



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude des effets de l'isoprostane-8 sur des cellules endothéliales humaines en culture par l'approche protéomique

Gustin, Cindy

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Etude des effets de l'isoprostane-8 sur des cellules endothéliales humaines en culture par l'approche protéomique

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude des effets de l'isoprostane-8 sur des cellules endothéliales humaines en culture par l'approche protéomique

GUSTIN Cindy

Résumé

Depuis plusieurs années, l'isoprostane 8, composé « PG-like », suscite un intérêt profond de la part des chercheurs et scientifiques. Considéré comme un marqueur de stress oxydatif et de peroxydation lipidique, ce composé s'est avéré être plus abondant au niveau des parois vasculaires atteintes ainsi que dans le plasma et les urines de patients hypercholestérolémiques. En outre, l'isoprostane 8 semble également posséder des effets biologiques qui en ferait une molécule pro-athérogène.

Dans cette optique, ce travail tente de mettre en évidence les effets de l'isoprostane 8 sur un modèle de cellules endothéliales humaines (HUV-EC-C) dans le but, à long terme, de mieux comprendre les mécanismes qui, *in vivo*, mènent au développement de lésions athéromateuses.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons étudié les effets de cette molécule à la fois au niveau de l'activation de facteurs de transcription (NF κ B et AP-1), au niveau de la sécrétion d'une chémokine (MCP-1) et au niveau de la capacité des cellules endothéliales à immobiliser les leucocytes. Les effets obtenus se révélant encourageants, nous avons alors voulu vérifier les effets de cette molécule sur l'expression protéique des cellules endothéliales (via l'approche protéomique). Les résultats obtenus via cette approche sont tout à fait préliminaires, mais suggèrent déjà une expression différentielle des cellules endothéliales stimulées à l'isoprostane 8.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur : Prof. M. Raes

Remerciements

Arrivée au terme de ce travail, j'ai le plaisir d'adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont permis de réaliser ce mémoire de fin d'études. Je tiens d'abord à vous remercier, Martine Raes, pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire. Je la remercie chaleureusement pour sa disponibilité, son accueil, ses nombreux conseils qui m'ont toujours été très précieux, ses commentaires enrichissants, son regard critique et ses remarques aussi bien constructives que pertinentes, son enthousiasme constant vis-à-vis de mon travail et son optimisme. Encore merci !

Ma reconnaissance va également à Aurélie Tacheny, qui a su me guider au mieux tout au long de ce travail. Sa porte fut toujours grande ouverte pour mes questions, mes doutes... et pour la correction de mes premières ébauches. Merci à toi d'avoir fait de ce mémoire un travail agréable et enrichissant.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Martine Van Steenbrugge pour son aide et ses connaissances, à Edouard pour m'avoir enseigné tous les secrets des gels 2D, pour sa grande disponibilité et son soutien constant. Merci à Jean-jean pour son aide indispensable lors des derniers jours de stress ! Merci pour tout !

Je tiens également à remercier Marc, pour ses conseils judicieux ainsi que pour son aide précieuse concernant les problèmes informatiques! Merci à l'équipe entière de l'URBC pour la bonne ambiance qui règne au sein du laboratoire.

Merci à tous les membres de la « cage » et tous les autres d'URBM d'avoir fait de ces quatre années, les plus enrichissantes. Merci à toi Mélanie pour toutes nos heures passées à discuter, à s'écouter, à s'entre-aider.

A ma famille, et plus particulièrement à ma maman, ma sœur et mes trois frères qui m'ont toujours fait confiance et encouragé durant mes études, m'ont apporté une aide logistique très précieuse ainsi qu'un soutien moral omniprésent tout au long de mes études ; à toi Papy, qui m'a également apporté une aide de grande valeur ; à toi ancé et à ton papa pour la relecture de ce mémoire. Enfin, à Stéphane, mon compagnon dans la vie, qui m'a donné le réconfort et le soutien nécessaires durant les moments difficiles. Merci aussi de ta bonne humeur constante, de ton enthousiasme et de ton idéalisme. Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à toutes ces personnes.

Et enfin, je remercie tous les membres de mon jury d'avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail. D'emblée, je vous souhaite à tous une agréable lecture...

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoryribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AINS	Anti- inflammatoires non stéroïdiens
AP-1	Activated protein-1
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American type culture collection
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adénosyl tri-phosphate
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine serum albumine
CBS	Cystathionine _-synthase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Cellules musculaires lisses
COX-1	Cyclooxygénase-1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
Ds	Double strand
DTT	Dithiotréitol
ECACC	European collection of animal cell culture
EDRF	Endothelial-derived relaxing factor
EDTA	Ethylène diamine tétracétate de sodium
ESI	Electrospray ionisation
ET-1	Endothéline-1
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HDL	High density lipoprotein
HRP	Human raifort protein
HUV-EC-C	Human umbilical vein endothelial cells-C
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IDL	Intermediate density lipoprotein
IL-1	Interleukine-1
LDL	Low density lipoprotein
LEI	Limitante élastique interne
LOX-1	Lectin-like ox-LDL receptor-1

Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL receptor related protein
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MAPK	Mitogene activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MDA	Malonaldéhyde
MEC	Matrice extracellulaire
MetRS	Méthionyl-tRNA synthétase
mm-LDL	minimally-modified LDL
MM-LDL	Mildly-modified LDL
MS	Méthionine synthase
NEP	Endopeptidase neutre
NF_κB	Nuclear factor kappa binding
NO	Nitric oxide
PAF	Platelet activating factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphate buffer saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldéhyde
PGH ₂ synthase	Prostaglandine endoperoxyde synthase
PGI ₂	Prostacycline
PIB	Protease inhibitor buffer
PIC	Protease inhibitor cocktail
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMA	Phorbol myristate acetate
PUFA	Acide gras polyinsaturés
R-LDL	Récepteur aux LDL
RPM	Rotation par minute
R-SC	Récepteur scavenger
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-Page	Sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SR-B1	Scavenger receptor-B1
SREC	Scavenger receptor endothelial cells
TBARS	Thio-barbituric acid reactive substance
TF	Tissue factor
TGF_α	Transforming growth factor-α
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF_α	Tumor necrosis factor alpha
t-Pa	Tissular plasminogen activator
TXA ₂	Thromboxane A ₂

u-PA	Urokinase plasminogen activator
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein
vWF	von Willebrand factor

