vers les photorécepteurs et est donc responsable du maintien de la composition des fluides intracellulaires des photorécepteurs.

#### 1.1.2.2 Les fonctions des cellules de l'EPR

En plus de participer à la barrière sang-oculaire, les cellules de l'EPR exercent plusieurs fonctions importantes, dont celle de participer au métabolisme et à l'entreposage de la vitamine A (rétinol). Ainsi, une grande partie du rétinol (aldéhyde du rétinol) qui a été

photoblanchi lors du processus visuel est estérifiée et emmagasinée dans les cellules de l'EPR (Saari, 1987).

L'EPR, tel que mentionné dans la section 1.1.2.1, limite la dispersion intraoculaire des rayons lumineux et prévient la dégradation de l'image, par l'intermédiaire des pigments de mélanine qu'il contient. En outre, grâce à la présence de la barrière sang-oculaire qui a été décrite dans la section 1.1.2.1, l'EPR exerce une importante fonction de sélection des nutriments provenant des choriocapillaires qui peuvent diffuser vers les photorécepteurs. Les cellules de l'EPR exercent enfin un rôle essentiel au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la rétine en phagocytant la portion distale des segments externes des photorécepteurs; les cellules de l'EPR effectuent ensuite la digestion lysosomiale des disques membranaires ainsi ingérés, ce qui permet d'en récupérer certains constituants qui seront recyclés vers les photorécepteurs (tel que décrit dans la section 1.1.1).

Le mécanisme de la fonction phagocytaire de l'EPR a été divisé en 5 étapes (Matsumoto *et al.*, 1987) qui sont illustrées dans le schéma 1.6. On assiste en premier lieu à

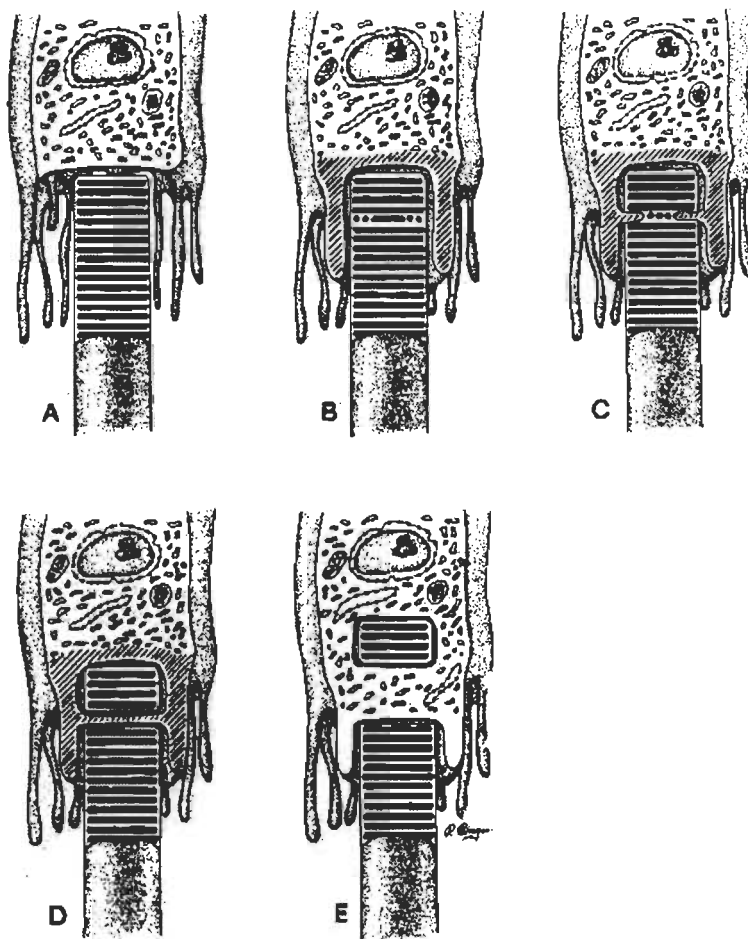


Schéma 1.6: Schéma du mécanisme de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

(A-D) L'extrémité distale des segments externes des photorécepteurs est enveloppée par des pseudopodes de l'EPR, qui disparaissent seulement après engouffrement complet des disques membranaires excisés. (E) Un phagosome est formé et migre vers les lysosomes cellulaires. (Tiré de Marmor et Wolfensberger, 1998).

l'attachement, médié par des récepteurs, des segments externes aux cellules de l'EPR. Il y a ensuite initiation de l'excision de l'extrémité distale des segments externes, suivie par l'élongation de pseudopodes des cellules de l'EPR, qui sont remplis de filaments d'actine, autour de l'empilement de disques en voie d'excision. En quatrième lieu, les pseudopodes entourent complètement l'extrémité distale des segments externes dont l'excision se termine. Enfin, le phagosome ainsi formé migre à l'intérieur des cellules de l'EPR avant de fusionner avec des lysosomes, pour former des phagolysosomes où les disques membranaires phagocytés seront soumis à l'action des enzymes hydrolytiques lysosomiales.

Il apparaît clairement que l'altération de la fonction phagocytaire ou encore de la fonction de digestion lysosomiale des cellules de l'EPR, entre autres, pourrait avoir des conséquences pathologiques importantes. Notoirement, l'EPR (avec la membrane de Bruch de la choroïde) est le site d'une grande partie des manifestations cliniques de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

### 1.1.2.3 La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La DMLA est depuis plusieurs années la plus grande cause de cécité chez les adultes occidentaux (Ferris *et al.*, 1984; Leibowitz *et al.*, 1980). En effet, la DMLA touche 3 à 5% des gens de 70 ans pour atteindre 10 à 25 % des individus à l'âge de 80 ans (Vingerling *et al.*, 1995). Le principal symptôme, qui apparaît généralement après l'âge de 50 ans, consiste en une dégradation du champ de vision central qui se répand graduellement vers les champs périphériques, menant souvent à une cécité complète à partir de l'âge de 70-80 ans (Friedman *et al.*, 1980). Cette condition est bilatérale, bien que les deux yeux puissent être affectés à un degré différent (Strahlman *et al.*, 1983). La DMLA est associée à des facteurs de risque environnementaux, suivant les observations de Evans et Wormald en 1996 et de Bird en 1997 démontrant que son incidence augmente indépendamment de l'augmentation de la moyenne d'âge de la population. La DMLA pourrait aussi se développer en présence de facteurs héréditaires: Meyers et ses collaborateurs ont démontré en 1995 la présence d'une haute concordance de la maladie dans des études sur des couples de jumeaux; de plus, Seddon et ses collaborateurs en 1997 ont prouvé l'existence d'un plus grand risque de développer la maladie pour les parents au premier degré des gens affectés.

Les manifestations cliniques de la DMLA, qui apparaissent pour la plupart à partir de l'âge de 50 ans et qui seraient à l'origine de la perte de vision, incluent l'accumulation de dépôts lipidiques des deux côtés de la lame basale de l'EPR (Pauleikhoff *et al.*, 1990), l'apparition de drusen, l'atrophie des cellules de l'EPR et des choriocapillaires, le détachement de l'EPR et la formation de nouveaux vaisseaux choroïdiens (pour une revue, voir Zarbin, 1998). A partir de la fin de l'adolescence, une accumulation croissante de débris membranaires sous la lame basale de l'EPR, c'est-à-dire au niveau de la membrane de Bruch de la choroïde, est observable chez l'ensemble de la population. Ce dépôt lipidique est éosinophile et contient des lysosomes et des vésicules (Killingsworth, 1987). Cependant, vers la fin de la cinquantaine, des dépôts lipidiques apparaissent entre la membrane basale des cellules de l'EPR et la lame basale de l'EPR; à partir de la fin de la soixantaine, cette déposition s'accélère dans le cas des patients souffrant de DMLA. Ces dépôts lipidiques contiennent des phospholipides, dont 50% de phosphatidylcholine, 30% de phosphatidyléthanolamine et 20% de phosphatidylinositol et de phosphatidylsérine (Pauleikhoff *et al.*, 1994).

La composition des drusen est encore mal connue; des études expérimentales post-mortem sur l'œil humain (Green et Enger, 1993; Sarks *et al.*, 1988) ont indiqué qu'ils



proviendraient des cellules de l'EPR, bien que des résultats contradictoires aient été rapportés (van der Shaft *et al.*, 1992). Les drusen sont divisés en deux grands groupes dans la littérature, soit les drusen durs et les drusen mous. Les drusen durs sont riches en phospholipides (Pauleikhoff *et al.*, 1992). Ils peuvent se former en bas âge et sont très communs chez les gens âgés. Ils sont typiquement petits (plus petits que 64  $\mu\text{m}$  de diamètre), ronds, jaunes et bien définis. Un nombre excessif de drusen durs peut prédisposer à l'atrophie de l'EPR en relativement bas âge; de plus, ils ont tendance à s'aggréger et fusionner ensemble. Il est à noter que la présence de drusen durs n'est pas considérée comme un pronostic du développement de la DMLA (Sarks *et al.*, 1994). Quand aux drusen mous, ils sont habituellement jaune pâle et plus gros (plus de 64  $\mu\text{m}$  de diamètre) et présentent des frontières mal définies. Ils apparaissent rarement avant l'âge de 65 ans (Garner *et al.*, 1994). Les drusen mous contiennent une grande proportion de lipides neutres (Pauleikhoff *et al.*, 1992) et peuvent contenir des débris membranaires (donc des phospholipides) et du collagène (Green *et al.*, 1985; van der Shaft *et al.*, 1992). Les drusen mous constituent un signe reconnu de DMLA (Eagle, 1984).

La DMLA constitue sans contredit un problème de santé majeur; malheureusement, il n'existe pas pour l'instant de marqueur biochimique fiable en permettant le suivi, ni de

traitement efficace associé à cette maladie. Toutefois, une voie de recherche prometteuse explorée depuis le début de notre décennie est une source d'espoir pour l'avenir: en effet, des résultats préliminaires suggèrent que la transplantation de cellules de l'EPR pourrait permettre de conserver l'intégrité des photorécepteurs en voie de dégénérescence, chez une modèle animal de DMLA (Litchfield *et al.*, 1997).

Puisque les dépôts lipidiques observés de part et d'autre de la membrane basale de l'EPR contiennent des phospholipides, il est possible que leur accumulation soit due, du moins en partie, à une déficience d'enzymes de type phospholipase A2 dans les cellules de l'EPR.

## 1.2 Les phospholipases A2

Les phospholipases A2 (PLA2) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'acide gras en position sn-2 du squelette glycérol des phospholipides membranaires. Tel qu'illustré sur le schéma 1.7, l'activité PLA2 résulte en la libération d'acide gras libres et en la formation de lysophospholipides. L'activité PLA2 a d'abord été détectée au début des années 1900, dans le jus pancréatique des mammifères et dans le venin de cobra. Plus tard,

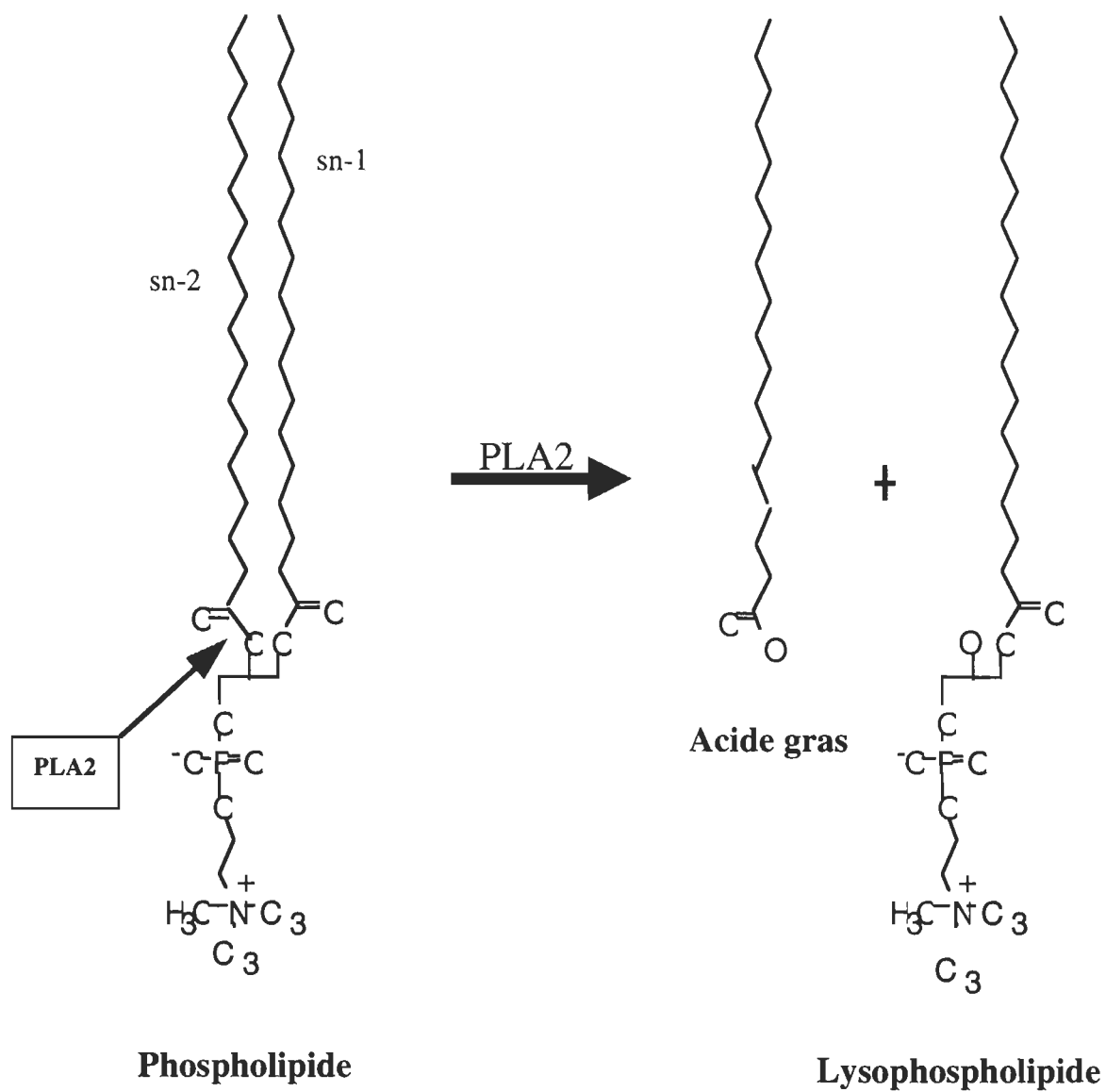


Schéma 1.7: Schéma de l'activité phospholipase A2

des PLA2 ont été purifiées à partir de plusieurs venins de serpent et d'abeille, puis du pancréas de mammifères, ce qui a rendu possible l'étude de leur structure et de leur mécanisme d'action (pour une revue, voir Wittcoff, 1951).

Les tissus et cellules de mammifères contiennent généralement plus d'un type de phospholipase A2, chacune d'entre elles étant régulée de façon indépendante et remplissant des fonctions physiologiques distinctes et variées. Ainsi, les PLA2 jouent un rôle majeur dans divers processus cellulaires incluant la digestion et le métabolisme des phospholipides, la défense de l'hôte lors d'une inflammation et la signalisation intracellulaire (Dennis *et al.*, 1991). En tenant compte entre autres de leur poids moléculaire, leur séquence en acides aminés, leur dépendance au calcium et leur localisation cellulaire, les différentes isoformes de PLA2 ont été regroupées en trois classes d'enzymes. Sont donc citées dans la littérature, les PLA2 sécrétées (sPLA2), la PLA2 cytosolique (cPLA2) et les PLA2 calcium-indépendantes (iPLA2). Les membres de chaque classe présentent des propriétés structurales et fonctionnelles particulières qui seront décrites plus loin; mentionnons auparavant que la découverte récente de PLA2 présentant à la fois une combinaison inusitée de certaines caractéristiques des sPLA2 et des cPLA2

invite à la définition de nouvelles classes ou encore de nouvelles sous-classes (ou groupes) de PLA2. Ces nouveaux types de PLA2 seront aussi décrits dans la présente section.

#### 1.2.1 Les phospholipases A2 sécrétées (sPLA2)

Les enzymes de la classe des PLA2 sécrétées présentent toutes un poids moléculaire d'environ 14 kDa, un pH optimum variant de 7 à 9 et un besoin en calcium dans une concentration de 1 à 10 mM pour leur activité catalytique (Chen *et al.*, 1994a et 1994b). Elles contiennent un nombre pair de résidus cystéine qui sont situés à des positions caractéristiques, chacun formant un pont disulfure, ce qui engendre une structure tridimensionnelle très rigide (pour une revue, voir Tishfield, 1997). De plus, il a été démontré que ces enzymes peuvent être soumises à une extraction à l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) sans être inactivées (Apitz-Castro *et al.*, 1979).

Un mécanisme d'action des sPLA2 est communément admis, où ces enzymes utilisent le résidu His-48 dans leur site actif, assisté du résidu Asp-49, pour polariser une molécule d' $H_2O$ , laquelle attaque ensuite le groupement carbonyle de l'acide gras en position sn-2 du substrat phospholipidique (Scott, 1991). Le bromure de para-bromophénol

(BpBP), qui est un agent dénaturant modifiant spécifiquement les résidus histidine d'une séquence peptidique, est donc un inhibiteur des sPLA2 puisqu'il lie le résidu His-48 dans leur site actif et bloque ainsi l'accès aux molécules de substrat (Waite, 1987). Dans ce mécanisme d'action, le calcium exercerait un rôle dans la stabilisation de l'état de transition et, pour ce faire, il serait lié au niveau d'une séquence peptidique hautement conservée chez les sPLA2, appelée la 'boucle liant le calcium' (Dennis, 1994; Wery *et al.*, 1991). Ainsi, les sPLA2 sont sensibles à l'effet de l'EGTA, un chélateur des ions calcium qui rend non disponible cet ion pour son utilisation par les enzymes (Tishfield, 1997). Notons enfin que l'expression et/ou le relargage extracellulaire des sPLA2 sont régulés par divers médiateurs chimiques, incluant des cytokines et des facteurs de croissance (interleukine-1 et interleukine-6, facteur de nécrose tumorale (TNF), etc.) (Mayer et Marshall, 1993).