Tables des matières

I.	<u>INTRODUCTION</u>	10
I.1.	<u>L'ATHÉROSCLÉROSE</u>	11
<i>I.1.1.</i>	<i><u>Structure des artères</u></i>	<i>11</i>
<i>I.1.1.1.</i>	<i><u>L'intima</u></i>	<i>11</i>
<i>I.1.1.2.</i>	<i><u>La média</u></i>	<i>12</i>
<i>I.1.1.3.</i>	<i><u>L'adventice</u></i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.</i>	<i><u>Les lésions de l'athérosclérose</u></i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.1.</i>	<i><u>La strie lipidique (« Fatty streak »)</u></i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.2.</i>	<i><u>La lésion fibro-graisseuse (« Fibrofatty lesion »)</u></i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.3.</i>	<i><u>La plaque athéromateuse</u></i>	<i>13</i>
<i>I.1.3.</i>	<i><u>Les facteurs à risques</u></i>	<i>13</i>
<i>I.1.3.1.</i>	<i><u>Les lipoprotéines plasmatiques et leurs récepteurs</u></i>	<i>14</i>
<i>I.1.3.1.a.</i>	<i><u>Le récepteur aux LDL natives</u></i>	<i>14</i>
<i>I.1.3.1.b.</i>	<i><u>Les récepteurs scavenger</u></i>	<i>15</i>
<i>I.1.3.1.c.</i>	<i><u>Les LDL</u></i>	<i>15</i>
<i>I.1.3.1.d.</i>	<i><u>Les HDL</u></i>	<i>17</i>
<i>I.1.3.2.</i>	<i><u>Les facteurs génétiques</u></i>	<i>18</i>
<i>I.1.3.3.</i>	<i><u>L'homocystéine</u></i>	<i>19</i>
<i>I.1.3.3.a.</i>	<i><u>L'homocystéine thiolactone</u></i>	<i>20</i>
<i>I.1.3.3.b.</i>	<i><u>Métabolisme de l'homocystéine</u></i>	<i>20</i>
<i>I.1.3.3.c.</i>	<i><u>Causes de l'hyperhomocystéinémie et de l'homocystinurie</u></i>	<i>20</i>
<i>I.1.3.3.d.</i>	<i><u>Rôle pro-athérogène de l'homocystéine</u></i>	<i>21</i>
<i>I.1.4.</i>	<i><u>Théories hypothétiques explicatives sur l'athérosclérose</u></i>	<i>22</i>
I.2.	<u>L'ENDOTHÉLIUM</u>	24
<i>I.2.1.</i>	<i><u>Intervention dans les processus de coagulation et de fibrinolyse</u></i>	<i>24</i>
<i>I.2.2.</i>	<i><u>Fonction de régulation du tonus vasculaire</u></i>	<i>25</i>
<i>I.2.3.</i>	<i><u>Participation aux réponses immunitaires et inflammatoires</u></i>	<i>26</i>
<i>I.2.3.1.</i>	<i><u>Caractères antigéniques de surface</u></i>	<i>27</i>
<i>I.2.3.2.</i>	<i><u>Expression de molécules d'adhérence</u></i>	<i>27</i>
<i>I.2.3.3.</i>	<i><u>Synthèse de cytokines</u></i>	<i>28</i>
<i>I.2.3.4.</i>	<i><u>Production de médiateurs lipidiques</u></i>	<i>29</i>
<i>I.2.4.</i>	<i><u>Synthèse de composants du stroma</u></i>	<i>29</i>
<i>I.2.5.</i>	<i><u>Intervention dans les phénomènes de réparation tissulaire et d'angiogenèse</u></i>	<i>29</i>
<i>I.2.6.</i>	<i><u>Interaction avec les lipoprotéines</u></i>	<i>30</i>
<i>I.2.7.</i>	<i><u>Activation des cellules endothéliales et athérosclérose</u></i>	<i>31</i>
I.3.	<u>LES ISOPROSTANES</u>	31
<i>I.3.1.</i>	<i><u>Formation des prostaglandines via les cyclooxygénases</u></i>	<i>32</i>
<i>I.3.2.</i>	<i><u>Formation non enzymatique des F₂-isoprostanes</u></i>	<i>32</i>

I.3.3.	<i>Implications biologiques des isoprostanes</i>	33
I.3.3.1.	<i>Les F₂-isoprostanes en tant que marqueurs de la peroxydation lipidique et de stress oxydants in vivo</i>	33
I.3.3.2.	<i>Activité biologique des F₂-IsoPs</i>	34
I.3.4.	<i>F₂-IsoPs et maladies cardio-vasculaires</i>	35
I.4.	<i>APPROCHES POUR ÉTUDIER LES EFFETS DE L'ISOPROSTANE 8 SUR L'EXPRESSION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES</i>	37
I.4.1.	<i>Le niveau transcriptionnel</i>	37
I.4.2.	<i>Le niveau protéinique</i>	38
I.4.3.	<i>Notre choix : l'approche protéomique par les gels 2D</i>	38
I.5.	<i>OBJECTIF DU MÉMOIRE</i>	40
II.	<u>MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	41
II.1.	<i>CULTURE CELLULAIRE</i>	42
II.1.1.	<i>Cellules endothéliales HUV-EC-C</i>	42
II.1.1.1.	<i>Culture cellulaire des HUV-EC-C</i>	42
II.1.1.1.a.	<i>Matériels</i>	42
II.1.1.1.b.	<i>Méthodes</i>	43
II.1.1.2.	<i>Test de cytotoxicité</i>	44
II.1.1.2.a.	<i>Matériels</i>	44
II.1.1.2.b.	<i>Méthodes</i>	44
II.1.1.3.	<i>Molécules d'intérêts étudiées</i>	45
II.1.1.4.	<i>Mise en évidence du facteur de von Willebrand dans les cellules endothéliales de la lignée cellulaire HUV-EC-C</i>	45
II.1.1.4.a.	<i>Matériels</i>	45
II.1.1.4.b.	<i>Méthodes</i>	46
II.1.2.	<i>Cellules monocytaires humaines THP-1</i>	47
II.1.2.1.a.	<i>Matériels</i>	47
II.1.2.1.b.	<i>Méthodes</i>	47
II.2.	<i>CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT D'ACTIVATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES HUV-EC-C</i>	48
II.2.1.	<i>Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription NFκB par dosage colorimétrique</i>	48
II.2.1.1.a.	<i>Matériels</i>	48
II.2.1.1.b.	<i>Méthodes</i>	50
II.2.2.	<i>Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par dosage colorimétrique</i>	51
II.2.2.1.a.	<i>Matériels</i>	51
II.2.2.1.b.	<i>Méthodes</i>	53
II.2.3.	<i>Dosage de l'expression de MCP-1 par Elisa</i>	54
II.2.3.1.a.	<i>Matériels</i>	54
II.2.3.1.b.	<i>Méthodes</i>	55

II.2.4.	<i>Etude de l'adhérence des cellules monocytaires humaines THP-1 sur les cellules endothéliales HUV-EC-C en plaque multi-puits</i>	56
II.2.4.1.a.	<i>Matériels</i>	57
II.2.4.1.b.	<i>Méthodes</i>	57
II.3.	ANALYSE PROTÉOMIQUE PAR GELS 2D	58
II.3.1.	<i>Première dimension : isoélectrofocalisation (IEF)</i>	58
II.3.2.	<i>Deuxième dimension : séparation des protéines selon leur poids moléculaire</i>	59
II.3.3.	<i>Visualisation des protéines</i>	59
II.3.4.	<i>Identification des protéines</i>	59
II.3.4.1.a.	<i>Matériels</i>	60
II.3.4.1.b.	<i>Méthodes</i>	62
III.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	65
III.1.	<i>NOTES LIMINAIRES</i>	66
III.2.	<i>CHOIX DU MODÈLE CELLULAIRE</i>	66
III.3.	<i>ETUDE DU DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES ENDOTHÉLIALES HUV-EC-C INDUITE PAR L'HOMOCYSTÉINE</i>	68
III.3.1.	<i>Evaluation de la cytotoxicité de l'homocystéine</i>	69
III.3.2.	<i>Effets de l'homocystéine sur l'activation du facteur de transcription NF-κB</i>	69
III.3.3.	<i>Effets de l'homocystéine sur la sécrétion de MCP-1</i>	70
III.3.4.	<i>Effets de l'homocystéine sur l'adhérence des THP-1 sur les cellules HUV-EC-C</i>	71
III.3.4.1.	<i>Discussion</i>	72
III.4.	<i>L'ISOPROSTANE 8</i>	73
III.4.1.	<i>Evaluation de la cytotoxicité de l'isoprostane 8</i>	73
III.4.1.1.	<i>Discussion</i>	74
III.4.2.	<i>Effets de l'isoprostane 8 sur les facteurs de transcription</i>	74
III.4.2.1.	<i>Effets sur l'activation de NF-κB</i>	74
III.4.2.2.	<i>Effets sur l'activation de AP-1</i>	75
III.4.2.2.a.	<i>Discussion</i>	75
III.4.3.	<i>Effets de l'isoprostane 8 sur la sécrétion de MCP-1</i>	76
III.4.3.1.	<i>Discussion</i>	77
III.4.4.	<i>Effets de l'isoprostane 8 sur l'adhérence des THP-1 sur les cellules HUV-EC-C</i>	77
III.4.4.1.	<i>Discussion</i>	78
III.4.5.	<i>Effets de l'isoprostane 8 sur l'expression des cellules endothéliales</i>	78
IV.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	83
V.	BIBLIOGRAPHIE	88

I. Introduction

I.1.L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie dégénérative des artères qui a pour origine la formation d'une plaque d'athérome, caractérisée par un dépôt lipidique, dans l'intima des grandes artères. Elle représente de loin la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde et les accidents cérébro-vasculaires (Ross, 1995). Les symptômes dépendent de la localisation de la plaque d'athérome que l'on trouve le plus fréquemment dans les zones proches du cœur, les carrefours et les bifurcations des artères. Par ordre de fréquence, l'athérosclérose atteint : l'aorte abdominale, les coronaires, les carotides internes qui vascularisent le cerveau, les artères iliaques et fémorales des membres inférieurs. Malheureusement, cette maladie progresse insidieusement pendant plusieurs années, bien avant que les symptômes ne se développent. Il est dès lors difficile de la prendre en charge dès les lésions primaires. De plus, bien qu'elle ait un impact foudroyant dans le monde occidental, le détail des mécanismes de développement des lésions est loin d'être totalement compris.

Les principales cibles de l'athérosclérose étant les parois vasculaires, il est important de faire un bref rappel de la structure des artères.

I.1.1. Structure des artères

D'un point de vue histologique, les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation ; leurs parois sont constituées de trois tuniques qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média, et l'adventice. La composition et l'épaisseur de chacune d'elles peuvent légèrement varier selon qu'il s'agit d'une artère musculaire (Figure 1) ou élastique (Figure 2).

I.1.1.1. L'intima

Il s'agit de la couche la plus interne et la plus fine de la paroi vasculaire ; c'est à ce niveau que se développe la lésion caractéristique de l'athérosclérose. L'intima est constituée :

- d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale.
- d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique où va se former la plaque d'athérome. Elle contient de nombreuses fibres de collagène, quelques fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes.

L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne (LEI). Celle-ci est une couche bien individualisée de fibres élastiques et ne se retrouve qu'au niveau des gros vaisseaux.

1.1.1.2. La média

C'est la tunique moyenne et la plus épaisse. La média est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses, empilées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires. Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artère : d'une couche pour les artérioles à plusieurs pour les artères élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice extra-cellulaire constituée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de glycosaminoglycanes.

1.1.1.3. L'adventice

Cette tunique, la plus externe, repose sur une limitante élastique externe qui délimite cette tunique de la média. Elle contient :

- un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes ;
- une enveloppe qui assure l'ancrage des artères aux structures avoisinantes.

L'adventice est irriguée par des vasa vasorum qui ont un rôle nourricier vis-à-vis du vaisseau. Un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés (nervi vasorum) rejoint les fibres musculaires lisses de la média.

I.1.2. Les lésions de l'athérosclérose

Trois stades principaux peuvent être reconnus lors de l'évolution de l'athérosclérose : la strie lipidique, la lésion fibro-graisseuse et la plaque athéromateuse (Ross, 1995).

1.1.2.1. La strie lipidique (« Fatty streak »)

Il s'agit de lésions précoces et réversibles. Elles se rencontrent de façon fréquente dès l'enfance. Ce sont des surélévations de couleur jaune au niveau de l'intima, qui font légèrement saillie dans la lumière artérielle. Elles sont formées par l'accumulation de cellules spumeuses (c'est à dire de macrophages bourrés de cholestérol par internalisation de LDL modifiées) et de quelques cellules musculaires lisses (CML) (Figure 3). L'évolution des stries lipidiques peut aller dans deux sens opposés : la régression ou l'évolution vers la formation d'une plaque fibreuse (Ross, 1993).

1.1.2.2. La lésion fibro-graisseuse (« Fibrofatty lesion »)

La lésion fibro-graisseuse est un soulèvement plus conséquent de couleur blanche à jaune très clair, qui fait saillie dans la lumière vasculaire. Elle est toujours recouverte de cellules endothéliales. On rencontre à ce stade des amas plus importants formés par la réunion de plusieurs plaques voisines. L'intima est constitué d'un centre gras où s'accumulent les cellules spumeuses, mais aussi des débris cellulaires et des cristaux de cholestérol qui forment le cœur nécrotique. Le centre gras s'entoure d'une armature fibreuse périphérique qui confère sa rigidité à la lésion. L'irrigation de la paroi est accrue par la néoformation de vaisseaux provenant de la ramification des vasa vasorum de l'adventice. Les cellules

spumeuses continuent à s'accumuler. Elles dérivent des macrophages, mais peuvent aussi se former à partir des CML. Ces derniers présents au niveau de la lésion, sont issus de la média. Le développement de la plaque s'accompagne d'ailleurs d'un amincissement de la média (Ross, 1993).