Au cours des années 1990, avec l'augmentation constante du nombre de sPLA2 caractérisées, ces dernières ont été séparées en différents groupes, soit les groupes IA, IB, IIA, IIB, IIC, III et V. Le groupe IA contient seulement des PLA2 provenant de venins de serpent. Le groupe IB contient la PLA2 du jus pancréatique ainsi que les PLA2 de mammifères possédant les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnelles que cette dernière, soit: un total de 126 acides aminés et de 14 résidus cystéine, un total de 7 ponts

disulfure dont un liant les cystéines 11 et 77 et la présence des résidus hautement conservés 54 à 56 (Tishfield, 1997). Par ailleurs, ces enzymes sont caractérisées par une résistance à l'action dénaturante de la chaleur (Kozumplik *et al.*, 1989) et du dithiothréitol (DTT) (Bennett *et al.*, 1990), qui est un agent réducteur des ponts disulfure. Il est en effet possible que la réduction des ponts disulfure n'entraîne pas de changement conformationnel suffisant pour empêcher l'étape de liaison du substrat et du calcium, ni celle de l'activité catalytique de ces enzymes, ou encore qu'une partie des ponts disulfure soit protégée en étant enfouie dans la protéine. Les sPLA2 du groupe IB hydrolysent des vésicules de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) à des vitesses similaires, qui sont cependant supérieures à la vitesse d'hydrolyse de la phosphatidylsérine (PS) et du phosphatidylinositol (PI) (Kudo *et al.*, 1993). Leur principale représentante étant la PLA2 pancréatique, elles jouent un rôle évident dans la digestion, bien que des PLA2 de ce groupe soient présentes dans certains organes non reliés à la digestion (par exemple, la PLA2 de la rate chez le rat: voir Hiromasa *et al.*, 1988). Elles pourraient donc y exercer un rôle différent qui n'a pas encore été élucidé (Sakata *et al.*, 1989; Kortesus *et al.*, 1993).

Les sPLA2 du groupe IIA se retrouvent en relativement petite quantité chez les mastocytes et les macrophages et au sein de divers tissus tels que le foie et la rate. Ces

enzymes se retrouvent par contre en plus grand nombre dans le fluide synovial arthritique et dans le sérum de patients souffrant de maladies inflammatoires telles que la pancréatite (Nevalainen, 1993). Ces enzymes sont donc associées avec la réponse inflammatoire et il est reconnu qu'elles ont le potentiel de relarguer l'acide arachidonique des membranes, lequel peut ensuite servir comme précurseur des eicosanoïdes, d'importants médiateurs de l'inflammation (Kudo *et al.*, 1993). Contrairement aux sPLA2 du groupe IB et même si elles contiennent aussi 14 résidus cystéine formant 7 ponts disulfure, les sPLA2 du groupe IIA ne contiennent pas de pont disulfure entre les cystéines 11 et 77. Elles présentent cependant une extension carboxy-terminale particulière de 6 acides aminés qui se termine par la cys-124 formant un pont disulfure avec la cys-50. Les sPLA2 du groupe IIA sont résistantes à l'action de la chaleur (Tishfield, 1997) mais, à l'inverse des sPLA2 du groupe IB, elles sont sensibles à celle du DTT (Hara *et al.*, 1989). De plus, elles hydrolysent des vésicules de PE ou PS de préférence à des vésicules de PC ou PI (Kudo *et al.*, 1993).

Les sPLA2 du groupe IIB ont été identifiées uniquement chez la vipère du Gabon (Tishfield, 1997) et celles du groupe IIC, seulement chez le rat et la souris (Chen *et al.*, 1997); celles du groupe III ne se retrouvent que chez le venin d'abeille (Tishfield, 1997). Etant donné que leur existence n'est connue que depuis quelques années, les sPLA2 du



groupe V sont moins bien caractérisées que les sPLA2 des groupes I et II. On sait toutefois qu'elles ne contiennent ni les résidus 54-56 caractéristiques du groupe I, ni l'extension C-terminale caractéristique du groupe II. Elles contiennent seulement 12 résidus cystéine et chez les mammifères elles se retrouvent en grand nombre au niveau du cœur et du placenta et, dans une plus faible proportion, au niveau du poumon et du foie (Chen *et al.*, 1994a et 1994b).

#### 1.2.2 La phospholipase A2 cytosolique (cPLA2)

La PLA2 cytosolique possède un poids moléculaire de 85 kDa. Sa structure primaire, qui ne présente aucune homologie de séquence avec celle des sPLA2, comprend 749 acides aminés, dont le résidu nucléophile sérine-228 est essentiel pour l'activité catalytique de l'enzyme (Sharp *et al.*, 1994) et dont la portion amino-terminale contient un domaine calcium-dépendant liant les lipides. En effet, la cPLA2 requiert du calcium dans une concentration de l'ordre du micromolaire pour l'étape de liaison du substrat mais pas pour l'étape de catalyse, ce qui la distingue encore davantage des sPLA2 (Kramer, 1994). Ainsi, lorsque des cellules contenant la cPLA2 sont stimulées par un agent qui augmente la concentration intracellulaire de calcium, cette enzyme est transloquée du cytosol jusqu'à la

membrane nucléaire et le réticulum endoplasmique (Clark *et al.*, 1991); cette translocation est médiée par le domaine calcium-dépendant liant les phospholipides. Il est toutefois à noter que des cations divalents autres que le calcium, tels que le  $\text{Sr}^{2+}$ , le  $\text{Ba}^{2+}$ , le  $\text{Mn}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , activent aussi la cPLA2 (Ghomashi *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1993).

La cPLA2 est abondamment exprimée au niveau du cœur, de la rate, du poumon et du rein; on la retrouve aussi dans le cytosol des neutrophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages et plaquettes. Elle ne démontre pas de sélectivité pour la tête polaire ni pour l'acide gras en position sn-1 des phospholipides; elle démontre plutôt une spécificité de substrat envers l'acide arachidonique estérifié en position sn-2 des phospholipides (Diez *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1990). L'acide arachidonique étant le précurseur des eicosanoïdes (Venable *et al.*, 1993; Needleman *et al.*, 1986) et un second messager intracellulaire (Jayadev *et al.*, 1994; Hayakawa *et al.*, 1993), la cPLA2 jouerait un rôle de premier plan dans le processus cellulaire d'inflammation et pourrait être impliquée dans certaines voies de signalisation intracellulaire. Rajoutons que la cPLA2 montre une faible activité lysophospholipase, où l'acide gras des lysophospholipides est hydrolysé (Reynolds *et al.*, 1993); les activités PLA2 et lysophospholipase de cette enzyme prennent place au sein du même site actif (Sharp *et al.*, 1994).

La régulation transcriptionnelle de la cPLA2 est médiée par plusieurs facteurs dont l'interleukine-1 $\alpha$  (Lin *et al.*, 1992a), l'interleukine I $\beta$  (Schalkwijk *et al.*, 1993) et le TNF (Hoeck *et al.*, 1993). Des facteurs différents médient sa régulation post-transcriptionnelle, incluant: 1) les divers agents qui ont pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire en calcium (par exemple la phospholipase C); 2) la phosphorylation par des MAP kinases et les phosphokinases A et C (Lin *et al.*, 1992b) et 3) les protéines G, indirectement, car ces dernières régulent la cascade des MAP kinases (Xing et Matters, 1992).

#### 1.2.3 Les phospholipases A2 calcium-indépendantes (iPLA2)

Plusieurs phospholipases A2 calcium-indépendantes ont été purifiées à partir de différents organes, tissus et sources cellulaires, incluant le cerveau et le myocarde. Leur poids moléculaire, qui varie entre 40 et 58 kDa (Ackerman et Dennis, 1995; Thomson et Clark, 1995; Hazen *et al.*, 1990), est intermédiaire entre celui des sPLA2 (14 kDa) et de la cPLA2 (85 kDa). Jusqu'à maintenant, la comparaison de la structure primaire des iPLA2 avec celles des sPLA2 et de la cPLA2 révèle l'absence d'homologie de séquence (Jones *et al.*, 1996). Les iPLA2 ont été divisées en 3 catégories en fonction de leurs caractéristiques biochimiques: les iPLA2 lysosomiales, de la bordure en brosse et intracellulaires. Les

iPLA2 lysosomiales se retrouvent au niveau de la médulla rénale bovine (Winkler *et al.*, 1967), du foie (Franson *et al.*, 1971) et du tissu myocardial du rat (Franson *et al.*, 1972). Elles possèdent un pH optimum acide et sont inhibées par une grande concentration de calcium. Les iPLA2 de la bordure en brosse du petit intestin possèdent un pH optimum alcalin et sont fortement activées par les sels biliaries (Diagne *et al.*, 1987; Pind et Kuksis, 1987). Enfin, les iPLA2 intracellulaires se retrouvent au niveau du cytosol et/ou des fractions membranaires des homogénats cellulaires. Leur pH optimum varie entre 6.5 et 9.0 et elles démontrent des spécificités pour des substrats variés, dont une préférence pour l'acide phosphatidique (Thomson et Clark, 1995).

Les iPLA2 pourraient être impliquées dans différentes fonctions physiologiques et pathologiques, telles que: 1) la digestion: ainsi que le suggèrent la localisation cellulaire et les caractéristiques des iPLA2 lysosomiales et de la bordure en brosse (Ackerman et Dennis, 1995); 2) la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas: le D-glucose activerait une iPLA2 qui hydrolyserait ensuite l'acide arachidonique des phospholipides membranaires, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium puis la sécrétion d'insuline (Gross *et al.*, 1993; Ramanadham *et al.*, 1993); 3) l'ischémie myocardiale: les iPLA2 initieraient le bris de la membrane des cellules myocardiales qui

entraîne des changements électrophysiologiques, la perte de l'intégrité membranaire et enfin la mort cellulaire.

#### 1.2.4 Nouvelles PLA2

Depuis quelques années, l'existence de nouveaux types de PLA2 a été révélée par différents auteurs. En effet, ces enzymes présentent des propriétés structurales et fonctionnelles des sPLA2 et des cPLA2 à la fois, ce qui les distingue de ces dernières. Ainsi, Bennett et ses collaborateurs ont rapporté en 1990 l'existence d'une PLA2 du poumon porcin possédant un poids moléculaire légèrement plus élevé que celui des sPLA2, soit 16.7 kDa comparé à 14 kDa. Cette nouvelle enzyme est calcium-dépendante, ce qui la distingue également des iPLA2. Elle présente une spécificité de substrat pour la PC et la PE qu'elle hydrolyse à des vitesses similaires; elle présente de plus une relation immunologique avec la PLA2 pancréatique (une sPLA2 du groupe IB): ce sont deux propriétés des sPLA2 du groupe I. Par ailleurs, cette PLA2 est résistante à l'action du BpBP, à l'instar de la cPLA2.

De même, Buhl et son équipe en 1995 ont étudié une PLA2 du placenta humain qui possède un poids moléculaire de 42 kDa, ce qui est une position intermédiaire entre celui des sPLA2 et de la cPLA2. De plus, cette nouvelle PLA2 est sensible à l'effet du DTT comme le sont les sPLA2 du groupe II et elle requiert du calcium à une concentration de l'ordre du millimolaire pour son activité catalytique, à l'image des sPLA2 en général. Toutefois, la PLA2 du placenta est insensible à l'action du BpBP et présente une relation immunologique avec la cPLA2, deux propriétés de la cPLA2.

En 1997, Jacob et ses collaborateurs ont décrit deux PLA2 intracellulaires présentes chez l'EPR bovin *in situ*. La première est calcium-dépendante, sensible au BpBP et à l'extraction au  $H_2SO_4$  et résistante à l'action du DTT et de la chaleur, tandis que la deuxième est calcium-dépendante, sensible au BpBP, au DTT et à l'extraction à l' $H_2SO_4$ , mais résistante à la chaleur. Puisque ces deux PLA2 de l'EPR bovin possèdent à la fois des caractéristiques des sPLA2 et de la cPLA2 et qu'elles sont calcium-dépendantes, elles ne peuvent être incluses dans les classes actuellement définies des sPLA2, cPLA2 et iPLA2. Il s'agit donc de nouvelles PLA2, qui seraient spécifiques aux cellules de l'EPR.

Puisque l'EPR exerce des rôles-clé pour le maintien de la fonction normale de la rétine (section 1.1.2.2) et que, dans le cas de l'EPR bovin, les PLA2 qu'il contient devraient lui être spécifiques (Jacob *et al.*, 1997), il est possible que les PLA2 de l'EPR humain, si elles sont également spécifiques à ce type de cellules, soient aussi impliquées dans ces fonctions-clé de l'EPR. Dans ce cas, un mauvais fonctionnement des PLA2 de l'EPR humain pourrait nuire à la fonction normale de la rétine et ainsi contribuer à l'apparition de certaines dystrophies rétiniennes, telles que la DMLA. Nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation des PLA2 de l'EPR humain.

### 1.3 Hypothèses de recherche

En se basant entre autres sur les résultats des recherches de Michèle Jacob et ses collaborateurs en 1997, nous avons élaboré les hypothèses de recherche suivantes: 1) l'EPR humain contiendrait différents types de PLA2, 2) les PLA2 de l'EPR humain constitueraient de nouveaux types de PLA2, et 3) les cellules en culture de l'EPR humain sécrèteraient des PLA2 dans le milieu de culture. Cette dernière hypothèse trouve son fondement dans le fait que des cellules en culture provenant de différents tissus sécrètent des PLA2 dans le milieu de culture (Chen *et al.*, 1994a et 1994b; Kramer *et al.*, 1989).

#### 1.4 Objectifs de recherche

Dans le but de caractériser les phospholipases A2 de l'épithélium pigmentaire rétinien humain, nous nous sommes fixés les objectifs de recherche suivants:

- 1) Tester l'activité PLA2 des extraits cytosoliques et des milieux de culture obtenus à partir des cellules de l'EPR humain et s'assurer que l'augmentation de la quantité d'acides gras libres mesurée résulte effectivement d'une activité PLA2.
- 1) Purifier partiellement les PLA2 de l'EPR et caractériser leurs propriétés biochimiques.
- 1) Déterminer s'il existe des homologies de séquence entre les PLA2 de l'EPR et les sPLA2 et la cPLA2.
- 1) Etablir une classification des PLA2 de l'EPR en se basant sur leurs propriétés biochimiques et sur leurs possibles homologies de séquence avec les sPLA2 et la cPLA2.



## 1.5 Références

Ackerman, E. J. et Dennis, E. A. Mammalian calcium-independent phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta 1995. 1259: 125-136.

Ali, M. A. et Klyne, M. A. La vision chez les vertébrés. Ville Mont-Royal: Décarie Masson, 1986.

Apitz-Castro, R. J., Mas, M. A., Cruz, M. R. and Jain, M. K. Isolation of homogeneous phospholipase A2 from human platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. 91: 63-71.

Bartosz, G., Fried, R., Grzelinska, E. et Leylko, W. Effect of hyperoxide radicals on bovine-erythrocyte membrane. Eur. J. Biochem. 1977. 73: 261-264.

Bazan, N. G., Murphy, M. G. et Toffano, G. Neurobiology of essential fatty acids. New York: Plenum Press, 1992.

Bennett, C. F., Mec Carte, A. et Crooke, S. T. Purification and characterization of a soluble phospholipase A2 from guinea pig lung. Biochim. Biophys. Acta 1990. 1047: 271-283.

Bird, A.C. What is the future of research in age-related macular degeneration? Arch. Ophthalmol. 1997. 115: 1311-1313.

Boulton, M. Ageing of the retinal pigment epithelium. Progress in Retinal Research. 1991. 11: 125-151.

Bulh, W.-J., Eisenlohr, L. M., Preuss, I. et Gehring, U. A novel phospholipase A2 from human placenta. Biochem. J. 1995. 311: 147-153.

Chen, H. et Anderson, R. E. Metabolism in frog retinal pigment epithelium of docosahexanoic and arachidonic acids derived from rod outer segment membranes. Exp. Eye Res. 1993. 57: 369-377.

Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J. et Tishfield, J. A. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight calcium-dependent phospholipase A2. J. Biol. Chem. 1994a. 269: 2365-2368.

Chen J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J. et Tishfield, J. A. Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta. 1994b: 1215: 115-120.

Chen, J., Shao, C., Lazar, V., Srisvastava, C. H., Lee, W.-H. et Tishfield, J. A. Localization of group IIc low molecular weight phospholipase A2 mRNA to meiotic cells in the mouse. J. Cell Biochem. 1997. 64: 369-375.

Clark, J. D., Milona, N. et Knopf, J. L. Purification of a 110-kDa cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. 87: 7708-7712.

Clark, J. D., Lin L.-L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S. Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N. et Knopf, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A2 contains a calcium-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. Cell. 1991. 65: 1043-1051.

Coolbear, K. P. and Keough, K. M. W. Lipid oxidation and gel to liquid-crystalline transition temperatures of synthetic polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines.

Biochim. Biophys. Acta 1983. 732: 531-540.

Dennis, E. A., Rhee, S. G., Billah, M. M. et Hannun, Y. A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. FASEB J. 1991. 5: 2068-2077.

Dennis, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. J. Biol. Chem. 1994. 269: 13057-13060.

Diagne, A., Mitjavila, S., Fauvel, J., Chap, H. et Douste-Blazy, L. Intestinal absorption of ester and ether glycerophospholipids in guinea pigs. Role of a phospholipase A2 from brush-border membrane. Lipids 1987. 22: 33-40.

Diez, E., Chilton, F. H., Stroup, G., Mayer, R. J. Winkler, J. D. et Fonteh, A. N. Fatty acid composition and phospholipid selectivity of different phospholipase A2 enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. Biochem. J. 1994. 301: 721-726.

Eagle, R. C. Mechanisms of maculopathy. Ophthalmology 1984. 91: 613-625.

Evans, J. et Wormald, R. Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing? Br. J. Ophthalmol. 1996. 80: 9-14.

Feeney, L. The phagolysosomal system of the pigment epithelium. A key to retinal disease. Invest. Ophthalmol. 1973. 12: 635-638.

Ferris, F. L., Fine, S. L. et Hymann, L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. Arch. Ophthalmol. 1984. 102: 1640-1642.

Franson, R., Waite, M. et LaVia, M. Identification of phospholipase A1 et A2 in the soluble fraction of rat liver lysosomes. Biochemistry 1971. 10: 1942-1946.

Franson, R., Waite, M. et Weglicki, W. Phospholipase A activity of lysosomes of rat myocardial tissue. Biochemistry 1972. 11: 472-476.

Friedman, A. N., Pokorny, A. S. et Suhan, J. P. Senile macular degeneration: Clinical, histopathological and ultrastructural studies. Mt Sinai J. Med. 1980. 47: 227-245.

Garner A., Sarks, S. H. et Sarks, J. P. Degenerative and other disorders of the retina and choroid. dans: Pathobiology of ocular disease: a dynamic approach. New York: Marcel Dekker, 1994.

Ghomashi, J., Schuttel, S., Jain, M. K. et Gelb, M. H. Kinetic analysis of a high molecular weight phospholipase A2 from rat kidney; a divalent metal-dependent trapping of enzyme on product containing vesicles. Biochemistry 1992. 31: 3814-3824.

Gordon, W. C., Rodriguez de Turco, E. B. et Bazan, N. G. Retinal pigment epithelial cells play a central role in the conservation of docosahexanoic acid by photoreceptor cells after shedding and phagocytosis. Curr. Eye Res. 1992. 11: 73-83.

Green, W. R., Mc Donnell, P. J. et Yeo, J. H. Pathologic features of senile macular degeneration. J. Am. Acad. of Ophthalmol. 1985. 92: 615-627.

Green, W. R. et Enger, E. C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. Ophthalmology 1993. 100: 1519-1535.

Gross, R. W., Ramanadham, S., Kruszka, K. K., Han, X. et Turk, J. Rat and human pancreatic islet cells contain a calcium ion dependent phospholipase A2 activity selective for hydrolysis of arachidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islet beta-cells. Biochemistry 1993. 32: 327-336.

Hara, S., Kudo, I., Chang, H. W., Matsuta, K., Miyamoto, T. et Inoue, K. Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. J. Biochem. (Tokyo) 1989. 105: 395-399.

Hayakawa, M., Ishida, N., Takeuchi, K., Shibamoto, S., Hori, T., Oku, N., Ito, F. and Tsujimoto, M. Arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A2 is crucial in the cytotoxic action of tumor necrosis factor. J. Biol. Chem. 1993. 268: 11290-11295.

Hazen, S.L., Stumpp, R.J. et Gross, R.W. Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2. A calcium-independent phospholipase with absolute f1-2 regiospecificity for diradyl glycerophospholipids. J. Biol. Chem. 1990. 265: 10 622-10 630.

Helmreich, E. J. et Hofmann, K. P. Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. Biochim. Biophys. Acta 1996. 1286: 285-322.

Hiromasa, T., Takashi, O., Seiki, K., Hiroyuki, K. et Mitsuhiro, O. A phospholipase A2 in the supernatant fraction of rat spleen. J. Biol. Chem. 1988. 263: 5724-5731.

Hoeck, W. G., Ramesha, C.S., Chang, D. J., Jan, N. et Heller, R. A. Cytoplasmic phospholipase A2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993. 90: 4475-4479.

Hogan, M. J., Alvarado, J. A. et Weddel, J. E. Histology of the human eye. Philadelphia: Saunders, 1971.

Hogberg, J., Bergstrand, A. and Jakobsson, S. V. Lipid peroxidation of rat liver microsomes. Its effect on the microsomal membrane and some membrane-bound microsomal enzymes. Eur. J. Biochem. 1973. 37: 51-59.



Hudspeth, A. J. et Yee, A. G. The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1973. 12: 354-365.

Jacob, M., Weech, P. K. et Salesse, C. Bovine retinal pigment epithelium contains novel types of phospholipase A2. Biochem. J. 1997. 327: 455-460.

Jayadev, S., Linardic, M. and Hannun, Y. A. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. J. Biol. Chem. 1994. 269: 5757-5763.

Jones, S. S., Tang, J., Kriz, R., Shaffer, M., Knopf, J. et Sehra, J. FASEB J. 1996. 10, A977.

Killingsworth, M. C. Age-related components of Bruch's membrane in the eye. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1987. 225: 406-412.

Korte, G. E., Perlman, J. I. et Pollack, A. Regeneration of mammalian retinal pigment epithelium. Int. Rev. Cytol. 1994. 152: 223-263.

Kortesuo, P.T., Hietaranta, A. J., Jämiä, M., Hirsimäki, P. et Nevalainen, T. J. Rat pancreatic phospholipase A2. Purification, localization and development of an enzyme immunoassay. Int. J. Pancreatol. 1993. 13: 113-118.

Kozumplik, V., Staffa, F. et Hoffmann, G. E. Purification of pancreatic phospholipase A2 from human duodenal juice. Biochim. Biophys. Acta 1989. 1002: 395-397.

Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., Mc Gray, P., Chow, E. P., Tizard, R. et Pepinsky, R. B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. J. Biol. Chem. 1989. 264: 5768-5775.

Kramer, R. M. dans: Signal activated phospholipases. Liscovitch, 1994.

Krebs, W. et Kühn, H. Structure of isolated bovine rod outer segment membranes. Exp. Eye Res. 1977. 25: 511-26.

Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. et Inoue, K. Mammalian non-pancreatic phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta 1993. 1170: 217-231.

Leibowitz, H., Krueger, D. E. et Mauser, L.R. The Framingham eye study monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration and visual acuity in a general population of 2361 adults, 1973-1975. Surv. Ophthalmol. 1980. 24: 335-610.

Lin, L.-L., Lin, A. Y. et DeWitt, D.L. Interleukine-1 $\alpha$  induces the accumulation of cPLA2 and the release of PGE2 in human fibroblasts. J. Biol. Chem. 1992a. 267: 23451-23454.

Lin, L.-L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth., A. et Davis, R. J. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP Kinase. Cell 1992b. 72: 269-278.

Litchfield, T. M., Whiteley, S. J. O. et Lund, R. D. Transplantation of retinal pigment epithelium, photoreceptors and other cells as treatment for retinal degeneration. Exp. Eye Res. 1997. 64: 655-666.

Marmor, M. F. et Wolfensberger, T. J. dans The Retinal Pigment Epithelium. Oxford University Press, 1998.

Matsumoto, B., Defoe, D. M. et Besharse, J. C. Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheatment and phagocytosis of outer segments distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium. Proc. Royal Soc. Lond. B. 1987. 230: 339-354.

Mayer, R. J. et Marshall, L. A. New insights on mammalian phospholipases A2: a comparison of arachidonoyl-selective and –non-selective enzymes. FASEB J. 1993. 7: 339-348.

Meyers, S. M., Greene, T. et Gutman, F. A. A twin-study of age-related macular degeneration. Am. J. Ophthalmol. 1995. 120: 759-766.

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowitz, J. B. Arachidonic acid metabolism. Ann. Rev. Biochem. 1986. 55: 69-102.

Nevalainen, T. J. Serum PLA2 in inflammatory diseases. Clin. Chem. 1993. 39: 2453-2459.

Ostrovsky, M., Sakina, N. L. et Dntsov, A. E. An antioxidative role of ocular screening pigments. Vision Res. 1987. 27: 893-899.

Pauleikhoff, D., Harper, A., Marshall, J. et Bird, A. C. Aging changes in Bruch's membrane: a histochemical and morphological study. Ophthalmology 1990. 97: 171-178.

Pauleikhoff, D., Zuel, S., Sheridah, G. S., Marshall, J., Wessing, A. et Bird, A. C. Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane. Ophthalmology 1992. 99: 1548-1553.

Pauleikhoff, D., Sheridah, G., Marshall, J., Bird, A. C. et Wessing, A. Biochemical and histochemical analysis of age-related lipid deposits in Bruch's membrane. Ophthalmology 1994. 91: 730-734.

Pind, S. et Kuksis, A. Isolation of purified brush-border membranes from rat jejunum containing a calcium-independent phospholipase A2 activity. Biochim. Biophys. Acta 1987. 901: 78-87.

Ramanadham, S., Gross, R. W., Han, X. et Turk, J. Inhibition of arachidonate release by secretagogue-stimulated pancreatic islets suppresses both insulin secretion and the rise in beta-cell cytosolic calcium ion concentration. Biochemistry 1993. 32: 337-346.

Reynolds, L., Hughes, I., Louis, A. I., Kramer, R. A. et Dennis, E. A. Metal ions and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta 1993. 1167: 272-280.

Saari, J. C. Metabolism and photochemistry in the retina. dans: Adler's physiology of the eye: clinical applications. Saint-Louis: The CV Mosby company, 1987.

Sakata, T., Nakamura, E., Tsuruta, Y., Tamaki, M., Teraoka, H., Tojo, H., Ono, T et Okamoto, M. Presence of pancreatic-type phospholipase A2 mRNA in rat gastric mucosa and lung. Biochim. Biophys. Acta. 1989. 1007: 124-126.

Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R. M. An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes. Anal. Biochem. 1984. 142: 258-266.

Sarks, J. P., Sarks, S. H. et Killingsworth, M. C. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. Eye 1988. 2: 552-577.

Sarks, J. P., Sarks, S. H. et Killingsworth, M. C. Evolution of soft drusen in age-related macular degeneration. Eye 1994. 8: 269-283.

Sarna, T. Properties and function of the ocular melanin: a photobiophysical view. J. Photochem. Photobiol.-Biol. 1992. 12: 215-258.

Schalkwijk, C. G., Vervoordeldonk, M., Pfeilschifter, J. et van den Bosch, H. Interleukin-1 $\beta$ -induced cytosolic phospholipase A2 activity and protein synthesis is blocked by dexamethasone in rat mesangial cells. FEBS Letters 1993. 333: 339-343.

Scott, D. L. Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A2 from inflammatory exudates. Science 1991. 254: 1007-1010.

Seddon, J. M., Ajani, U. A. et Mitchell, B. D. Familial aggregation of age-related macular maculopathy. Am. J. Ophthalmol. 1997. 123: 199-206.

Sevanian, A., Wratten, M. L., McLeod, L. L. and Kim, E. Lipid peroxidation and PLA2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. Biochim. Biophys. Acta 1988. 961: 316-327.

Sharp, J. D., Pickard, R. T., Chiou, X. G., Manetta, J. V., Kovacevic, C. S., Miller, J. R., Varshavski, A. D., Roberts, E. F., Striffler, B. A., Brems, D. N. et Kramer, R. M. Serine-228

is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. J. Biol. Chem. 1994. 269: 23250-23254.

Spence, A.P. et Mason, E. B. Anatomie et physiologie: une approche intégrée. Montréal: Editions du Renouveau Inc., 1983.

Strahlman, E.R., Fine, S.L. et Hillis, A. The second eye of patients with senile macular degeneration. Arch. Ophthalmol. 1983. 101: 1191-1193.

Tishfield, J. A. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals. J. Biol. Chem. 1997. 272: 17247-17250.

Thomson, J. J. et Clark, M. A. Purification of a phosphatidic acid-hydrolysing phospholipase A2 from rat brain. Biochem. J. 1995. 306: 305-309.

van der Shaft, T.L., de Bruijn, W.C., Mooy, C.M., Katelaars, D.A. et de Jong, P.T.V.M. Element analysis of the early stages of age-related macular degeneration. Arch. Ophthalmol. 1992. 110: 389-394.



van Kuijk, F. J., Sevanian, A., Handelman, G. J. and Dratz, E. A. Protection of membranes from lipid peroxidation damage. Trends Biochem. Sci. 1987. 12: 31-34.

Venable, M. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. Platelet activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. J. Lipid. Res. 1993. 34: 691-702.

Vingerling, J.R., Klaver, C. C., Hofman, A. et de Jong, P. T. Epidemiology of age-related maculopathy. Epidemiol. Rev. 1995. 17: 347-360.

Waite, M. dans: The Phospholipases. Handbook of Lipid Research, Vol. 5, New York: Plenum Press, 1987.

Wery, L.-P., Schevitz, R. W., Clawson, D. K., Bobbitt, J. L., Dow, E. R., Gamboa, G., Goodson, T., Hermann, R. B., Kramer, R. M., Mc Clure, D. B., Mihelich, E. D., Putnam, J. E., Sharp, J. D., Stark, D. H., Teater, C., Warrick, M. W. et Jones, N. D. Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial phospholipase A2 at 2.2 Å resolution. Nature 1991. 352: 79-82.

Winkler, H., Smith, A. D., Dubois, F. et van den Bosch, H. The positional specificity of lysosomal phospholipase A activities. Biochem. J. 1967. 105: 38C-40C.

Wittcoff, H. The phosphatides. New York: Reinholds Publishing Corp., 1951.

Wratten, M. L., Gratton, E., Van de Ven, M. and Sevanian, A. DPH lifetime distributions in vesicles containing phospholipid hydroperoxides. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. 164: 169-175.

Xing, M. et Matters, R. Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase by G-proteins and calcium in HL-60 granulocytes. J. Biol. Chem. 1992. 267: 25966-25975.

Young, R. W et Bok, D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segments renewal process. J. Cell Biol. 1969. 42: 392-403.

Zarbin, M. A. Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. Eur. J. Ophthalmol. 1998. 8: 199-206.

Zinn, K. M. et Benjamin-Henkind, J. V. Anatomy of the human retinal pigment epithelium.

dans: The retinal pigment epithelium . Cambridge: Harvard University Press, 1979.

## CHAPITRE 2

HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM SECRETES A PHOSPHOLIPASE A2  
AND CONTAINS TWO NOVEL INTRACELLULAR PHOSPHOLIPASES A2

soumis à:

BIOCHEMICAL JOURNAL

**HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM SECRETES A PHOSPHOLIPASE  
A2 AND CONTAINS TWO NOVEL INTRACELLULAR PHOSPHOLIPASES A2**

Céline VAN THEMSCHE, Michèle JACOB<sup>†</sup> and Christian SALESSE

GREIB, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-  
Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

**RUNNING TITLE: PHOSPHOLIPASES A2 FROM HUMAN RETINAL PIGMENT  
EPITHELIUM**

<sup>†</sup> Present address: The Wistar Institute, Philadelphia, PA 19104-4268

## 2.1 Contribution des co-auteurs de l'article de ce mémoire

J'ai effectué la rédaction complète de l'article 'HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM SECRETES A PHOSPHOLIPASE A2 AND CONTAINS TWO NOVEL INTRACELLULAR PHOSPHOLIPASES A2', de même que la planification et l'exécution de l'ensemble des mesures expérimentales qui y sont présentées. Mme Michèle Jacob apparaît comme co-auteure pour m'avoir initiée à quelques unes des procédures expérimentales utilisées.

## 2.2 Abbreviations used

bf-TLC, 'back-and-forth' thin-layer-chromatography; BSA, bovine serum albumin; *p*BPB, para-bromophenacylbromide; 10Py-decanoic acid, 1-pyrenedecanoic acid; DAG, 1,2-diacylglycerol; DTT, dithiothreitol; E-64, *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane; [<sup>14</sup>C]DOPC, 1-[<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]oleoyl-2-[<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]oleoylphosphatidylcholine; [<sup>14</sup>C]lysoPC, 1-[<sup>14</sup>C]palmitoyl-2-hydroxyphosphatidylcholine; DMPM, dimyristoylphosphatidylmethanol; PLA2, phospholipase A2; sPLA2, secretory PLA2; cPLA2, cytosolic PLA2; iPLA2, Ca<sup>2+</sup>-independent PLA2; PLC, phospholipase C; PLD,

phospholipase D; 10PyPM, 1-hexadecyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphomethanol; PVP, polyvinylpyrrolidone; RPE, retinal pigment epithelium; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline.

### 2.3 Synopsis

Three phospholipase A2 (PLA2) enzymes from human retinal pigment epithelial (RPE) cells were partially purified and characterized. The sensitivity of different PLA2-active fractions eluted from cation-exchange chromatography to *p*BPB,  $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA, DTT, heat and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  indicates that human cultured RPE cells probably contain two different intracellular PLA2 enzymes. Control experiments using 'back-and-forth' TLC enabled us to discriminate between PLA2 and phospholipase C/diacylglycerol lipase activities and confirmed that, in our assay conditions, the generation of free fatty acids originated solely from PLA2 activity. Together with immunoblot experiments where no cross-reactivity was observed between the RPE intracellular PLA2 enzymes and several antisera directed against sPLA2 and cPLA2, these findings suggest that intracellular RPE-PLA2s are different from well-known secretory, cytosolic and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent PLA2s, and that one of these human RPE-PLA2 is similar to a bovine RPE-PLA2 recently identified. We also

report an additional RPE-PLA2 enzyme that is secreted and which exhibits sensitivity to pBPB,  $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA, DTT, heat and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  characteristic of sPLA2 enzymes. This PLA2, with an apparent molecular weight of approximately 22 kDa, cross-reacted weakly with an antiserum directed against porcine pancreatic group I sPLA2 but strongly with an antiserum directed against N-terminal residues 1-14 of human synovial group II sPLA2, suggesting that this extracellular enzyme is a member of the sPLA2 class of enzymes. We thus conclude that there are three distinct PLA2 enzymes in human cultured RPE cells, including two novel intracellular PLA2s and a 22 kDa secreted sPLA2 enzyme.

## 2.4 Introduction

The retinal pigment epithelial (RPE) cells are very important for the normal function of the retina. Indeed, they are responsible for the shedding and phagocytosis of retinal photoreceptors and for providing them with nutrients and metabolites (for a review, see [1]). Mutations in genes like RPE65 that are specific to RPE cells were shown to lead to hereditary retinal degeneration [2,3]. Two novel intracellular phospholipase A2 (PLA2) enzymes were recently characterized in the bovine RPE and shown to be different from known PLA2s [4]. These enzymes should thus be specific to RPE and, consequently, the



characterization of PLA2 enzymes from human RPE cells is of particular importance, as they could be involved in different types of retinal degeneration.

PLA2s constitute a diverse family of enzymes that hydrolyse the *sn*-2 fatty acyl ester bond of phosphoglycerides, producing free fatty acids and lysophospholipids. These ubiquitous enzymes play crucial roles in normal cellular functions by participating in the metabolism and turnover of phospholipids [5,6]. Notably, hydrolysis products of PLA2 include arachidonic acid and lyso-platelet activating factor (lyso-PAF), which are the precursors of the pro-inflammatory mediators prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes and PAF [7,8]. Arachidonic acid was also shown to be important as a second messenger in signal transduction [9,10].

Based on their molecular weight, amino acid sequence, subcellular localization, calcium dependence and other biochemical properties, PLA2s have been divided into three major classes: secretory PLA2s (sPLA2s), cytosolic PLA2 (cPLA2) and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent PLA2s (iPLA2s) [11-14]. sPLA2s are 14 kDa enzymes that can be either cell-associated or secreted. Mammalian sPLA2s include group I sPLA2s, originally detected in pancreas exudate [13-15], group II sPLA2s, found in both cells and extracellular fluids under

inflammatory conditions [13,14,16,17], and group V sPLA2s, highly expressed in heart and placenta [18-21]. sPLA2s share no sequence similarity with cPLA2 [12], which exhibits a marked preference for phospholipids containing arachidonic acid at the *sn*-2 position of the glycerol backbone [22-24] and is therefore presumed to be the main source of intracellular arachidonic acid [25]. The iPLA2 class is very heterogeneous and has been further divided into three groups, based on their biochemical characteristics [11]. Interestingly, novel types of mammalian PLA2s have also been recently characterized, suggesting that the PLA2 classification will have to be refined and that new classes or groups of PLA2s might be needed [4, 26-28].