1.1.2.3. La plaque athéromateuse

Le processus de développement de la plaque peut se poursuivre et s'étendre alors longitudinalement et sur la circonférence du vaisseau, en restant asymétrique (Figure 4). La plaque évolue alors soit vers un état stable où elle se remplit de matrice extra-cellulaire conduisant à la formation d'une chappe fibreuse résistante autour de la lésion, soit vers un état instable où la rupture de la plaque athéromateuse est provoquée par un accroissement des contraintes mécaniques. Si le thrombus résultant de cette rupture n'obstrue pas totalement la lumière du vaisseau, la pathologie induite correspondra à l'angor instable. Si l'obstruction du vaisseau est complète, elle peut aboutir par exemple à l'infarctus du myocarde, dans le cas des artères coronariennes. Ce sont donc les plaques instables et vulnérables, même si elles n'obstruent que peu l'artère, qui sont les plus dangereuses.

Cette évolution est liée à plusieurs facteurs : la localisation de la plaque, la structure de la plaque et les activités biochimiques au sein de la capsule fibreuse, par exemple les activités des métalloprotéinases qui fragilisent la plaque en détruisant sa composition protéique.

Certaines lésions peuvent, dans un stade plus évolué, contenir d'importantes quantités de cristaux de calcium et donc se calcifier.

Et enfin, afin de compenser l'obstruction du vaisseau, des phénomènes de dilatation compensatoire peuvent se produire. C'est ce que l'on appelle l'anévrisme. Cette dilatation peut rendre la paroi du vaisseau plus fragile jusqu'à la rompre et provoquer dès lors une hémorragie interne souvent fatale.

Nous n'avons repris ici que les lésions les plus typiques. En réalité, elles sont beaucoup plus hétérogènes, surtout au niveau de leur complexification (pour plus de détails, voir par exemple (Virmani *et al.*, 2000)).

1.1.3. Les facteurs à risques

Il existe plusieurs facteurs à risque (Tableau 1) que nous pouvons classer par ordre d'importance (O'Brien *et al.*, 1994) :

- Les risques **majeurs** tels que l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie, le tabac, le diabète, l'hyperhomocystéinémie ;
- Les risques **constitutifs** que sont le sexe (principalement masculin), l'âge et les facteurs génétiques (hypercholestérolémie familiale, sitostérolémie ...etc.) ;
- Les risques **mineurs** tels que la sédentarité, le stress, l'embonpoint (surcharge pondérale supérieure à 10%) ;
- Enfin, on parle de plus en plus de l'importance d'un contexte **inflammatoire** chronique et de certaines infections, associées à l'athérosclérose (Libby, 2001).

Trois de ces facteurs à risque, les plus impliqués dans cette pathologie, seront développés plus en détail dans la suite de ce chapitre : les lipoprotéines plasmatiques, les troubles génétiques et l'homocystéine.

1.1.3.1. Les lipoprotéines plasmatiques et leurs récepteurs

Le cholestérol et les triglycérides sont des composés lipidiques fondamentaux dans la plupart des processus biologiques importants, incluant la synthèse d'hormones et de membranes, la signalisation inter et intracellulaire et le métabolisme énergétique. Le cholestérol peut, soit provenir de l'alimentation, soit être synthétisé dans l'organisme. Au niveau du foie, un adulte synthétise typiquement environ 800 mg de cholestérol par jour (Brown *et al.*, 1983). Parce qu'elles sont hydrophobes, ces substances lipidiques circulent dans le sang sous forme de particules appelées lipoprotéines. Celles-ci sont composées de phospholipides, de triglycérides, de cholestérol estérifié ou non et de protéines (apolipoprotéines) qui sont spécifiques à chaque type de particules. Sept apolipoprotéines principales ont été caractérisées : A-I, A-II, A-IV, B-48, B-100, C et E. Synthétisées et sécrétées principalement par le foie, elles peuvent jouer trois rôles : structurer la lipoprotéine, servir de ligand spécifique pour des récepteurs ou constituer un cofacteur enzymatique.

Les lipoprotéines se divisent en quatre classes majeures incluant les chylomicrons, les VLDL, les LDL et les HDL, mais il en existe d'autres telles que les IDL (O'Brien *et al.*, 1994). La composition, la fonction, le métabolisme et le lieu de synthèse de chacune d'entre elles sont résumés dans le tableau 2.

Différents récepteurs situés principalement au niveau du foie, participent activement au métabolisme des lipoprotéines (Adachi *et al.*, 1997; Havel, 1988; Wyne *et al.*, 1996) : le récepteur aux LDL natives, le récepteur aux VLDL, le LRP (Lipoprotein receptor protein), la Mégaline,.... Nous ne nous étendons que sur deux types de récepteurs, les plus impliqués dans l'athérogenèse :

1.1.3.1.a. Le récepteur aux LDL natives

Le clonage et le séquençage de l'ADNc du récepteur aux LDL natives ont révélé que cette protéine de 115 kD est formée de cinq domaines, chacun ayant une fonction bien spécifique (Figure 5). D'ailleurs, ce sont les charges négatives du domaine amino-terminal qui permettent l'interaction avec les charges positives de l'apo B-100 des LDL. Cette liaison permet ainsi l'épuration des LDL plasmatiques via une endocytose classique médiée par le récepteur (Havel, 1988).

Le fonctionnement de ce récepteur est régulé par le taux de cholestérol intracellulaire, ce qui permet aux cellules périphériques de ne recevoir que la quantité de cholestérol nécessaire à leur synthèse membranaire, le cholestérol des LDL étant essentiellement éliminé par le foie qui le transforme en acides biliaires (Demuth *et al.*, 1995). En effet, quand le cholestérol s'accumule au niveau des cellules hépatiques, la synthèse du récepteur aux LDL est réprimée,

par contre, une diminution de la concentration hépatique en cholestérol, stimule la synthèse de ce récepteur (Grundy, 1986).

Plusieurs auteurs, tels que Brown et Goldstein (1983), ont mis en évidence l'importance physiologique de ce récepteur aux LDL natives. En effet, il existe plusieurs défauts génétiques qui touchent ce récepteur et qui provoquent dès lors une accumulation importante de LDL plasmatiques. La maladie génétique la plus fréquemment rencontrée est l'hypercholestérolémie familiale dont nous parlerons un peu plus loin dans ce chapitre.

I.1.3.1.b. Les récepteurs scavenger

La famille des récepteurs scavenger (R-SC) est un groupe de protéines très hétérogènes des points de vue structure et fonction. La plupart des R-SC reconnaissent des LDL modifiées (par exemple oxydées ou acétylées), c'est à dire présentant une modification de leur apo B-100. Ceci entraîne dès lors un défaut de reconnaissance par les récepteur aux LDL au profit des récepteurs scavenger (Demuth *et al.*, 1995).

Beaucoup de ces récepteurs se retrouvent au niveau des macrophages, des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales qui internalisent énormément de cholestérol (Demuth *et al.*, 1995).

Ces récepteurs n'étant malheureusement pas régulés par la concentration intracellulaire en cholestérol, c'est principalement par leur intermédiaire que l'accumulation de cholestérol au sein des macrophages et des CML conduit à la formation de cellules spumeuses (Terpstra *et al.*, 2000).