In this paper, we present our results on the biochemical and immunochemical characterization of human RPE-PLA2s. We first confirmed that, in our assay conditions, the hydrolysis of fatty acids was solely due to PLA2 activity and not to the combined action of phospholipase C (PLC) and diacylglycerol (DAG) lipase activities, using 'back-and-forth' TLC (bf-TLC). Different PLA2-active fractions collected after elution of the growth medium and high-salt extracts from cultured RPE cells on a 'cation-exchange chromatography column were then examined for their sensitivity to denaturing/inactivating treatments (*p*BPB, EGTA, DTT, heat and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). We also conducted immunoblot

experiments to test the cross-reactivity of two RPE PLA2-active samples with a monoclonal antibody and several antisera directed against cPLA2, as well as group I and group II sPLA2s. We demonstrate for the first time that human RPE probably contains two novel types of intracellular PLA2 enzymes, one of them being similar to a novel bovine intracellular RPE-PLA2 recently identified [4]. We also demonstrate that cultured RPE cells secrete a sPLA2 enzyme.

## 2.5 Materials and methods

### 2.5.1 Materials

1-[ $^{14}\text{C}$ ]*oleoyl*-2-[ $^{14}\text{C}$ ]*oleoyl*phosphatidylcholine ([ $^{14}\text{C}$ ]DOPC) was from Amersham. Dimyristoylphosphatidylmethanol (DMPM) was from Avanti Polar Lipids. Acrylamide/*bis*-acrylamide solution, nitrocellulose and sodium dodecyl sulfate (SDS) were from Bio-Rad. Aprotinin, dispase II, *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64), EDTA, EGTA, leupeptin, penicillin/streptomycin, polyvinylpyrrolidone (PVP) and Tris-hydrochlorid (Tris-HCl) were from Boehringer Mannheim. Acetic acid, chloroform, heptane, isopropyl ether, methanol and sulfuric acid

(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) were from Fisher. Keratinocyte-SFM was from Gibco. Anti-human synovial PLA2 monoclonal antibody was from Cayman Chemicals. Calf bovine serum and chicken serum were from Hyclone. 1-pyrenedecanoic acid (10Py-decanoic acid) and 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphomethanol (10PyPM) were from Molecular Probes. Hi-trap SP cation-exchange columns were from Pharmacia Biotech. Albumax, ascorbic acid, 4-bromophenacylbromide (*p*BPB), CaCl<sub>2</sub>, carnitine, dithiothreitol (DTT), fructose, glucose, glutathione, HEPES, hypoxanthine, iodine, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, oxalacetic acid, KCl, retinol acetate, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, taurine, transferrin and uridine were from Sigma. LK6D silica-gel 60Å TLC plates were from Whatman.

#### 2.5.2 Dissection of human eyes and culture of human RPE cells

Human eyes from donors between 35 weeks and 78 years of age were obtained from the National Eye Bank Inc., Sainte-Foy, Quebec, Canada. Human eyes were dissected and RPE cells were harvested according to a modification of the method described by Pfeffer [29]. Briefly, the eyes were placed in dissection solution (0.3 mg/ml BSA, 0.5 mg/ml PVP and 100 U/ml penicillin/streptomycin in Modified Hanks Balanced Salt Solution (MHBSS: 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 8.3 mM glucose, 15 mM HEPES, 3.5 mM KCl, 0.27 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.37 mM

MgSO<sub>4</sub>, 138.5 mM NaCl, 4.3 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2). After cutting the sclera approximately 0.5 cm away from the cornea, the lens, vitreous and retina were removed. RPE-choroid sheets were detached from the sclera, placed in a dispase solution (2.4% dispase II, 10 mg/ml PVP, 2% chicken serum, 88 mM CaCl<sub>2</sub> in MHBSS) and incubated for 45 to 60 min at 37°C. All subsequent manipulations were performed under sterile conditions. RPE sheets were dislodged with saline and were transferred to 100 X 20 mm sterile plastic dishes containing 10 ml growth medium (200 mg/ml albumax, 45 mg/ml ascorbic acid, 1% bovine retina extracts, 5% calf bovine serum, 1 mg/ml carnitine, 112 mg/ml fructose, 500 mg/ml glucose, 5 mg/ml glutathione, 6 mg/ml hypoxanthine, 67 mg/ml oxalacetic acid, 0.15 mg/ml retinol acetate, 5 mg/ml taurine, 0.025 mg/ml D- $\alpha$ -tocopherol, 50 mg/ml transferrin and 0.3 mg/ml uridine in Keratinocyte-SFM basal growth medium, pH 7.2). The isolated RPE sheets were incubated in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 48-72h. Non-adherent cells were then collected, centrifuged, resuspended in 10 ml growth medium and seeded at an approximate density of 250 000 cells/ 75 cm<sup>2</sup> flask, after performing the trypan blue exclusion test [30]. After 48-72h of incubation, growth medium was replaced with fresh medium and cells were grown until approximately 90% confluent, when they were either passaged, or trypsinized and collected. The cells were routinely confirmed to be epithelial cells by positive staining using the Cytokeratine 8.13 test [31].

### 2.5.3 Preparation of hRPE-cytosol

Cultured RPE cells were trypsinized, centrifuged at 3 500 *g* for 5 min, washed with MHBSS, counted by the trypan blue exclusion test and resuspended at an approximate density of  $1 \times 10^6$  cells/ml PBS 6X containing protease inhibitors (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 600 mM NaCl, 100  $\mu\text{M}$  EDTA, 2.8  $\mu\text{M}$  E-64, 0.06  $\mu\text{M}$  aprotinin, 1  $\mu\text{M}$  leupeptin, pH 7.5). The suspension was transferred to a 2 ml Tenbroeck glass tissue grinder and homogenized approximately 8 times on ice. The homogenate was incubated for 1 hour at 4°C and then centrifuged (4°C, 1h, 140 000 *g*, Beckman 70.1 Ti rotor). The resulting supernatant (hRPE-cytosol) was collected and either used immediately or stored at -20°C until use.

### 2.5.4 Preparation of hRPE-growth medium

After RPE cells were grown for 48-72h, growth medium was collected. Growth media were either used immediately or pooled and stored at -20°C until use.

#### 2.5.5 Measurement of PLA2 activity

PLA2 assay was done according to a modification [4] of the fluorimetric method described by Bayburt *et al.* [32], using a Cytofluor 4000 Fluorescence Multiwell Plate Reader (Perseptive Biosystems). The assay was conducted at 37°C with 10-25 µl of protein samples and 900 pmoles of 10PyPM per well. Fluorescence was read every 2 min (excitation wavelength 340 nm; emission wavelength 380 nm). 10Py-decanoic acid was used to establish a calibration curve which allowed to convert fluorescence readings into PLA2 specific activity (pmol of 10Py-decanoic acid hydrolyzed/ h/ mg proteins). For Table 1, protein samples were pre-incubated for 15 min at 60°C (heat treatment), or for 15 min at 37°C with either 2 mM CaCl<sub>2</sub> (control), 1mM *p*BPB, 3 mM EGTA, 3 mM DTT. All treated samples were cooled to 4°C and transferred to 37°C before the addition of the 10PyPM substrate.

#### 2.5.6 Determination of phospholipase C activity using bf-TLC

To determine the extent of release of fatty acids resulting from PLA2 versus PLC coupled to DAG lipase activity, we used a method developed in our laboratory called bf-TLC [4].

Briefly, PLA2 activity was assayed using [ $^{14}\text{C}$ ]DOPC:DMPM (1:1, molar ratio) and 10  $\mu\text{l}$  of PLA2-active samples. Reaction was stopped following Miljanich's procedure [33]. Lipid extracts were applied on TLC plates, which were treated as described by Jacob *et al.* [4]. Each spot was revealed with iodine vapours, scraped and quantified by liquid scintillation counting. PLA2 activity was expressed as pmol of [ $^{14}\text{C}$ ]labeled hydrolysis products/mg of proteins and was corrected for the presence of unlabeled DMPM.

#### 2.5.7 Cation-exchange chromatography

hRPE-cytosol and hRPE-growth medium were prepared as previously described [4] and injected onto a 1 ml Hi-Trap SP cation-exchange column. Unbound proteins were eluted with the equilibrating buffer (PBS 1X pH 6.0), whereas bound proteins were eluted in a single-step gradient with a high-salt buffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /2 M NaCl, pH 6.0).

#### 2.5.8 Immunoblotting

PLA2-active samples were processed according to Laemmli's procedure [34] and 35  $\mu\text{g}$  aliquots were run on 12% denaturing polyacrylamide gels (150V for 50 min at room



temperature) using purified human cPLA2 and sPLA2 as controls, before being transferred to nitrocellulose membranes (100V for 1 hour at 4°C). Blots were blocked overnight with 1% milk powder in Tris-buffered saline (TBS pH 7.4), and probed with an anti-human synovial PLA2 monoclonal antibody or different antisera directed against: 1) residues 54-66 of cPLA2, 2) residues 731-749 of cPLA2, 3) pig pancreatic sPLA2, 4) N-terminal residues 1-17 of human pancreatic sPLA2, 5) N-terminal residues 1-14 of human synovial sPLA2 or 6) C-terminal residues 113-124 of human synovial sPLA2. These antisera were kindly donated by Dr. P. K. Weech, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire, Dorval, Quebec, Canada. All primary antisera and the monoclonal antibody were used at 1/500 dilution in TBS-10% milk powder. Detection was done using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Pharmacia Biotech) diluted 1/10 000 in TBS-10% milk powder. Visualization was done by incubating the nitrocellulose membranes for 30 min with the Supersignal Enhanced Chemiluminescence Substrate (Pierce).

### 2.5.9 Determination of protein concentration

Total protein concentration was determined using either the NanoOrange Protein Quantitation Kit (Molecular Probes) or the Lowry procedure [35].

## 2.6 Results and discussion

### 2.6.1 Release of fatty acids in hRPE-cytosol and hRPE-growth medium results from PLA2 activity

Phospholipases C are ubiquitous enzymes that generate diacylglycerols from phospholipid substrates [36,37]. Since PLC activity coupled to DAG lipase activity results in the generation of free fatty acids (FFA), as does PLA2 activity, it was thus necessary to determine the contribution of both PLC and PLA2 to the FFA production we observed. In order to separate all PLA2 and PLC/DAG lipase hydrolysis products, we performed the bf-TLC technique as described by Jacob *et al.* [4], using [ $^{14}\text{C}$ ]DOPC, which bears two radiolabeled fatty acid chains, as a substrate (in mixed vesicles with DMPM). The first solvent system (chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O (14:6:1, v/v)) allowed to separate

lysophosphatidylcholine (lysoPC,  $R_F$  0.15), phosphatidylcholine ( $R_F$  0.33), phosphatidic acid ( $R_F$  0.43) and phosphatidylmethanol ( $R_F$  0.52) in the 'forth' dimension, whereas the second solvent system (isopropyl ether/heptane/acetic acid (60:40:4, v/v)) allowed to separate DAG ( $R_F$  0.25) and FFA ( $R_F$  0.5) in the 'back' dimension.

Figure 1 illustrates our results obtained by bf-TLC using hRPE-cytosol. It shows that 1) the production of both [ $^{14}$ C]lysoPC and [ $^{14}$ C]oleic acid increases over time, 2) [ $^{14}$ C]oleic acid accumulates much faster than [ $^{14}$ C]lysoPC and 3) [ $^{14}$ C]DAG levels do not increase significantly over time. This suggests that there is no PLC activity in our assay conditions, making very unlikely the possibility that [ $^{14}$ C]oleic acid release results from the combined action of PLC and DAG lipase activities. We can therefore conclude that the release of fatty acids is due to a PLA2 which also possesses a lysophospholipase activity, as was reported for bovine RPE-PLA2s [4]. In agreement with this, it is well established that cPLA2 also exhibits lysophospholipase activity [38, 39]. It is thus possible that human RPE intracellular PLA2s possess lysophospholipase activity. We also found that there is no production of phosphatidic acid, which indicates the absence of PLD activity in the hRPE-cytosol in our assay conditions (results not shown). We conclude from Figure 1 that in

hRPE-cysotol, the release of fatty acids does not result from PLC/DAG lipase activity, but is the direct consequence of PLA2 activity.

Figure 2 shows the results obtained by bf-TLC using hRPE-growth medium. It is noteworthy that the increase in the production of [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid is approximately 25-fold larger than that of [ $^{14}\text{C}$ ]DAG over time and that the production of [ $^{14}\text{C}$ ]lysoPC is negligible. This suggests that there is a modest PLC activity in the hRPE-growth medium. However, there is no evidence for a combined DAG lipase activity since, in such a case, we would expect to observe a decrease in the amount of [ $^{14}\text{C}$ ]DAG concomitant with the increase of [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid, which did not happen. Instead, Figure 2 shows that both the amounts of [ $^{14}\text{C}$ ]DAG and [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid increase between 0 and 20 min and then remain constant, suggesting that there is no major contribution of PLC/DAG lipase activity to the generation of FFA in hRPE-growth medium. Figure 2 also suggests the presence of a very high rate of lysophospholipase activity in hRPE-growth medium, which could be attributed to a PLA2 of the cPLA2 class or to the presence of non-PLA2 lysophospholipase enzymes (e.g. phospholipase B). Finally, the absence of phosphatidic acid production allowed us to conclude that, in our assay conditions, there was no PLD activity in hRPE-growth medium

(data not shown). We can thus infer from Figure 2 that, as for hRPE-cytosol, the release of fatty acids in hRPE-growth medium results from PLA2 activity.

### 2.6.2 Cultured human RPE cells contain different PLA2-active fractions

In order to better identify the different PLA2s expressed by human cultured RPE cells, we eluted hRPE-cytosol (Figure 3) and hRPE-growth medium (Figure 4) on a cation-exchange chromatography column. Figures 3A and 4A show the protein elution profiles, whereas Figures 3B and 4B show the corresponding PLA2 activity elution profiles. Fractions 47-49 of hRPE-cytosol that were eluted with unbound proteins (Figure 3A) using a low-salt buffer contain the highest PLA2 activity (Figure 3B). They were pooled and identified as PLA2-active fraction c47-49. The fraction c60, which was eluted with bound proteins using a high-salt buffer, was also selected for its high PLA2 activity and low protein content. The difference between the elution time of fractions c47-49 and c60, as well as the decrease of PLA2 activity between the two peaks (see Figure 3B), strongly suggests that these two PLA2-enriched fractions are different from each other.

When compared to hRPE-cytosol, hRPE-growth medium shows a different elution profile since the PLA2-active fractions were only eluted with bound proteins (Figures 3 and 4). Fractions 19 and 20 both exhibited high PLA2 activity and were subsequently pooled to form PLA2-active fraction m19-20.

Given that our culture medium contains 5% calf bovine serum (v/v), which is known to contain PLA2 activity [40,41], we sought to determine whether the PLA2 activity found in hRPE-growth medium originated from active enzyme secretion by cultured RPE cells and/or the serum component. Our results from PLA2 assays revealed the presence of PLA2 activity in the growth medium. However, this represented only 4% of total PLA2 activity measured in hRPE-growth medium. We can therefore conclude that the PLA2 activity detected in hRPE-growth medium was attributable to active enzyme secretion by RPE cells.

### 2.6.3 Cultured human RPE cells secrete a PLA2 and contain two different intracellular PLA2 enzymes

Newly identified PLA2s are routinely characterized and classified based on their sensitivity to various denaturing/inactivating treatments, including *p*BPB, EGTA, DTT, heat and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> extraction [4, 11-14]. We therefore characterized our selected PLA2-active fractions by submitting them to these treatments.

Table 1 shows that PLA2 activity from all selected fractions was entirely abolished after treatment with EGTA, indicating that RPE-PLA2 activity is Ca<sup>2+</sup>-dependent. This latter result suggests that human RPE-PLA2s could either be members of the sPLA2 or the cPLA2 classes of enzymes, since all sPLA2s and cPLA2 are Ca<sup>2+</sup>-dependent. Similarly, all selected PLA2-active fractions were completely inactivated (100 ± 0.0 % inhibition) by the His modifying agent *p*BPB, a well-known inhibitor of group I and group II sPLA2s [5]. This suggests that human RPE-PLA2s could be members of the sPLA2 class of enzymes.

Reduction of disulfide bridges with DTT revealed that both fractions c47-49 and c60 are partly DTT-sensitive (27.0 ± 0.5 and 41.6 ± 5.8 % inhibition, respectively), which

is in good agreement with the  $28.1 \pm 8.4$  % inhibition obtained for the whole hRPE-cytosol (see Table 1). A possible explanation for these results is that a PLA2 cofactor (but not the PLA2 itself) could be partly inactivated by 3 mM DTT. On the other hand, fraction m19-20 is clearly sensitive to DTT with  $77.2 \pm 7.0$  % inhibition, which is similar to the  $72.1 \pm 7.5$  % inhibition obtained for the whole hRPE-growth medium, suggesting that the PLA2 activity in this fraction is mainly attributable to a PLA2 enzyme that contains disulfide bonds, similar to the sPLA2s.

Table 1 also reveals that fraction c47-49 is partly heat-sensitive ( $43.7 \pm 5.8$  % inhibition) whereas fraction c60 is thermo-resistant ( $15.5 \pm 12.2$  % inhibition). Consistent with these results, the whole hRPE-cytosol exhibited an intermediate value of  $35.1 \pm 6.7$  % inhibition. The reason for fraction m19-20 being thermo-resistant ( $0.6 \pm 5.7$  % inhibition) whereas the whole hRPE-growth medium is completely heat-inactivated ( $100.0 \pm 0.0$  % inhibition) remains unclear at this point. The different elution time of fractions c47-49 and c60, together with their different sensitivity to heat and DTT, strongly argue for fraction c47-49 being different from fraction c60 and thus suggest that cultured human RPE cells contain at least two different intracellular PLA2 enzymes, as was reported for bovine RPE [4].



It is well established that sPLA2s but not cPLA2 can be acid-extracted without inactivation [42]. We therefore submitted PLA2-active fractions to H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment. As can be seen in Table 1, fractions c47-49 and c60, as well as the whole hRPE-cytosol were completely inactivated by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment ( $99.7 \pm 0.3$ ,  $100.0 \pm 0.0$  and  $100.0 \pm 0.0$  % inhibition, respectively). This suggests that RPE intracellular PLA2s are not members of the sPLA2 class of enzymes. In contrast, fraction m19-20 behaved similarly to sPLA2s because it was H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-resistant ( $16.4 \pm 10.6$  % inhibition). The explanation for hRPE-growth medium being completely inactivated by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment ( $100.0 \pm 0.0$  % inhibition) whereas m19-20 is acid-resistant is unclear, but it is possible that, because of the much higher protein content of hRPE-growth medium compared to m19-20 (Figure 3B), hRPE-growth medium PLA2 was non-specifically precipitated with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> denatured proteins. One should note that purified cPLA2 and sPLA2 (kindly donated by Dr. P. K. Weech, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire, Dorval, Quebec, Canada) were included in each experiment as a control.

#### 2.6.4 Human RPE intracellular PLA2 enzymes are different from sPLA2s, cPLA2 and iPLA2s but share similarities with bovine RPE PLA2s

A comparison between particular biochemical properties of human RPE intracellular PLA2s and known PLA2s can be drawn based on Table 2. It shows that: 1) fraction c47-49 is *p*BPB, EGTA, DTT, heat and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sensitive, whereas 2) fraction c60 is *p*BPB, EGTA, DTT and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sensitive, but heat-resistant. This suggests that these two enzymes are different from each other. 3) Fractions c47-49 and c60 PLA2s share some of the biochemical properties of both sPLA2s (inactivation by *p*BPB) and cPLA2 (denaturation by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). These findings indicate that RPE intracellular PLA2s are not entirely members of the sPLA2 nor of the cPLA2 class of enzymes. We thus conclude from Table 2 that there are two different intracellular PLA2s in cultured human RPE cells and that they would represent either a new class or group of PLA2s, similar to bovine PLA2s [4].

Another major feature of Table 2 is that human RPE fraction c60 and bovine fraction RPE-10 (characterized by Jacob *et al.* [4]) exhibit identical sensitivity to denaturing/inactivating treatments. Moreover, both were eluted with bound proteins on a

cation-exchange chromatography column. We thus hypothesize that fractions c60 and RPE-10 contain the same PLA2 enzyme. On the other hand, PLA2 from fraction c47-49 differs from bovine RPE-PLA2s. This difference could be due to inter-species variability. Table 2 also shows that m19-20 and group II sPLA2s behave similarly in response to the different treatments, suggesting that m19-20 PLA2 would be a member of group II sPLA2s.

#### 2.6.5 RPE-secreted PLA2 enzyme shares partial sequence similarity with both group I and group II sPLA2s

In order to better characterize hRPE-PLA2s, immunoblot experiments using a monoclonal antibody and several antisera directed against sPLA2s and cPLA2 were performed on hRPE-cytosol and hRPE-growth medium; pure sPLA2 and cPLA2 were systematically included in each experiment as a control. As shown in Table 3, none of the antisera nor antibody cross-reacted with hRPE-cytosol PLA2s, albeit minimum antisera and antibody dilution and maximum loading of proteins on the gel were used. Our results were highly reproducible, suggesting that hRPE-cytosol PLA2 enzymes share no sequence similarity with group I and group II sPLA2s, or with cPLA2. These findings thus strongly suggest that human RPE intracellular PLA2s are neither of the sPLA2 nor of the cPLA2

class of enzymes, and strengthen our conclusions from Tables 1 and 2 that human RPE intracellular PLA2s may have to be included in new classes or groups of PLA2s, as was reported for bovine RPE PLA2s [4].

Interestingly, Table 3 and Figure 5 show that an antiserum directed against porcine pancreatic group I sPLA2 and an antiserum directed against human synovial group II sPLA2 both immunoreacted with a ~22 kDa protein band from hRPE-growth medium. Given that hRPE-growth medium contains only one PLA2-active fraction (m19-20), it is likely that this ~22 kDa protein represents the m19-20 PLA2 enzyme. The ~22 kDa protein band strongly reacted with the antiserum directed against N-terminal residues of group II sPLA2 (Figure 5, lane A), whereas it reacted only weakly with the antiserum directed against group I sPLA2 (Figure 5, lane B). These results suggest that m19-20 would share higher amino acid sequence similarity with group II sPLA2s than with group I sPLA2s. Table 3 shows that the ~22 kDa protein band reacted with an antiserum directed against porcine pancreatic group I sPLA2 but not with the antiserum directed against N-terminal residues 1-17 of human pancreatic PLA2. This indicates that the N-terminal amino acid sequence of m19-20 PLA2 is different from that of human group I sPLA2s. We thus conclude that m19-20 PLA2 is not identical to group I sPLA2, although it shares some

sequence similarity with these enzymes. These findings are supported by the data presented in Tables 1 and 2 which indicate that, unlike group I sPLA2s [43], m19-20 PLA2 was inhibited by the sulfhydryl modifying agent DTT. Finally, Table 3 shows that the ~22 kDa protein band strongly cross-reacted with an antiserum directed against N-terminal (residues 1-14) but not C-terminal (residues 113-124) residues of human synovial sPLA2 (a member of group II sPLA2s). Similarly, it did not cross-react with a monoclonal antibody against this enzyme. This suggests that m19-20 shares limited sequence similarity with group II sPLA2s and thus, this enzyme would not be a member of group II sPLA2s.

It has already been pointed out that, up to now, antibodies raised against group II sPLA2 enzymes may not ensure discrimination between groups II and V sPLA2s [19]. We therefore hypothesize that m19-20 is a member of group V sPLA2s, considering that it shares sequence similarity with sPLA2 enzymes and that it is different from groups I and II sPLA2s. To our knowledge, there is no specific anti-group V sPLA2s antiserum or monoclonal antibody that would permit us to test this hypothesis. Similarly, the data presented in Tables 1 and 2 does not allow to discriminate groups II and V sPLA2s, since not enough data concerning the biochemical properties of group V sPLA2s is yet available to distinguish these two groups of enzymes. Immunochemical results thus indicate that

fraction m19-20 shares limited sequence similarity with group I sPLA2s and higher sequence similarity with group II sPLA2s. It is interesting to see how these results are in agreement with those reported for human brain and stomach PLA2s, which are members of group V sPLA2s. Indeed, the cDNA predicted amino acid sequences of these PLA2s were shown to present 30.5 % similarity with human group I sPLA2s and 40.6 % similarity with human group II sPLA2s [20]. Moreover, when these cDNA were cloned and expressed into human 293s cells, the PLA2 activity was seen to accumulate in the growth medium, thus suggesting that, like m19-20, human stomach and brain group V sPLA2s are cell-secreted. Altogether, the latter findings are strong arguments for hRPE-growth medium ~22 kDa PLA2 enzyme being a member of group V sPLA2. Importantly, however, considering the unusual apparent molecular weight of m19-20 PLA2 (~22 kDa) when compared to the other well-characterized sPLA2s (~14 kDa), it is also possible that m19-20 would represent a new group of sPLA2s that would have to be defined. As note, a protein band of 14 kDa apparent molecular weight was obtained with the sPLA2 control (data not shown).

In this investigation, we show that cultured human RPE cells contain at least two different intracellular PLA2 enzymes (found in fractions c47-49 and c60). One of them (c60 PLA2) is similar to bovine RPE-10 PLA2 previously reported by Jacob *et al.* [4].

Interestingly, all three PLA2s (c47-49, c60 and RPE-10) were shown to exhibit biochemical properties of both cPLA2 and sPLA2s at the same time, suggesting that all three enzymes are probably members of new classes or groups of PLA2s. RPE intracellular PLA2s should thus be specific to RPE cells, which is consistent with the fact that the eye is an immunologically closed organ due to the blood-ocular barrier, implying that retinal cells may have evolved expressing new classes or groups of PLA2s that would be specialized for RPE function. For example, it has been suggested that the lysosomes of RPE, which contain PLA2 enzymes, are specialized in their content of hydrolytic enzymes for the degradation of photoreceptor outer segments (POS) [44]. In this regard, one or both RPE intracellular PLA2s may be lysosomal enzymes responsible for the degradation of the phagocytized POS disk membrane phospholipids. These phospholipids are unusually rich in polyunsaturated fatty acids and it is noteworthy that docosahexaenoic acid (DHA, 22:6w3) represents more than 50% of these fatty acids [45]. It has previously been established that DHA from phagocytized POS is recycled from the RPE cells back to the photoreceptor inner segments, where it is reacylated; the resulting phospholipids are then transported to the base of the POS, where they are incorporated into assembling disk membranes [46]. RPE intracellular PLA2s could thus be involved in the recycling of these highly unsaturated fatty acids. However, such a high proportion of DHA renders the POS disk membrane phospholipids particularly vulnerable to peroxidation [47]. It is therefore

essential that peroxidized DHA is hydrolyzed and eliminated by the RPE cells. RPE intracellular PLA2s could thus play an important role in the hydrolysis of peroxidized DHA from phagocytized POS phospholipids. To support this hypothesis, PLA2 activity was reported to be 2 to 3-fold higher when peroxidized phospholipids were used as a substrate [48]. It then becomes obvious that malfunctioning of one or both intracellular RPE-PLA2s could lead to recycling of the peroxidized polyunsaturated fatty acids and, eventually, to retinal degeneration.

This paper also reports the first evidence that cultured human RPE cells actively secrete a PLA2 enzyme with an apparent molecular weight of approximately 22 kDa, which exhibits sensitivity to denaturing/inactivating treatments corresponding to group II (or maybe group V) sPLA2 enzymes. This secreted PLA2 would share limited amino acid sequence similarity with group I sPLA2s and higher sequence similarity with group II sPLA2s. Further investigations will be needed to determine whether it would be a member of group V sPLA2s or otherwise be part of a new group of sPLA2s. Secreted RPE PLA2s could be involved in the mechanism of POS disk shedding (for a review, see [49-50]), prior to their phagocytosis by RPE cells (for a review, see [51-52]). Interestingly, it has been demonstrated that pre-treatment of rod outer segments with PLA2 results in a five-fold,



dose-dependent increase in the initial rates of disk membrane-plasma membrane fusion [53]; this fusion event would be critical for the formation of disk membrane packets at the distal end of the POS, prior to their phagocytosis by the RPE cells. In this regard, we speculate that malfunctioning of the RPE secreted enzyme could lead to retinal degeneration, since the RCS rats, in which the process of phagocytosis is defective, suffer from retinal degeneration [54].

## 2.7 Acknowledgements

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Fonds FCAR), and Fonds pour la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) for financial support. C.V.T. is supported by a scholarship from the Fonds FCAR.

## 2.8 Références

- 1 Marmor, M. F. and Wolfensberger, T. J. (1998) The retinal pigment epithelium, Oxford University Press, New York, pp. 152-172
- 2 Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J.-M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S. Y., Harris, E., Redmond, T. M., Arnaud, B., Claustres, M. et Hamel, C. P. (1997) *Nature Genetics* **17**, 139-141
- 3 Marlhens, F., Griffoin, J.-M., Bareil, C., Arnaud, B., Claustres, M. and Hamel, C. P. (1998) *Eur. J. Hum. Genet.* **6**, 527-531
- 4 Jacob, M., Weech, P. K. and Salesse, C. (1997) *Biochem. J.* **327**, 455-460
- 5 Waite, M. (1987) in *The Phospholipases. Handbook of Lipid Research*, Vol. 5 (Hanahan, D. J., ed) Plenum Press, New York
- 6 van den Bosch, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **604**, 191-246
- 7 Venable, M. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1993) *J. Lipid. Res.* **34**, 691-702
- 8 Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowitz, J. B. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 69-102
- 9 Jayadev, S., Linardic, M. and Hannun, Y. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5757-5763

- 10 Hayakawa, M., Ishida, N., Takeuchi, K., Shibamoto, S., Hori, T., Oku, N., Ito, F. and Tsujimoto, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11290-11295
- 11 Ackermann, E. J. and Dennis, E. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1259**, 125-136
- 12 Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. and Lin, L.-L. (1995) *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **12**, 83-117
- 13 Tishfield, J. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17247-17250
- 14 Mayer, R. J. and Marshall, L. A. (1993) *FASEB J.* **7**, 339-348
- 15 Grataroli, R., De Caro, A., Guy, O., Amic, J. and Figarella, C. (1981) *Biochimie (Paris)* **63**, 677-684
- 16 Mukherjee, A. B., Miele, L. and Pattabiraman, N. (1994) *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1-10
- 17 Kramer, R. M. (1993) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**, 81-89
- 18 Balboa, M. A., Balsinde, J., Winstead, M. V., Tishfield, J. A. and Dennis, E. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32381-32384
- 19 Reddy, S. T., Winstead, M. V., Tishfield, J.A. and Herschman, H. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13591-13596
- 20 Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J. and Tishfield, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2365-2368

- 21 Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J. and Tishfield, J. A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 115-120
- 22 Takayama, K., Kudo, I., Kim, D. K., Nagata, K., Nozawa, T. and Inoue, K. (1991) *FEBS Lett.* **282**, 326-330
- 23 Wijkander, J. and Sundler, R. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 873-880
- 24 Clark, J. D., Milona, N. and Knopf, J. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7708-7712
- 25 Smith, W. L., Marnett, L. J. and De Witt, D. L. (1991) *Pharmacol. Ther.* **49**, 153-179
- 26 Thomson, F. J. and Clark, M. A. (1995) *Biochem. J.* **306**, 305-309
- 27 Buhl, W. J., Eisenlohr, L. M., Preuss, I. and Gehring, U. (1995) *Biochem. J.* **311**, 147-153
- 28 Soubeyrand, S., Khadir, A., Brindle, Y. and Manjunah, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 222-227
- 29 Pfeffer, B. A. (1991) *Prog. Retinal Res.* **10**, 251-291
- 30 Tennant, J. (1964) *Transpl.* **2**, 685-694
- 31 Humt, R. C. and Davis, A. (1990) *J. Cell Physiol.* **145**, 187-199
- 32 Bayburt, T., Yu, B. Z., Street, I., Ghomashchi, F., Laliberté, F., Perrier, H., Wang, Z., Jain, M. K. and Gelb, M. H. (1995) *Anal. Biochem.* **232**, 7-23
- 33 Miljanich, G. P. (1978) Ph.D. Thesis, University of California

- 34 Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 35 Bollag, D. M. and Edelstein, S. J. (1991) in *Protein Methods*, Wiley-Liss, ed., pp.56-59
- 36 Cockcroft, S. and Thomas, G. M. H. (1992) *Biochem J.* **288**, 1-14
- 37 Rhee, S. G., Suh, P.-H., Ryu, S.-H. and Lee, S. Y. (1989) *Science* **244**, 546-550
- 38 Reynolds, L., Hugues, L., Louis, A. I., Kramer, R. A. and Dennis, E. A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1167**, 272-280
- 39 Sharp, J. D., Pickard, R. T., Chiou, X. G., Manetta, J. V., Kovacevic, S., Miller, J. R., Varshavsky, A. D., Roberts, E. F., Striffler, B. A., Brems, D. N. and Kramer, R. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23250-23254
- 40 Aarsman, A. J., Roosenboom, C. F. P., van Geffen, G. E. W. and van den Bosch, H. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **837**, 288-295
- 41 Nishijima, J., Okamoto, M., Ogawa, M., Kosaki, G. and Yamano, T. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)* **94**, 137-147
- 42 Apitz-Castro, R. J., Mas, M. A., Cruz, M. R. and Jain, M. K. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 63-71
- 43 Bennett, C. F., Mc Carte, A. and Crooke, S. T. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1047**, 271-283
- 44 Zimmerman, W. F., Godchaux III, W. and Belkin, M. (1983) *Exp. Eye Res.* **36**, 151-158

- 45 Salesse, C., Boucher, F. and Leblanc, R. M. (1984) *Anal. Biochem.* **142**, 258-266
- 46 Bazan, N. G., Gordon, W. C. and Rodriguez de Turco, E. B. (1992) *Adv. Exp. Med. Biol.* **318**, 295-306
- 47 van Kuijk, F. J. G. M., Sevanian, A., Handelman, G. J. and Dratz, E. A. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 31-34
- 48 Sevanian, A. and Kim, E. (1985) *J. Free Radicals Biol. Med.* **1**, 263-271
- 49 Young, R. W. (1971) *J. Ultrastruct. Res.* **34**, 190-203
- 50 Williams, D. S. and Fisher, S. K. (1987) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 184-187
- 51 Edwards, R. B. and Szamier, R. B. (1977) *Science* **197**, 1001-1003
- 52 Chaitin, M. H. and Hall, M. O. (1983) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**, 812-820
- 53 Boesze-Battaglia, K. (1994). *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **35**, 2139.
- 54 Bok, D. and Hall, M. O. (1971) *J. Cell Biol.* **49**: 664-682

## 2.9 Tables and Figures

Table 2.1 Effects of *p*BPB, EGTA, DTT, heat and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on RPE-PLA2 activity†

Fractions	PLA2 activity (% of control)				
	<i>p</i> BPB	EGTA	DTT	Heat	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
hRPE-cytosol	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	71.9 ± 8.4	63.9 ± 6.7	0.0 ± 0.0
c47-49	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	73.0 ± 0.5	56.3 ± 5.8	0.3 ± 0.3
c60	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	58.4 ± 5.8	84.5 ± 12.2	0.0 ± 0.0
hRPE-growth medium	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	27.9 ± 7.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
m19-20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	22.8 ± 7.0	99.4 ± 5.7	83.6 ± 10.6

† Aliquots of PLA2-active fractions were either heated to 60°C or treated with *p*BPB, EGTA, DTT or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> prior to PLA2 activity assay. PLA2 activity is expressed as a percentage of control PLA2 activity (in presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup>). The results are means ± S.D. of duplicates from two separate experiments.