Nous pouvons distinguer différentes classes de R-SC : les classes A, B, C, D, E et F (Figure 6). Les récepteurs de la classe A sont les mieux connus et caractérisées par six domaines (Terpstra *et al.*, 2000). Les récepteurs de la classe A et B sont exprimés dans les plaques d'athérosclérose.

I.1.3.1.c. Les LDL

Plusieurs évidences cliniques, épidémiologiques et expérimentales relient un taux plasmatique trop élevé en LDL avec un risque accru de développer l'athérosclérose (Munro *et al.*, 1988).

- Premièrement, il est démontré qu'une augmentation de la concentration en LDL, mais aussi d'autres lipides dans le sang, favorisent leur taux de pénétration dans l'intima. Ces LDL vont alors subir une oxydation et seront incorporés par les macrophages, transformant ceux-ci en cellules spumeuses.
- Deuxièmement, il existe des évidences *in vivo* et *in vitro* montrant que les LDL affectent directement les cellules de la paroi vasculaire. *In vivo*, l'adhésion monocytaire est associée à une augmentation de la perméabilité de l'endothélium. Il a été démontré que la migration des monocytes favorise le transport des LDL à travers une monocouche de cellules endothéliales en culture.
- Troisièmement, les LDL peuvent également avoir des effets directs sur les cellules musculaires. En effet, Fisher-Dzoga *et al* (1976) ont rapporté que la prolifération des

cellules musculaires lisses augmente en présence de sérum hyperlipidémique. De la même manière, l'agrégation plaquettaire et le relargage du PDGF (platelet derived growth factor) sont favorisés par de fortes concentrations en LDL (Munro *et al.*, 1988).

Les LDL en tant que telles, ne sont pas responsables de la progression des lésions athérosclérotiques. Par contre, il a été démontré que l'**oxydation** des LDL est une étape déterminante dans le processus d'athérogenèse (Bonnet, 2001). De nombreux arguments plaident en faveur de la présence des LDL oxydées au sein des lésions athérosclérotiques et leur importance dans la genèse de l'athérosclérose est actuellement bien établie.

Les LDL peuvent être oxydées au contact des cellules endothéliales, musculaires lisses ou des macrophages et générer ainsi des LDL oxydées caractérisées d'un point de vue physico-chimique par une augmentation de leur densité et de leur charge négative nette, par une hydrolyse de leurs lécithines en lysolécithine avec libération et peroxydation des acides gras insaturés en position 2, par une diminution du rapport lipides/protéines ainsi qu'une oxydation du cholestérol, et enfin, par une dégradation de leur apolipoprotéine B-100 (Demuth *et al.*, 1995) (Figure 7). Cette oxydation se produit majoritairement *in situ*, dans la paroi artérielle. On ne retrouve en effet que de très faibles quantités de LDL oxydées circulantes alors qu'elles sont présentes en abondance dans les lésions (Bonnet, 2001).

Deux types de mécanismes seraient à l'origine de l'oxydation des LDL :

- **Radicalaires** : liés principalement à la production cellulaire d'anion superoxyde et de thiols, ils nécessitent la présence de traces de métaux de transition. Le monoxyde d'azote libéré par les cellules endothéliales pourrait également participer à l'initiation de la peroxydation lipidique selon un processus radicalaire (Holvoet *et al.*, 1994).
- **Enzymatiques** : qui font intervenir la phospholipase A₂ des cellules et/ou celle liée à l'apolipoprotéine B des LDL. Le rôle de la 15-lipoxygénase cellulaire est plus controversé (Demuth).

Enfin, signalons que la myéloperoxydase sécrétée par les phagocytes, après activation des cellules, contribue à former du HOCl, oxydant puissant. Ce dernier est capable de modifier l'apo B-100, après incubation avec des LDL natives (Carr *et al.*, 2000).

Différents niveaux d'oxydation des LDL sont à distinguer : les LDL passent progressivement du stade de **mm-LDL** (minimally modified LDL) à celui de **MM-LDL** (mildly modified LDL), puis enfin au stade de **ox-LDL** (LDL fortement oxydées) (Esterbauer *et al.*, 1992).

Les deux premiers stades ne présentent qu'un moindre degré d'oxydation et ne manifestent pas de modifications majeures de leur apo B-100. Elles sont donc toujours reconnues par les récepteurs apo B/E et ne le sont pas par les récepteurs scavenger. Les mm-LDL et MM-LDL interviennent donc surtout dans les états pré-lésionnels en créant un micro-environnement propice au développement des lésions (Demuth *et al.*, 1995) (Figure 8).

Par contre, les ox-LDL vont favoriser une capture plus importante de cholestérol suite à leur reconnaissance par les récepteurs scavenger. Il en résulte, par conséquent, la formation de

cellules spumeuses, dont l'accumulation caractérise les lésions, dès les premiers stades (Massy *et al.*, 1996).

Mais les LDL, qu'elles soient faiblement ou fortement oxydées, jouent un rôle indéniable dans l'athérogenèse, car elles affectent différents types cellulaires directement impliqués dans l'apparition et le développement des lésions :

- **Les cellules endothéliales.** Elles sont activées par les LDL faiblement oxydées. Ceci conduit à une sécrétion de molécules d'adhérence comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) ou ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Ces molécules vont permettre l'attachement des monocytes et leur migration à travers la barrière endothéliale. De plus, la sécrétion de chémokines telle que le MCP-1 (monocyte chemoattractant molecule-1) par les cellules endothéliales, va favoriser la migration des monocytes à travers la barrière endothéliale. Fortement oxydées, les LDL deviennent cytotoxiques pour les cellules endothéliales.
- **Les monocytes :** les LDL oxydées jouent un rôle actif dans le recrutement des monocytes circulants, non seulement par leur action directe chémo-attractante (par l'intermédiaire de leurs lysolécithines), mais également en induisant la synthèse d'une protéine spécifiquement chémoattractante pour les monocytes, le MCP-1, par les principaux types cellulaires de la paroi artérielle (Demuth *et al.*, 1995). De plus, lorsque les monocytes adhèrent aux cellules endothéliales via les molécules d'adhérence, ils sont activés. Ces monocytes activés, migrent à travers l'endothélium, se différencient en macrophages qui expriment des R-SC et qui vont alors amplifier ce processus par sécrétion de molécules comme le M-CSF (macrophage colony stimulating factor) ou le MCP-1. Enfin, via leur R-SC, ces cellules internalisent ces ox-LDL, ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses.
- **Les CML :** les LDL oxydées sont l'un des facteurs qui conduit à la prolifération et à la migration vers l'intima des CML. Le phénomène est aussi induit par le PDGF sécrété par les macrophages activés et les cellules endothéliales et par l'IL-1 libérée par les macrophages. Certaines CML exprimant les R-SC, peuvent aussi se différencier en cellules spumeuses. Enfin, les LDL fortement oxydées sont aussi cytotoxiques pour les CML. Ce phénomène conduit à la mort des cellules spumeuses et donc au développement du cœur nécrotique au centre des plaques d'athérome (Young *et al.*, 1994).

I.1.3.1.d. Les HDL

La relation entre un taux plasmatique élevé en HDL et une « protection » contre l'athérosclérose a clairement été mise en évidence. On explique cet effet protecteur, par le rôle que jouent les HDL dans l'élimination de l'excès de cholestérol des tissus périphériques (Figure 9) (Lusis, 2000).

Inversément, une faible concentration en HDL a été associée à un risque accru d'athérosclérose, probablement dû à une élimination plus limitée du cholestérol présent dans les tissus périphériques (O'Brien *et al.*, 1994).

En outre, les HDL sont capables de protéger les LDL contre l'oxydation par les cellules de la paroi vasculaire à l'aide d'enzymes qui leur sont associées. Parmi ces enzymes, signalons par exemple la PAF (facteur activateur des plaquettes)-acétylhydrolase à activité PLA₂ : lorsque son activité est augmentée (par exemple par transfert de gène médié par un adénovirus), un effet bénéfique est observé, premièrement sur l'apparition spontanée de lésions chez des souris déficientes pour l'apo E et deuxièmement, sur la formation d'une néo-intima induite par une blessure vasculaire chez ces même souris (Quarck *et al.*, 2001). Il faut savoir que les souris déficientes pour l'apo E constituent un modèle bien caractérisé d'athérosclérose chez la souris, même si dans ce modèle, ce sont les VLDL, plus que les LDL, qui sont impliquées (Breslow, 1996).

On a montré qu'une autre enzyme associée aux HDL, la paraoxonase, protège elle aussi les LDL de l'oxydation. Cette enzyme est une estérase qui peut dégrader certains phospholipides bioactifs oxydés (Lusis, 2000).

Plusieurs expériences sur des souris surexprimant des gènes humains ont fourni de nouvelles évidences concernant le rôle protecteur des HDL. En effet, une surexpression de l'apo A-I, favorisant l'assemblage des HDL, retarde le développement des lésions, toujours chez des souris déficientes pour l'apo E (O'Brien *et al.*, 1994).

Enfin, en plus du transport inverse du cholestérol, les HDL semblent exercer un grand nombre d'activités potentiellement anti-athérogènes, résumées à la figure 10 (pour une revue, voir Nofer *et al.*, 2002).

En résumé, pour les LDL, on recommande des concentrations plasmatiques inférieures à 130 mg/dl, et pour les HDL, des concentrations supérieures à 35 mg/dl. Mais, c'est surtout le rapport LDL/HDL qui s'avère critique.

I.1.3.2. Les facteurs génétiques

Il existe plusieurs maladies monogéniques responsables d'une accumulation des LDL dans le plasma, dont les plus fréquentes sont énumérées dans le Tableau 3 (pour une revue, voir Goldstein *et al.*, 2001) :

- **L'hypercholestérolémie familiale (FH)**, où le déficit essentiel se situe au niveau du récepteur aux LDL. C'est une des causes les plus fréquentes de maladies coronariennes héréditaires résultant d'un seul gène défectueux.
- **Le déficit familial du ligand apo B-100 (FDB)**. Cette maladie est causée par une mutation dans le gène encodant l'apo B-100, ce qui réduit la capacité des LDL à se lier aux R-LDL.
- La « **sitostérolémie** ». Il s'agit d'une maladie récessive autosomale caractérisée par une accumulation d'une forme unique de LDL contenant beaucoup de stérols d'origine végétale en plus du cholestérol. De cette accumulation de stérols résultent deux anomalies que sont :
 1. Une augmentation de l'absorption intestinale de cholestérol et stérols
 2. Une diminution de ces stérols dans la bile

La conséquence principale de cette pathologie est l'accumulation du cholestérol au niveau du foie. Il s'en suit une diminution de la transcription du gène du R-LDL, ce qui cause dès lors une augmentation de la concentration plasmatique en LDL. De plus, des études génétiques récentes ont démontré que l'absorption et l'excrétion du cholestérol sont contrôlées par une paire de transporteurs « adénosine triphosphate-binding cassette (ABC), appelés ABCG5 et ABCG8. Tous deux semblent agir ensemble de manière à pomper le cholestérol hors des cellules. Deux équipes respectivement menées par Hobbs et Patel (Berge *et al.*, 2000; Lee, 2001) ont muté les gènes encodant ces deux transporteurs ABC. Ces chercheurs ont postulé que ces deux transporteurs peuvent former des hétérodimères et qu'une déficience de l'un des deux partenaires pouvait inhiber l'activité de ces transporteurs ABC.

- **L'hypercholestérolémie récessive autosomale (ARH).** De jeunes adultes et enfants développant l'ARH, développent une hypercholestérolémie sévère, une maladie coronarienne précoce et un dépôt massif de cholestérol dérivé des LDL dans la peau. De tels patients présentent un défaut sévère au niveau de l'épuration des LDL du plasma. L'activité du R-LDL des fibroblastes en culture provenant de ces patients, reste normale et aucune mutation du gène du R-LDL n'a été observée. Des études ultérieures ont alors mis en évidence un défaut du gène encodant une protéine cytosolique, l'ARH, laquelle contient un domaine de liaison phospho-tyrosine (PTB). Ce domaine PTB lie un motif NPXY. L'hypothèse émise à l'heure actuelle est que cette protéine ARH se lie au domaine NPXY retrouvé sur le R-LDL. Cette liaison faciliterait l'entrée du récepteur dans le puits tapissé à clathrine, ou alors, elle lui permettrait de participer au cycle du récepteur, de la surface cellulaire à l'endosome et inversement (Berge *et al.*, 2000).

Chacune de ces quatre pathologies induit une augmentation de la concentration en LDL suite à une diminution de l'activité du R-LDL dans le foie, directement ou indirectement. Il en résulte l'apparition de problèmes cardiaques précoces. Ce qui confirme encore une fois le lien causal direct entre des concentrations élevées en LDL plasmatiques et l'athérosclérose.

1.1.3.3. L'homocystéine

Dans ce paragraphe, nous passerons en revue les différentes formes de l'homocystéine et son métabolisme. Nous nous étendrons sur les causes de l'hyperhomocystéinémie et sur ses effets sur l'athérosclérose.

L'homocystéine est un acide aminé contenant un groupement thiol, métabolisé à partir de la méthionine, acide aminé essentiel dérivé des protéines alimentaires (Doshi *et al.*, 1999). Dans la circulation, l'homocystéine existe sous différentes formes. La forme sulfhydryl ou réduite, appelée homocystéine, représente 1%. La forme oxydée comprend l'homocystine (5 à 10%), l'homocystéine liée à une protéine, bien souvent l'albumine (80 à 90%) et enfin l'homocystéine liée à la cystéine (5 à 10%) (Jacobsen, 1998) (Figure 11).