Table 2.2 Comparison between the biochemical properties of sPLA2, cPLA2, iPLA2, as well as human and bovine RPE PLA2s

	<i>p</i> BPB	Ca <sup>2+</sup> /EGTA	DTT	Heat	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
sPLA2s †	+	+	+/+*	–	–
cPLA2 †	–	+	–	+	+
iPLA2s †	–	–	–	+	n.a.
c47-49	+	+	+	+	+
c60	+	+	+	–	+
m19-20	+	+	+	–	–
RPE-1‡	+	+	–	–	+
RPE-10‡	+	+	+	–	+

\* Group-I sPLA2s are DTT-resistant whereas group-II sPLA2s are DTT-sensitive

† See references [11-14] for reviews on the characteristics of sPLA2s, cPLA2 and iPLA2s.

n.a. not available

‡ Data on RPE-1 and RPE-10 are presented in reference [4]



Table 2.3 Reactivity of RPE-PLA2s with different PLA2 antisera

Reactivity of hRPE-cytosol and hRPE-medium protein samples (35 µg total proteins/lane) was examined with antisera against type-I and type-II sPLA2s and against cPLA2

Reactivity with antisera against :							
	Type-I sPLA2s		Type-II sPLA2		cPLA2		
	Porcine pancreatic PLA2, whole protein	Human pancreatic PLA2, residues 1-17	Human synovial PLA2, whole protein	Residues 1-14	Residues 113-124	Residues 54-66	Residues 731-749
PLA2- active fraction							
hRPE- cytosol	–	–	–	–	–	–	–
hRPE- medium	+	–	–	+	–	–	–

† Monoclonal antibody

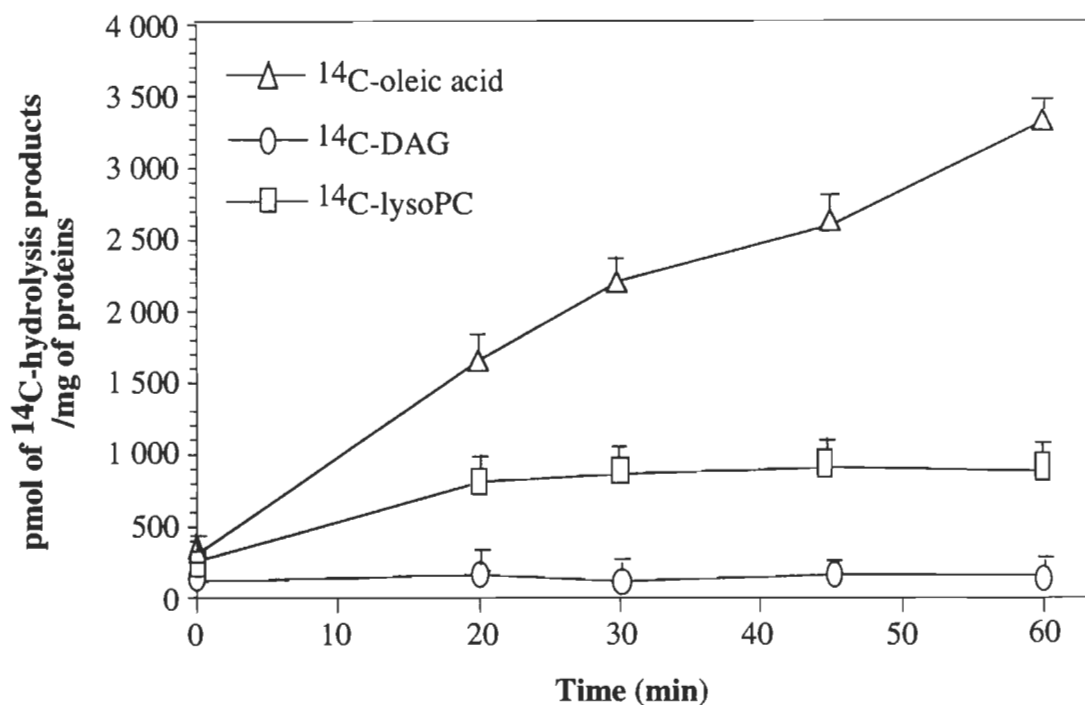


Figure 2.1 Discrimination between PLA2 and PLC activity in hrPE-cytosol by bf-TLC

Aliquots of hrPE-cytosol were incubated for different periods of time with [ $^{14}\text{C}$ ]DOPC + DMPM as a substrate. Hydrolysis products were extracted, separated by bf-TLC, identified, scraped and quantified. Concomitant production of [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid and [ $^{14}\text{C}$ ]lysoPC would reflect PLA2 activity, production of [ $^{14}\text{C}$ ]DAG would reflect PLC activity, whereas a decrease in the amount of [ $^{14}\text{C}$ ]DAG associated with an increase in the amount of [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid would reflect PLC coupled to DAG lipase activity. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicates from three separate experiments.

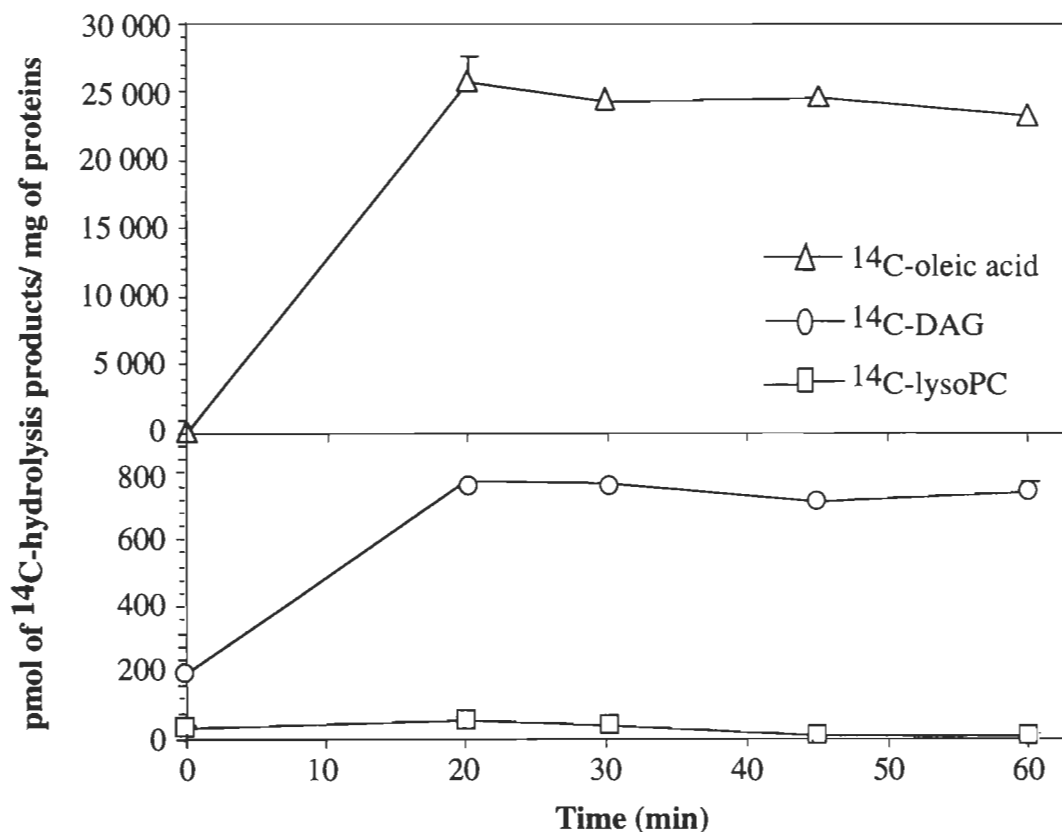


Figure 2.2 Discrimination between PLA2 and PLC activity in hrPE-growth medium by bf-TLC

Hydrolysis products extracted from hrPE-growth medium were separated using bf-TLC as described in Figure 1. The production of [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid is shown on a separate scale to allow visualization of the variation of the amounts of [ $^{14}\text{C}$ ]DAG and [ $^{14}\text{C}$ ]lysoPC over time. These results are means  $\pm$  S.D. of triplicates from three separate experiments.

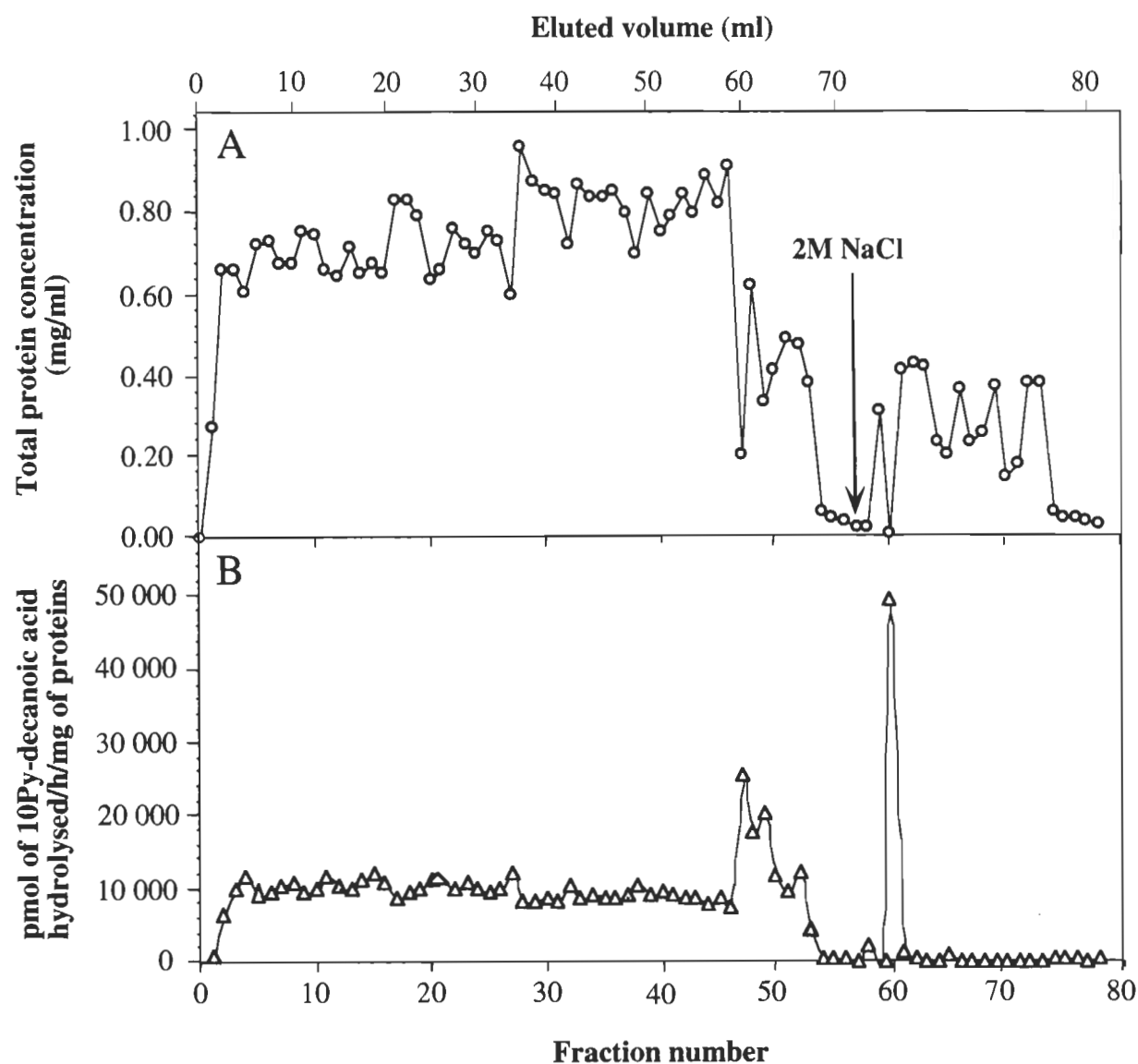


Figure 2.3 Cation-exchange chromatography of hRPE-cytosol

hRPE-cytosol (48.5 mg total proteins in 62 ml total) was applied on a 1 ml Hi-Trap SP column. After elution of unbound proteins with PBS 1X pH 6.0, bound proteins were eluted with 2M NaCl, as indicated by the arrow. Flow rate was 1 ml/min. Aliquots of eluted fractions were assayed for PLA2 activity using 10PyPM. Incubation time was 30 min. PLA2 activity is expressed as pmol of 10Py-decanoic acid hydrolyzed/mg proteins. (A) Protein elution profile. (B) PLA2 activity elution profile.

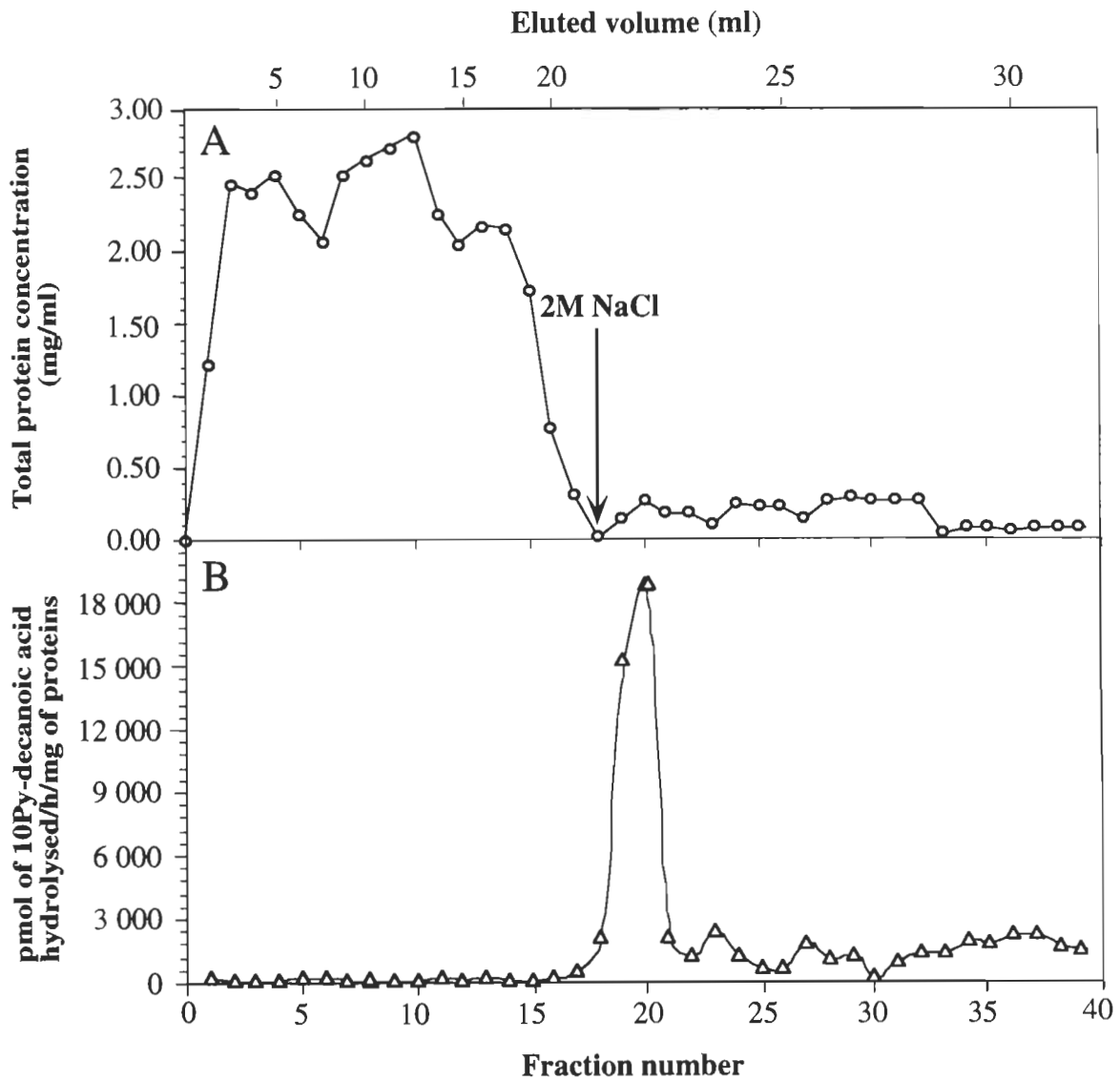


Figure 2.4 Cation-exchange chromatography of hRPE-growth medium

hRPE-growth medium (48.5 mg total proteins in 17 ml total) was applied on a 1 ml Hi-Trap SP column and eluted as described in Figure 3. (A) Protein elution profile. (B) PLA2 activity elution profile.

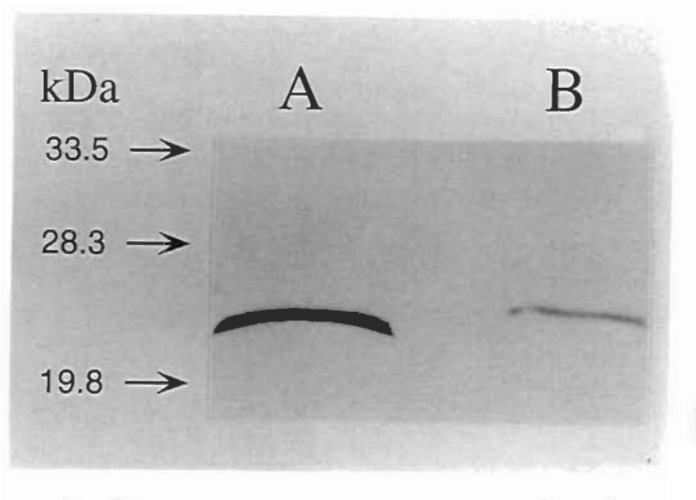


Figure 2.5 Immunoblot analysis

Blots using hRPE-growth medium (35  $\mu$ g total protein/lane) were probed (see Table 3) with an antiserum directed against N-terminal residues 1-14 of human synovial group II sPLA<sub>2</sub> (lane A) or with an antiserum directed against porcine pancreatic group I sPLA<sub>2</sub> (lane B). Apparent molecular weights were determined using biotinylated SDS-PAGE standards from Bio-Rad.

### CHAPITRE 3

### CONCLUSION

### 3.1 Récapitulation des résultats et conclusions

Dans le but de caractériser les PLA2 des cellules en culture de l'EPR humain, il importait d'abord d'obtenir les fractions cellulaires pouvant contenir ces enzymes. A partir des cellules cultivées de plusieurs donneurs différents nous avons donc préparé des extraits cytosoliques, le mélange desquels a été appelé 'hRPE-cytosol'. Nous avons également recueilli le milieu de culture ayant été en contact avec les cellules cultivées pendant 48 à 72 heures; l'ensemble des milieux de cultures ainsi obtenus ont été combinés pour former 'hRPE-milieux'. Ainsi, hRPE-cytosol contenait les protéines cytosoliques et celles qui sont faiblement liées aux membranes cellulaires, alors que hRPE-milieux contenait les protéines qui sont sécrétées par les cellules cultivées en plus de celles déjà présentes dans le milieu de culture lui-même. Des tests d'activité PLA2 subséquents ont démontré la présence d'une grande activité PLA2 dans hRPE-cytosol et dans hRPE-milieux. Conséquemment, l'activité PLA2 contenue dans hRPE-cytosol avait une origine intracellulaire tandis que l'activité PLA2 caractérisée à partir de hRPE-milieux provenait soit d'une sécrétion active de PLA2 par les cellules de l'EPR en culture, soit des suppléments nutritifs présents dans le milieu de culture lui-même. À cet égard, le seul supplément du milieu de culture utilisé qui pouvait contenir une activité PLA2 était le sérum de veau. Des tests d'activité ont en effet démontré la présence d'une faible activité PLA2 dans le sérum pur, qui ne représente que



4% de l'activité PLA2 totale présente dans hRPE-milieux. Par conséquent, nous pouvons raisonnablement conclure que l'activité PLA2 de hRPE-milieux provient d'une sécrétion enzymatique active par les cellules de l'EPR en culture.