I.1.3.3.a. L'homocystéine thiolactone

Dans la plupart des types cellulaires (les cellules endothéliales humaines, les fibroblastes, les cellules cancéreuses du sein, les cellules HeLa...), l'homocystéine peut être métabolisée en homocystéine thiolactone par une méthionyl-tRNA synthétase (MetRS) (Jakubowski *et al.*, 1993).

Le mécanisme de synthèse de l'homocystéine thiolactone, résumé dans la figure 12, implique une réaction en deux étapes conduite par l'hydrolyse de l'ATP.

Du fait de son caractère neutre à pH physiologique, l'homocystéine thiolactone peut diffuser à travers les membranes cellulaires et s'accumuler dans le milieu de culture.

Mais l'homocystéine thiolactone, peut être aussi incorporée au niveau des résidus lysines des protéines (Figure 13). Cette homocystéinylation est post-traductionnelle et résulte en des dommages protéiques se manifestant par une perte de fonction. Par exemple, l'homocystéinylation peut inactiver la méthionyl-tRNA synthétase et la trypsine (Jakubowski *et al.*, 2000).

I.1.3.3.b. Métabolisme de l'homocystéine

Il existe deux grandes voies pour réduire la concentration en homocystéine plasmatique : la voie de **reméthylation** et celle de **transsulfuration** (Andreotti *et al.*, 2000) (Figure 14). A travers la première, l'homocystéine est reméthylée en méthionine par acquisition d'un groupement méthyl provenant du donneur méthyltétrahydrofolate. Dans la seconde, l'homocystéine et la sérine se combinent pour former de la cystathionine et de l'eau. Cela mène à la formation de cystéine qui sera soit réutilisée, soit excrétée via les urines.

Une troisième voie alternative, dépendante de la bêtaïne, permet également la reméthylation en méthionine, mais elle semble être moins importante et est absente par exemple au niveau de l'endothélium vasculaire.

Ces différentes voies font intervenir plusieurs enzymes telles que la méthionine synthase (MS) dépendante de la vitamine B12, et la cystathionine- β -synthase (CBS) dépendante de la vitamine B6 (Graham *et al.*, 2000). Un déficit pour l'une d'entre elles sera d'ailleurs une cause majeure d'hyperhomocystéinémie.

I.1.3.3.c. Causes de l'hyperhomocystéinémie et de l'homocystinurie

Dans une population en bonne santé, la concentration moyenne en homocystéine totale (terme regroupant toutes les formes d'homocystéines), est comprise entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$ dans le plasma. Ces valeurs évoluent en fonction du sexe et de l'âge. Dès que la concentration plasmatique en homocystéine excède 15 $\mu\text{mol/l}$, on utilise le terme d'hyperhomocystéinémie. Une classification de la gravité de l'hyperhomocystéinémie a été proposée (pour une revue, voir Andreotti *et al.*, 2000) (Figure 15). En l'occurrence, l'hyperhomocystéinémie est dite :

- **faible** quand la concentration en homocystéine est 3 à 4 fois plus importante que la concentration normale,

- **intermédiaire** quand elle atteint des valeurs proches de 100 $\mu\text{mol/l}$,
- **sévère** pour des valeurs de 100 à 500 $\mu\text{mol/l}$.

Le terme d'homocystinurie s'applique à des personnes présentant une concentration en homocystéine suffisamment élevée pour provoquer une excrétion de celle-ci dans les urines, suite à une déficience de certaines enzymes. Les causes de l'hyperhomocystéinémie sont très diverses (Tableau 4).

Il peut s'agir de **défauts génétiques** qui affectent soit la cystathionine- β -synthase (CBS), ce qui est le plus fréquemment observé, soit la N5, N10 méthylènetétrahydrofolate réductase, une enzyme clé du métabolisme de l'homocystéine. Enfin, l'hyperhomocystéinémie peut être due à une déficience congénitale ou acquise de la méthionine synthase (MS) (Alpert, 1999).

Ces trois défauts vont chacun entraîner indirectement des risques accrus de thrombo-embolisme et d'athérosclérose précoce.

Au **niveau nutritionnel**, on peut signaler des troubles concernant les vitamines d'où dérivent les cofacteurs enzymatiques essentiels dans le métabolisme de l'homocystéine. L'acide folique est essentiel parce qu'il mène à la formation du donneur de méthyle. La vitamine B12, sous forme de cofacteur, la méthylcobalamine, est primordial pour la synthèse de la méthionine. Enfin, le pyridoxal-5-phosphate (PLP), cofacteur dérivé de la vitamine B6 l'est, lui, pour l'activité de la cystathionine- β -synthase. Une relation inverse existe entre le niveau sanguin de ces vitamines, en particulier le folate, et la concentration en homocystéine (Andreotti *et al.*, 2000).

Enfin, nous pouvons encore citer une série **d'autres causes** telles que l'insuffisance rénale chronique, l'hypothyroïdisme, l'anémie pernicieuse, le cancer du sein, le cancer du pancréas, la leucémie lymphoblastique, les drogues, les toxines et finalement la cigarette (Alpert, 1999).

1.1.3.3.d. Rôle pro-athérogène de l'homocystéine

En 1969, Mc Cully est le premier à rapporter la présence d'athérosclérose diffuse et de thrombo-embolismes artériels et veineux chez des enfants présentant des niveaux élevés en homocystéine plasmatique suite à une déficience enzymatique en MS et CBS. Sur base de cette observation, il a proposé que l'hyperhomocystéinémie puisse être considérée comme un facteur de risque supplémentaire pour l'athérosclérose. A ces travaux de Mc Cully sont venus s'ajouter les résultats d'études épidémiologiques confirmant l'association entre un taux plasmatique élevé en homocystéine (allant de 15 à 500 μM pour les cas graves d'homocystinurie) et un risque accru de développement de maladies cardio-vasculaires (pour une revue, voir Alpert, 1999) (Figure 16).

Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés, pour essayer de comprendre quels seraient les mécanismes d'action de l'homocystéine. Nous n'entrerons pas dans les détails, car la question reste très conversée et l'homocystéine n'occupe qu'une place marginale dans ce travail. Néanmoins, on peut résumer les principaux effets observés avec l'homocystéine comme suit :

- effets cytotoxiques sur les cellules endothéliales
- effets pro-prolifératifs sur les CML

- altération des protéines par homocystéinylation (par exemple pour l'apo B-100)
- modifications oxydatives des LDL
- altération de la matrice extracellulaire (MEC)
- effets pro-coagulants exercés et sur les plaquettes (augmentation de la production de TXA₂) et sur les cellules endothéliales (diminution de l'expression de la thrombomoduline et des héparanes sulfate, molécules à effet anti-coagulant)

Toutes ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle l'homocystéine en excès, est un facteur aggravant pour l'athérosclérose, mais le débat est loin d'être clos.

I.1.4. Théories hypothétiques explicatives sur l'athérosclérose

Malgré les conséquences dramatiques qu'entraîne l'athérosclérose, les mécanismes menant à son développement restent encore peu connus. En effet, différents modèles explicatifs ont été proposés, mais aucun de ceux-ci n'est exclusif. Avant de détailler ces mécanismes, il serait bon de faire un bref rappel sur les différentes théories qui se sont succédées- et opposées- à propos de l'athérogenèse.