Avant de poursuivre la caractérisation des PLA2 des fractions cellulaires hRPE-cytosol et hRPE-milieux, il importait de s'assurer que l'augmentation d'acides gras mesurée lors des tests d'activité PLA2 résultait bien d'une activité PLA2. En effet, l'activité combinée d'une phospholipase C (PLC) et d'une diacylglycérol lipase (DAG lipase), deux enzymes ubiquitaires dans les cellules et tissus de mammifères (Cockcroft et Thomas, 1992; Rhee et Choi, 1992), résulte également en la libération d'acides gras. Une chromatographie 'avant-arrière' sur couche mince nous a alors permis de séparer les différents produits d'hydrolyse des phospholipides membranaires par l'action de hRPE-cytosol et hRPE-milieux. Dans le cas de hRPE-cytosol autant que celui de hRPE-milieux, les résultats ont démontré l'absence d'activité PLC/DAG lipase (Figures 2.1 et 2.2), ce qui nous a permis de conclure que, lors des tests d'activité PLA2, nous détectons exclusivement une activité phospholipase A2; de plus, ces résultats confirmaient la présence de phospholipases A2 dans le cytosol et dans le milieu de culture des cellules de l'EPR humain.

La deuxième étape de la caractérisation des PLA2 de l'EPR humain consistait en une purification partielle de ces enzymes. Pour ce faire, nous avons procédé à une chromatographie d'échange de cations de hRPE-cytosol et de hRPE-milieux (Figures 2.3 et 2.4); cette technique de séparation des protéines allait nous permettre d'obtenir des fractions enrichies en PLA2. Ainsi, l'élution de hRPE-cytosol sur une colonne échangeuse de cations a permis de séparer deux fractions PLA2-actives, soit la fraction c47-49 qui a été éluée avec les protéines ne liant pas la colonne et la fraction c60, qui a été éluée parmi les protéines liant la colonne en augmentant la force ionique de l'éluant. Parce que l'activité PLA2 de chacune des deux fractions était concentrée dans un très petit volume élué et étant donné la très grande résolution de la chromatographie utilisée, nous avons conclu que les fractions c47-49 et c60 ne contenaient chacune probablement qu'un seul type de PLA2. L'étape suivante consistait en la caractérisation des propriétés biochimiques des fractions c47-49 et c60, en les prétraitant avec les agents dénaturants/inactivateurs BpBP, EGTA, DTT, chaleur (60°C) et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis en comparant leur activité PLA2 avant et après chacun de ces traitements (voir le tableau 2.1). Nous avons ainsi déterminé que les fractions c47-49 et c60 sont toutes deux sensibles à l'effet de chacun de ces agents dénaturants/inactivateurs; cependant, la fraction c60 se distingue biochimiquement de la fraction c47-49 parce qu'elle est thermo-résistante. Etant donné que les fractions c47-49 et c60 ont démontré des temps d'élution différents lors de la chromatographie d'échange de cations (ce qui traduit une

différence d'affinité pour l'échangeur de cations) et puisque ces deux fractions présentent une différence biochimique non négligeable (la première étant sensible à la chaleur tandis que la deuxième est thermo-résistante), nous avons conclu qu'il s'agissait de deux enzymes distinctes.

La comparaison des comportements des fractions c47-49 et c60 avec ceux des sPLA2, cPLA2 et iPLA2 en réponse aux différents traitements dénaturants (tableau 2.2) nous a permis de procéder à une classification partielle des PLA2 intracellulaires de l'EPR. Ainsi, nous avons observé qu'en plus de leur dépendance au calcium, les fractions c47-49 et c60 présentent d'autres propriétés biochimiques différentes de celles des iPLA2, ce qui nous a amenés à conclure d'emblée qu'elles ne font pas partie de cette classe de PLA2. Nous avons aussi remarqué que les fractions c47-49 et c60 présentent des propriétés biochimiques à la fois des sPLA2 et des cPLA2, ce qui suggère que ces enzymes ne font pas partie de ces deux classes d'enzymes. Nous pensons donc qu'il pourrait s'agir de membres de nouveaux groupes de sPLA2 ou de cPLA2, ou encore de nouvelles classes de PLA2 qu'il faudrait définir.

Il était également intéressant de comparer les propriétés biochimiques des PLA2 intracellulaires de l'EPR humain (provenant des fractions c47-49 et c60) avec celles de l'EPR bovin (provenant des fractions RPE-1 et RPE-10) (Jacob *et al.*, 1997). Nous avons alors remarqué que les fractions c60 et RPE-10 possédaient les mêmes propriétés biochimiques; de plus, ces deux PLA2 ont été éluées parmi les protéines liant la colonne lors des chromatographies d'échange de cations, ce qui souligne la similitude de leur affinité pour l'échangeur de cations utilisé. Nous croyons donc que les fractions c60 et RPE-10 contiendraient en fait la même PLA2. Quand à la fraction c47-49, la PLA2 qu'elle contient présente des différences biochimiques avec les PLA2 des fractions RPE-1 et RPE-10, ce qui suggère fortement qu'il s'agit d'enzymes différentes. Les différences entre les propriétés biochimiques des PLA2 caractérisées dans le cadre du présent travail et celles rapportées par Jacob *et al.* (1997) peuvent être attribuées à la variabilité inter-espèces (humaine versus bovine, respectivement) et au fait que nous avons travaillé dans des conditions *in vitro*, c'est-à-dire avec des cellules en culture de l'EPR, tandis que ces auteurs ont travaillé dans des conditions *in situ*, c'est-à-dire avec des cellules de l'EPR immédiatement après leur récolte. Toutefois, il est à noter que la méthode expérimentale utilisée par Jacob *et al.* (1997) pour récolter les cellules de l'EPR, dite méthode 'de brossage', favorise la contamination de la préparation des cellules de l'EPR par d'autres types de cellules, par exemple des fibroblastes et des mélanocytes.

L'élution de hRPE-milieux sur une colonne échangeuse de cations nous a permis d'obtenir une seule fraction PLA2-active, que nous avons appelée m19-20. Cette fraction a été éluée parmi les protéines liant la colonne et contenait une très grande activité PLA2 spécifique. Dans ce cas-ci également, parce que toute l'activité PLA2 a été concentrée dans un très petit volume élué et parce que la chromatographie d'échange de cations présente un grand niveau de résolution, nous avons conclu qu'un seul type de PLA2 était contenu dans la fraction m19-20. Puisque nous avons préalablement établi que l'activité PLA2 présente dans hRPE-milieux provient d'une sécrétion active par l'EPR, nous concluons que la PLA2 de la fraction m19-20 est sécrétée par les cellules de l'EPR en culture.

En comparant le comportement de m19-20 avec celui des sPLA2, cPLA2 et iPLA2 en réponse aux différents traitements dénaturants/inactivateurs (tableau 2.2), plusieurs différences étaient notables entre les propriétés biochimiques de m19-20 et celles des iPLA2. Ainsi, il apparaissait évident que m19-20 ne fait pas partie de cette classe de PLA2. Au contraire, m19-20 présente les mêmes caractéristiques biochimiques que les sPLA2 du groupe II, ce qui suggère que la PLA2 de hRPE-milieux pourrait appartenir à ce groupe d'enzymes. A première vue, il nous a semblé tout à fait logique que la PLA2 sécrétée par les cellules de l'EPR appartienne à ce groupe de PLA2, puisque qu'il est bien connu que les

enzymes appartenant à la classe des sPLA2 sont pour la plupart sécrétées extracellulairement, dans des conditions *in vivo* autant que *in vitro* (Tishfield, 1997), alors que la cPLA2 est toujours localisée intracellulairement (Clark et al., 1991). Toutefois, il a récemment été démontré que les critères de caractérisation biochimique utilisés dans notre étude, ainsi que dans plusieurs autres études, ne permettent pas d'affirmer avec certitude que des enzymes présentant les caractéristiques biochimiques propres aux sPLA2 du groupe II font réellement partie de ce groupe de PLA2 (Reddy *et al.*, 1997; Tishfield, 1997). En effet, il semble que les sPLA2 du groupe V possèdent des propriétés fonctionnelles très semblables et, pour l'instant, les seules différences connues entre les deux groupes de sPLA2 résident dans le nombre d'acides aminés, de résidus cystéine et de ponts disulfure. Ces caractéristiques ne pouvaient pas être investiguées dans le cadre de notre étude puisque, pour ce faire, il faut purifier l'enzyme jusqu'à homogénéité, tandis que nous travaillions avec des enzymes partiellement purifiées.

Après avoir procédé à une caractérisation fonctionnelle des PLA2 de l'EPR, nous avons voulu déterminer s'il existait des homologues de séquence en acides aminés entre ces enzymes et les sPLA2 ou la cPLA2. Pour ce faire, nous avons effectué des immunobuvardages de type Western, au cours desquels nous avons recherché la présence

de réactions croisées entre des antisérums et un anticorps monoclonal dirigés contre différents peptides de la cPLA2 et des groupes I et II des sPLA2s et les échantillons protéiques du hRPE-cytosol et du hRPE-milieux (Tableau 2.3). Nous avons ainsi remarqué l'absence de réactions croisées entre l'anticorps monoclonal ainsi que tous les antisérums testés et les protéines de hRPE-cytosol, ce qui suggérerait que les PLA2 contenues dans hRPE-cytosol (en l'occurrence c47-49 et c60) ne font pas partie des classes sPLA2 ni cPLA2, mais plutôt de nouvelles classes de PLA2 ou encore de nouveaux groupes de sPLA2 et/ou de cPLA2 qu'il faudrait définir.

Lors des immunobuvardages de type Western de hRPE-milieux, nous avons observé qu'une bande protéique d'environ 22 kDa réagissait faiblement avec un antisérum dirigé contre une sPLA2 du groupe IB (Figure 2.5). De plus, il apparaissait que cette bande protéique réagissait avec un antisérum dirigé contre la séquence N-terminale d'une sPLA2 du groupe IIA. Etant donné qu'une seule bande protéique de hRPE-milieux a réagi avec des antisérums dirigés contre des PLA2 et, puisque nous avons établi auparavant que hRPE-milieux contenait un seul type de PLA2 (nommément m19-20), nous croyons que cette bande d'environ 22 kDa correspond à m19-20. Cependant, puisque m19-20 n'a pas réagi avec un antisérum dirigé contre la séquence N-terminale (résidus 1 à 17) d'une PLA2

humaine appartenant au groupe 1B, m19-20 ne fait pas partie de ce groupe d'enzymes; de même, m19-20 n'a pas réagi avec un anticorps monoclonal dirigé contre la séquence C-terminale de la PLA2 du groupe IIA alors qu'il a réagi avec la séquence N-terminale de cette PLA2, ce qui indique que m19-20 ne fait pas partie non plus de ce groupe d'enzymes. Les résultats des immunobuvardages de type western ont ainsi suggéré que m19-20 présente une faible homologie de séquence avec les sPLA2 du groupe I et une plus grande homologie avec les sPLA2 du groupe II, tout en excluant la possibilité que m19-20 puisse faire partie intégrante d'un de ces deux groupes de sPLA2. Il semble donc que la structure primaire de m19-20 s'apparente à celle des sPLA2, mais puisqu'elle ne fait pas partie des groupes I ni II, cette enzyme pourrait faire partie du groupe V, le seul autre groupe de sPLA2 connu qui contient des PLA2 de mammifères.

Il est important de mentionner ici que l'anticorps et les antisérums dirigés contre des éléments de séquence des sPLA2 du groupe II qui ont été préparés jusqu'à aujourd'hui ne sont pas absolument spécifiques à ce groupe puisqu'ils ne permettent pas de discriminer avec certitude les sPLA2 des groupes II et V (Reddy *et al.*, 1997). Cela implique donc que la réaction croisée observée entre l'antisérum dirigé contre la séquence N-terminale des sPLA2 du groupe II et m19-20 n'est pas une preuve expérimentale que m19-20 contient



une séquence en acides aminés propre aux sPLA2 du groupe II; il pourrait plutôt s'agir d'une séquence homologue caractéristique des sPLA2 du groupe V. Ceci renforce notre hypothèse selon laquelle m19-20 pourrait faire partie des sPLA2 du groupe V. Il n'existe toutefois pas, à ce jour, d'anticorps dirigé spécifiquement contre une séquence en acides aminés de ce groupe d'enzymes qui aurait pu nous permettre de vérifier cette possibilité. Néanmoins, cette hypothèse, basée sur l'observation que m19-20 présente une faible homologie de séquence avec les sPLA2 du groupe I et une plus grande homologie avec les sPLA2 du groupe II, est très plausible, parce qu'elle correspond bien avec les caractéristiques des PLA2 de l'estomac et du cerveau humain, qui appartiennent aux sPLA2 du groupe V. En effet, la séquence en acides aminés qui a été prédite à partir de leur ADN complémentaire présente 30.5% d'homologie avec les sPLA2 du groupe I et 40.6% d'homologie avec les sPLA2 du groupe II (Chen *et al.*, 1994). De plus, lorsque ces ADN complémentaires ont été clonés et exprimés dans les cellules humaines 293s, l'activité PLA2 a été détectée dans le milieu de culture. Ainsi, les sPLA2 du groupe V peuvent être sécrétées extracellulairement, comme l'est m19-20. Toutefois, en considérant son poids moléculaire apparent d'environ 22 kDa, il semble que m19-20 ne puisse pas faire partie des sPLA2 du groupe V tel qu'actuellement défini, puisque les PLA2 de ce groupe ont un poids moléculaire significativement plus faible d'environ 14 kDa (Tishfield, 1997). Ce résultat expérimental nous porte donc à croire que m19-20 pourrait également faire partie d'un

nouveau groupe de sPLA2 qu'il faudrait définir. A cet égard, une caractérisation fonctionnelle et immunochimique plus poussée des PLA2 de l'EPR et des nouvelles PLA2 récemment rapportées, de même que des sPLA2 des groupes II et V, devra être entreprise. Ceci permettra de raffiner nos connaissances de chacun de ces types d'enzymes afin de bien définir et délimiter les différents groupes et classes de PLA2.

En résumé, les cellules en culture de l'EPR humain contiennent au moins deux PLA2 intracellulaires différentes, soit c47-49 et c60; cette dernière semble être l'homologue de la PLA2 bovine RPE-10. Ces trois PLA2 présentent des caractéristiques biochimiques propres aux sPLA2 et aux cPLA2 à la fois; de plus, c47-49 et c60 ne présenteraient pas d'homologie de séquence avec les sPLA2 ni les cPLA2. L'ensemble de ces observations suggère donc que les PLA2 de l'EPR sont de nouveaux types de PLA2, qui pourraient être spécifiques à ces cellules. En effet, dû à la présence de la barrière sang-oculaire, l'œil constitue un organe fermé et les cellules de l'EPR et du reste de la rétine ont pu évoluer en exprimant des types particuliers d'enzymes qui seraient spécialisés pour la fonction de ce tissu. Ainsi, par exemple, il a été suggéré que les lysosomes des cellules de l'EPR contiendraient des enzymes hydrolytiques spécialisées dans la dégradation des segments externes des photorécepteurs phagocytés (Zimmerman *et al.*, 1983). Les cellules

en culture de l'EPR humain sécrètent également une PLA2 (m19-20): celle-ci, d'un poids moléculaire apparent d'environ 22 kDa, possède les caractéristiques biochimiques des sPLA2 des groupes II (qui sont peut-être les mêmes que celles du groupe V) et présentent davantage d'homologie de séquence avec les sPLA2 du groupe II (qui sont peut-être les mêmes que celles du groupe V) qu'avec les sPLA2 du groupe I. Nous croyons donc que cette PLA2 extracellulaire pourrait faire partie des sPLA2 du groupe V, ou encore d'un nouveau groupe de sPLA2 si on en juge par son poids moléculaire qui est significativement supérieur à celui qui caractérise les sPLA2.

### 3.2 Rôles possibles des PLA2 intracellulaires de l'EPR

Les extraits cytosoliques que nous avons préparés contiennent des protéines qui *in situ* étaient: 1) solubles dans le liquide cytosolique, 2) faiblement liées aux membranes organique ou plasmique, ou 3) situées à l'intérieur des organites cellulaires. La fonction des PLA2 intracellulaires c47-49 et c60 dépend nécessairement de leur localisation cellulaire; ainsi, nous suggérons 3 rôles possibles de ces enzymes en tenant compte des différentes localisations cellulaires envisagées.

### 3.2.1 Implication des PLA2 de l'EPR dans le processus de déacylation-réacylation des phospholipides membranaires de l'EPR

Tel que décrit dans l'introduction du présent travail, les dommages oxydatifs causés par la peroxydation des lipides membranaires sont reconnus pour altérer la structure et la fonction membranaire. La peroxydation lipidique dans les cellules de l'EPR résulte de la combinaison de plusieurs facteurs. D'abord, les acides gras polyinsaturés qui composent une partie non négligeable des membranes organique et plasmique sont particulièrement susceptibles à la peroxydation (van Kuijk *et al.*, 1987). Ensuite, la consommation d'oxygène nécessaire aux réactions métaboliques cellulaires génère la production et le relargage de radicaux libres et d'espèces très réactives tels que les radicaux hydroxyl ( $\text{OH}\cdot$ ) et superoxyde ( $\text{O}_2\cdot$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Berman, 1991). De plus, l'irradiation de la mélanine avec la lumière UV ou visible promouvoit la consommation d'oxygène et résulte en la formation de radicaux superoxyde et hydroxyl et de peroxyde d'hydrogène (Felix *et al.*, 1978; Crippa et Mazzini, 1983). Les cellules de l'EPR sont particulièrement riches en antioxydants tels que la vitamine E, la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Handelman *et al.*, 1991). Ces antioxydants représentent un important mécanisme de protection cellulaire contre les dommages causés par la peroxydation lipidique.

Un autre mécanisme cellulaire de protection des membranes contre les dommages causés par la peroxydation des acides gras est le processus de déacylation-réacylation des phospholipides membranaires. Un mécanisme de déacylation-réacylation impliqué dans la réparation des membranes lipidiques peroxydées a été proposé par van Kuijk *et al.* en 1987. Dans ce modèle, l'hydrolyse des lipides peroxydés par une PLA2 résulte en l'excision des acides gras peroxydés qui seront ensuite réduits, réparés et réestérifiés. En effet, étant donné que les acides gras polyinsaturés, particulièrement susceptibles à la peroxydation, sont majoritairement acylés à la position sn-2 des phospholipides, les PLA2 constituent une voie enzymatique de choix pour les hydrolyser et ainsi contribuer au maintien de l'intégrité membranaire. A cet égard, il a été démontré que les PLA2 hydrolysent préférentiellement les lipides peroxydés (Sevanian et Kim, 1985; Sevanian et McLeod, 1987). Ainsi, dans des mélanges lipidiques, la vitesse d'hydrolyse des lipides peroxydés par la PLA2 est environ 2 à 3 fois supérieure à celle des lipides non oxydés (Sevanian et Kim, 1985).

Par conséquent, nous croyons que si les PLA2 des fractions c47-49 et c60 sont faiblement liées aux membranes organique ou plasmique, elles pourraient être impliquées dans un processus de déacylation-réacylation visant à protéger les membranes organique ou plasmique contre les dommages causés par la peroxydation lipidique qui a lieu dans les

cellules de l'EPR. Nous pensons qu'il est également possible que les PLA2 des fractions c47-49 et c60 jouent un rôle dans le processus inflammatoire si elles sont initialement libres dans le cytosol, en supposant que, comme pour la cPLA2, un événement tel que l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium provoque leur translocation aux membranes (Channon et Leslie, 1990; Clark *et al.*, 1991), ce qui leur permettrait de s'attacher à leur substrat phospholipidique pour en hydrolyser les acides gras peroxydés.

### 3.2.2 Implication des PLA2 de l'EPR dans le processus d'inflammation oculaire

Tous les membres de la famille des eicosanoïdes, qui constituent d'importants médiateurs du processus de l'inflammation, dérivent du métabolisme de l'acide arachidonique. Ainsi, les enzymes de la voie des cyclooxygénases libèrent les prostaglandines, thromboxanes et prostacyclines à partir de molécules d'acide arachidonique, alors que ce dernier est le précurseur des lipoxines et des leukotriènes lorsqu'il est utilisé par les enzymes de la voie des lipoxygénases (pour une revue, voir Kudo *et al.*, 1993).

La grande majorité de l'acide arachidonique cellulaire, comme la plupart des acides gras polyinsaturés, est emmagasinée sous une forme estérifiée à la position sn-2 du squelette glycérol des phospholipides membranaires (Birkle et Bazan, 1986; Marsh, 1990). Les PLA2 jouent donc un rôle majeur dans le relargage de l'acide arachidonique, puisqu'elles hydrolysent spécifiquement l'acide gras qui est en position sn-2 des phospholipides.

Lorsque l'œil est le site d'une infection ou d'une blessure, l'EPR n'exerce pas seulement une fonction passive de barrière sang-oculaire, mais joue aussi un rôle actif dans la mise en place de la réponse immunitaire locale. En effet, outre son activité phagocytaire, l'EPR exprime plusieurs des récepteurs de surface et des médiateurs solubles requis pour la coordination de la réponse immunitaire (pour une revue, voir Marmor et Wolfensberger, 1998). Les médiateurs solubles que sont les eicosanoïdes sont alors produits suite au métabolisme de l'acide arachidonique. Nous suggérons donc que si les PLA2 intracellulaires de l'EPR (c47-49 et c60) sont faiblement liées aux membranes ou encore libres dans le cytosol et transloquées aux membranes suite à un signal cellulaire, elles pourraient être directement impliquées dans le processus inflammatoire oculaire en hydrolysant l'acide arachidonique des phospholipides membranaires.

### 3.2.3 Implication des PLA2 de l'EPR dans la digestion lysosomiale des disques membranaires des segments externes des photorécepteurs et le recyclage des acides gras

Ainsi qu'il a été décrit dans l'introduction de ce mémoire, les disques membranaires de la portion apicale des segments externes des photorécepteurs qui sont phagocytés par les cellules de l'EPR sont par la suite soumis à l'action hydrolytique des enzymes lysosomiales de ces cellules. Les lysosomes contiennent en effet près d'une soixantaine d'enzymes hydrolytiques, dont des PLA2 (Barett et Heath, 1977); de plus, il a été suggéré que les enzymes lysosomiales sont spécialisées pour la digestion des disques membranaires des segments externes des photorécepteurs (Zimmerman *et al.*, 1983). L'hydrolyse des AGPI (tels que l'acide docosahexaénoïque) des phospholipides composant les disques membranaires constitue la première étape d'une boucle de recyclage au cours de laquelle ils sont retournés vers les photorécepteurs pour être réacylés (Birkle et Bazan, 1986). Les phospholipides ainsi formés sont dirigés vers la portion basale des segments externes des photorécepteurs, où ils serviront à l'assemblage de nouveaux disques membranaires.



Toutefois, la rétine étant richement vascularisée et abondamment oxygénée, les dérivés d'oxygène hyper-réactifs que sont les radicaux hydroxyl et superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont susceptibles d'y être générés en grande quantité (Wu *et al.*, 1992; Berman, 1991). C'est ainsi que les disques membranaires des segments externes des photorécepteurs peuvent subir des dommages suite à la peroxydation des AGPI qu'ils contiennent par ces dérivés d'oxygène hyper-réactifs. Il est donc important que ces AGPI peroxydés ne soient pas recyclés avant d'avoir été réparés. A cet égard, nous croyons que si les PLA2 c47-49 et c60 sont localisées à l'intérieur des lysosomes de l'EPR, elles pourraient jouer un rôle important dans le processus de renouvellement des disques membranaires des segments externes des photorécepteurs, en hydrolysant les acides gras peroxydés des membranes phospholipidiques phagocytées avant qu'ils soient réparés puis renvoyés vers les photorécepteurs pour la formation de nouveaux disques intacts et fonctionnels. En effet, tel que mentionné dans la section 3.2.1, les PLA2 démontrent une sélectivité pour les acides gras peroxydés (Sevanian et Kim, 1985; Sevanian et McLeod, 1987).

Des enzymes jouant un tel rôle essentiel pour le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des photorécepteurs et qui seraient déficientes ou inactives pourraient

contribuer à l'apparition de pathologies réiniennes. En effet, si les acides gras des disques membranaires phagocytés sont peu ou pas hydrolysés au niveau des lysosomes de l'EPR, le processus de renouvellement des segments externes des photorécepteurs sera altéré alors que peu ou pas d'acides gras seront retournés au segment interne et ensuite à la base des segments externes pour la formation de nouveaux disques membranaires. Par conséquent, l'intégrité structurale des segments externes sera altérée parce que la faible quantité de disques membranaires synthétisés à leur base ne suffira pas pour compenser la perte des disques phagocytés à leur extrémité apicale par l'EPR, menant ainsi à la dégénérescence des photorécepteurs. Parallèlement, il est possible que l'accumulation de phospholipides non hydrolysés par les enzymes lysosomiales de l'EPR puisse causer la formation de dépôts lipidiques à la base des cellules de l'EPR (Pauleikhoff *et al.*, 1992); pour appuyer cette hypothèse, il a été démontré que les dépôts lipidiques s'accumulant à la base des cellules de l'EPR chez les patients souffrant de DMLA contiennent des phospholipides (tel que décrit dans la section 1.1.2.3). Ces derniers pourraient donc provenir d'un défaut de l'action hydrolytique de PLA2 lysosomiales. Nous reconnaissons en la perte de vision et l'accumulation de dépôts lipidiques dans l'EPR, les principales manifestations cliniques de la DMLA. Bien que très peu de choses soient encore connues concernant les bases moléculaires des dystrophies réiniennes telle que la DMLA, il apparaît évident qu'il faudra

investiguer plus profondément l'implication possible d'enzymes lysosomiales telles que les PLA2 dans leur développement.

### 3.3 Rôles possibles de la PLA2 sécrétée de l'EPR

La PLA2 sécrétée de l'EPR (m19-20) peut exercer sa fonction hydrolytique sur les membranes des photorécepteurs, avec lesquels les cellules de l'EPR sont en étroite relation structurale. Nous suggérons ici un rôle important qui pourrait être attribué à cette enzyme pour le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des photorécepteurs.

#### 3.3.1 Implication de la PLA2 sécrétée de l'EPR dans le processus de fusion membranaire lors de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR

Le mécanisme général de phagocytose de l'extrémité apicale des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'EPR a été décrit dans la section 1.2.2 de l'introduction. La formation d'un petit empilement de disques membranaires à l'extrémité apicale des segments externes avant son excision (étape 2 du schéma 1.6; voir section

1.2.2) est connue pour impliquer un processus hautement contrôlé de fusion membranaire (Boesze-Battaglia *et al.*, 1992). Il a été démontré que, lors de cet événement de fusion membranaire, le contenu intérieur aqueux de certains disques devenait en continuité avec le milieu extérieur (Laties *et al.*, 1976; Matsumoto et Besharse, 1985); de plus, du calcium semble être requis pour que l'étape d'excision soit complétée (Greenberger et Besharse, 1983).

Il a été postulé que le processus général de fusion membranaire incluerait les événements suivants (Gagne *et al.*, 1985): 1) aggrégation ou adhésion des membranes qui vont fusionner; 2) rapprochement étroit des bicouches lipidiques des deux membranes, éliminant ainsi une partie de l'eau qui sépare les membranes (déshydratation partielle); 3) déstabilisation des bicouches au point de fusion (deux bicouches juxtaposées ne fusionnent pas spontanément par elles-mêmes); et 4) mélange des deux bicouches et séparation ultime du point de point de fusion en une nouvelle structure membranaire.

Nous suggérons que la PLA2 sécrétée de l'EPR, m19-20, pourrait jouer un rôle dans le processus de fusion membranaire impliqué dans l'étape d'excision de l'empilement des disques membranaires lors de la phagocytose de l'extrémité apicale des segments externes

des photorécepteurs. En effet, nous avons montré que cette PLA2 était  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante, ce qui correspond au fait que le calcium semble requis pour la complétion de l'étape de l'excision; de plus, cette PLA2 pourrait avoir directement accès au deux bicouches en instance de fusion puisqu'elle est sécrétée dans l'espace interphotorécepteur et qu'il y aurait continuité entre l'intérieur des disques membranaires et l'espace interphotorécepteur lors du processus de fusion. Nous émettons l'hypothèse que m19-20 pourrait être impliquée dans l'étape #3 du processus général de fusion membranaire décrit plus haut, soit dans la déstabilisation des bicouches au point de fusion, en hydrolysant une partie des acides gras des bicouches phospholipidiques pour promouvoir des interactions hydrophobes entre les deux bicouches, ce qui favoriserait thermodynamiquement la fusion membranaire. Cette hypothèse est supportée par des résultats expérimentaux où l'ajout de PLA2 à une préparation de disques membranaires et de membrane plasmique de segments externes des photorécepteurs a augmenté de cinq fois le taux initial de fusion des deux bicouches (Boesze-Battaglia, 1994).

Un tel rôle dans la fonction phagocytaire de l'EPR implique qu'une déficience ou une inactivation de la PLA2 sécrétée pourrait être critique dans le maintien du bon fonctionnement du processus de renouvellement des segments externes des

photorécepteurs. En effet, une déficience de la fusion membranaire lors de l'étape d'excision des disques membranaires en voie d'être phagocytés, conduirait à une déficience de leur excision et de leur phagocytose. Cette déficience de la fonction phagocytaire de l'EPR pourrait être à l'origine d'une dégénérescence des photorécepteurs. En effet, les rats du 'Royal College of Surgeons', qui présentent un défaut du processus phagocytaire de l'EPR, sont caractérisés par la dégénérescence de leurs photorécepteurs (Bok et Hall, 1971). Il est donc envisageable qu'une déficience de m19-20 contribue au développement de dystrophies rétiniennes telles que la DMLA.

### 3.4 Perspectives de recherches

D'autres investigations seront nécessaires afin de mieux caractériser les PLA2 de l'EPR et de pouvoir les classer adéquatement. Dans ce but, une banque d'ADN complémentaire a récemment été préparée à partir de cellules de l'EPR humain fraîchement récoltées, à partir de laquelle il sera possible d'isoler les ADN complémentaires codant pour chacune des PLA2 décrites dans ce travail de recherche. Ces ADN complémentaires permettront d'obtenir une grande quantité d'informations importantes sur les PLA2 de l'EPR. Ainsi, ils pourront être utilisés pour obtenir les structures primaires et le poids

moléculaire des différentes PLA2, au moyen d'une transcription et d'une traduction *in vitro* (King *et al.*, 1997), suivies d'un séquençage de la préparation pure d'enzymes obtenue. De plus, les gènes codant pour ces PLA2 pourront être isolés et localisés dans le génome humain et la régulation du promoteur de ces gènes pourra être étudiée. Enfin, il serait intéressant de rechercher des mutations de ces gènes dans une banque de patients souffrant de diverses dystrophies rétinienne, ce qui permettrait d'établir les liens de cause à effet entre l'une ou plusieurs des PLA2 de l'EPR et des pathologies de dégénérescence rétinienne telles que la DMLA. De telles investigations permettront de confirmer ou réfuter nos hypothèses quant à l'implication des PLA2 de l'EPR dans des fonctions essentielles pour le maintien du fonctionnement normal de la rétine.

Parallèlement, il serait intéressant d'étudier la régulation post-transcriptionnelle des PLA2 exprimées par les cellules en culture de l'EPR. Divers types de facteurs y sont possiblement impliqués, tels que les caractéristiques des donneurs (âge, état de santé général et celui des yeux), des facteurs expérimentaux (composition du milieu de culture, nombre de fois que les cellules ont été passées, durée de la culture cellulaire entre chaque passage, la présence de photorécepteurs dans le milieu de culture, etc). Ce dernier aspect concernant la présence de photorécepteurs prend une importance particulière dans le cas de

la PLA2 sécrétée de l'EPR. En effet, puisque nous lui suggérons un rôle possible dans le processus de fusion membranaire dont dépend le mécanisme de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR, il semble logique que la présence de photorécepteurs puisse stimuler la sécrétion de cette enzyme par les cellules de l'EPR. Si cette hypothèse s'avérait confirmée, il serait intéressant de déterminer quelles sont les voies de signalisation cellulaire qui sont impliquées. Pour ce faire, différentes constructions du promoteur de cette PLA2 pourraient être utilisées pour en identifier les séquences activatrices et inhibitrices; alternativement, des inhibiteurs spécifiques d'enzymes tels que des MAP kinases pourraient être utilisés.

### 3.5 Références

Barrett, A. J. et Heath, M. F. *dans: Lysosomes: A Laboratory Handbook*, 1977.

Berman, E. R. Biochemistry of the eye. New York: Plenum Press, 1991.

Birkle, D. L. et Bazan, N. G. The arachidonic acid cascade and phospholipid and docosahexanoic acid metabolism in the retina. *dans: Progress in Retinal Research*. Vol. 5. New York: Pergamon Press, 1986.



Boesze-Battaglia, K., Albert, A. D. et Yeagle, P. L. Fusion between disk membranes and plasma membranes of bovine photoreceptor cells is calcium-dependent. Biochemistry 1992. 31: 3733-3737.

Boesze-Battaglia, K. Membrane properties that influence bovine retinal ROS membrane fusion. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994. 35: 2139.

Bok, D. et Hall, M.O. The role of pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. J. Cell Biol. 1971. 49: 664-682.

Channon, J. Y. and Leslie, C. C. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolysing phospholipase A2 with membranes in macrophage cell line RAW 264.7. J. Biol. Chem. 1990. 265, 5409-5413.

Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J. et Tishfield, J. A. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight calcium-dependent phospholipase A2. J. Biol. Chem. 1994. 269: 2365-2368.

Clark, J. D., Lin L.-L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S. Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N. et Knopf, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A2 contains a calcium-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. Cell. 1991. 65: 1043-1051.

Cockcroft, S. et Thomas, G. M. H. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. Biochem. J. 1992. 288: 1-14.

Crippa, P. R. et Mazzini, A. Involvement of superoxide ions in the oxidation of NADH by melanins. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. 1983. 15: 51-56.

Felix, C. C., Hyde, J. S., Sarna, T. et Sealy, R. C. Melanin photoreactions in aerated media: electron spin resonance evidence for production of superoxide and hydrogen peroxide. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1978. 84: 335-341.

Gagne, J., Stamatamos, L., Diacovo, T., Hui, S. W., Yeagle, P. L. et Silvius, J. Physical properties and surface interactions of bilayer membranes containing N-methylated phosphatidylethanolamines. Biochemistry 1985. 24, 4400.

Greenberger, L. M. et Besharse, J. C. Photoreceptor disc shedding in eye cups. Inhibition by deletion of extracellular divalent cations. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1983. 24, 1456.

Handelman, G. J., van Kuijk, F. J., Chatterjee, A. et Krinsky, N. I. Characterization of products formed during the autoxidation of  $\beta$ -carotène. Free Radic. Biol. Med. 1991. 10: 427-437.

Jacob, M., Weech, P. K. et Salesse, C. Bovine retinal pigment epithelium contains novel types of phospholipase A2. Biochem. J. 1997. 327: 455-460.

King, R. W., Lustig, K. D, Stukenberg, T. M. et Kirschner, M. W. Expression cloning in the test tube. Science 1997. 277, 973-974.

Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. et Inoue, K. Mammalian non-pancreatic phospholipase A2. Biochim. Biophys. Acta 1993. 1170: 217-231.

Laties, A. M., Bok, D. et Liebman, P. Procion yellow: a marker dye for outer segment disc patency and for rod renewal. Exp. Eye Res. 1976. 23, 139-148.

Marmor, M. F. et Wolfensberger, T. J. dans The Retinal Pigment Epithelium. Oxford University Press, 1998.

Marsh, D. CRC Handbook of lipid bilayers. Boston: CRC Press, 1990.

Matsumoto, B. et Besharse, J. C. Light and temperature modulated staining of the rod outer segment distal tips with Lucifer yellow. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1985. 26: 628-635.

Pauleikhoff, D., Zuel, S., Sheridah, G. S., Marshall, J., Wessing, A. et Bird, A. C. Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane. Ophthalmology 1992. 99: 1548-1553.

Reddy, S. T., Winstead, M. V., Tishfield, J.A. and Herschman, H. R. Analysis of the secretory phospholipase A2 that mediates prostaglandin production in mast cells. J. Biol. Chem. 1997. 272: 13591-13596.

Rhee, S. G. et Choi, K. D. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. J. Biol. Chem. 1992. 267: 12 393-12 396.

Sevanian, A. and Kim, E. PLA2 dependent release of fatty acids from peroxidised membranes. J. Free Radicals Biol. Med. 1985. 1: 263-271.

Sevanian, A. and McLeod, L. L. Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers. Lipids 1987. 22: 627-636.

Tishfield, J. A. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals. J. Biol. Chem. 1997. 272: 17247-17250.

van Kuijk, F. J., Sevanian, A., Handelman, G. J. and Dratz, E. A. Protection of membranes from lipid peroxidation damage. Trends Biochem. Sci. 1987. 12: 31-34.

Wu, G. S., Sevanian, A. et Rao, N. A. Detection of retinal lipid hydroperoxides in experimental uveitis. Free Radicals in Biology and Medicine 1992. 12: 19-27.

Zimmerman, W. F., Godchaux III, W. and Belkin, M. The relative proportions of lysosomal enzyme activities in bovine retinal pigment epithelium. Exp. Eye Res. 1983. 36: 151-158.