1. **L'hypothèse monoclonale** : Celle-ci suppose que chaque lésion d'athérosclérose peut être considérée comme un petit néoplasme bénin dérivant d'une seule cellule musculaire lisse qui a été transformée soit par des virus, soit par des agents chimiques ou d'autres mutagènes.
2. **L'hypothèse de la sénescence clonale** : Dans ce cas, l'âge interfère avec les fonctions immunes de l'intima et de la média. Dès lors, une dérégulation de la prolifération des CML a lieu, permettant par la même occasion une accumulation des lipides et des CML.
3. **L'hypothèse de l'infiltration lipidique** : Celle-ci suppose une entrée des lipides circulants dans l'endothélium artériel et une accumulation autour des CML ; la perméabilité de l'endothélium s'en trouve altérée, favorisant dès lors une infiltration lipidique plus importante.
4. **L'hypothèse de l'oxydation des LDL** : Les LDL se trouvant dans les parois artérielles sont oxydées et sont alors à l'origine d'une réaction inflammatoire chronique. Ce phénomène induit une attraction des monocytes, lesquels se différencient en macrophages puis en cellules spumeuses.
5. **L'hypothèse thrombogénique** : Des dépôts continus d'éléments sanguins (fibrine, plaquettes, etc) ont lieu sur l'endothélium. Ces dépôts dégénèrent et sont accompagnés par l'accumulation de nouveaux dépôts et le relargage de molécules vasoactives (tel le PDGF) par les plaquettes, ce qui va stimuler la prolifération des CML.
6. **L'hypothèse autoimmune** qui est basée sur l'observation que presque tous les hommes possèdent des réactions immunes cellulaires et humorales contre les « heat-shock protein 60 » (HSP60) microbiennes. Parce que l'homologie antigénique entre les HSP60 microbiennes et humaines est grande, il existe un danger de réaction croisée avec les HSP60 humaines exprimées par les cellules endothéliales altérées des

artères. Enfin, une véritable auto-immunité contre les HSP60 autologues altérées peut provoquer également ce processus (Wick *et al.*, 2001).

7. **L'hypothèse de la blessure endothéliale** : Cette théorie semble être la mieux acceptée à l'heure actuelle et intègre plusieurs autres hypothèses. Elle tient compte aussi bien de la paroi artérielle que des cellules sanguines circulantes, que des facteurs de risque majeur de l'athérosclérose, tels que l'hypercholestérolémie ou l'hypertension par exemple (Figure 17).

La première étape serait une agression de l'endothélium notamment suite à l'action de forces hémodynamiques altérées (hypertension), de produits chimiques (nicotine), d'infections bactériennes (*Chlamydia pneumoniae*), de l'hyperlipidémie ou de l'hyperhomocystéinémie... etc. De telles perturbations provoquent un **dysfonctionnement** endothélial local : la perméabilité accrue favorise l'entrée de lipides au niveau de l'intima, lesquels vont subir des modifications biologiques telle que l'oxydation. Il se forme alors des LDL oxydées qui vont avoir plusieurs effets athérogènes sur les cellules endothéliales et notamment une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence et chémoattractantes. Les monocytes circulants vont dès lors entamer une diapédèse et une différenciation en macrophages une fois entrés dans le tissu endothélial (Massy *et al.*, 1996). Ceux-ci vont se transformer en cellules spumeuses suite à l'accumulation des LDL oxydées riches en cholestérol. Enfin, les cellules musculaires lisses vont proliférer et migrer vers l'intima artérielle où elles se chargeront de LDL oxydées et contribueront aussi à la formation de cellules spumeuses. Ces CML vont dans un second temps synthétiser une matrice extracellulaire plus ou moins abondante et formeront ainsi la chape fibreuse. La progression d'une telle plaque athéroscléreuse aboutit à une réduction progressive du calibre artériel dans un territoire donné, avec pour conséquence la réduction des potentialités d'adaptation du débit artériel et induction d'une ischémie locale (Bonnet, 2001).

Il semble donc clair, à travers tout ce processus, que les principaux acteurs dans l'athérosclérose sont : la **cellule endothéliale**, les **cellules musculaires lisses** et les **monocytes/macrophages**, sans oublier les lymphocytes T et les plaquettes. Mais parmi ces différents types cellulaires, c'est sur la cellule endothéliale que nous allons nous focaliser. En effet, c'est la cellule endothéliale, qui selon les circonstances, va favoriser ou non l'entrée à sens unique des monocytes et des LDL dans l'intima. Notre modèle cellulaire d'étude étant constitué de cellules endothéliales humaines HUV-EC-C, nous développerons donc les fonctions spécifiques des cellules endothéliales pouvant être directement liées au développement de l'athérosclérose en expliquant comment l'activation de ces cellules les fait passer d'un phénotype anti-athérogène à un phénotype pro-athérogène.

I.2. L'endothélium

L'endothélium vasculaire assure non seulement une perméabilité sélective entre le courant circulatoire et les tissus mais il se comporte en outre comme un tissu en interaction permanente avec d'autres cellules et des facteurs humoraux. L'endothélium possède un grand nombre de fonctions spécifiques par l'intermédiaire desquelles il participe activement à la régulation de l'homéostasie vasculaire, la thrombose, l'inflammation, la réponse à l'infection, et dans des processus pathologiques tels que la cancérogenèse, l'athérosclérose et les maladies cardio-vasculaires. Nous allons détailler les différentes fonctions des cellules endothéliales et expliquer dans quelle mesure et dans quelles circonstances, elles peuvent intervenir dans le processus d'athérogenèse (Tableau 5).

I.2.1. Intervention dans les processus de coagulation et de fibrinolyse

Les cellules endothéliales constituent l'un des éléments essentiels de la régulation du système hémostatique, car elles peuvent développer des propriétés anti et/ou pro-thrombogéniques (Figure 18).

Dans des conditions physiologiques normales, lorsque les cellules endothéliales sont au repos, elles expriment de façon prédominante des propriétés anti-thrombogéniques par le maintien notamment, du rapport prostacycline (PGI_2)/ thromboxane A_2 (TXA_2). Ainsi, l'endothélium ne sera pas pro-agrégant. En effet, la PGI_2 est un agent anti-thrombotique contrairement au TXA_2 . Rappelons que PGI_2 et TXA_2 sont des éicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique. En cas d'activation de l'endothélium vasculaire, en particulier par les cytokines inflammatoires ou par des concentrations athérogènes de lipoprotéines, il existe une modulation de la synthèse et de l'expression des différents médiateurs par les cellules endothéliales, qui entraîne le passage d'un phénotype anti- à un phénotype pro-thrombotique (pour une revue, voir Demuth *et al.*, 1995).

L'endothélium maintient un état anti-thrombotique via trois grands mécanismes :

1-. Opposition à l'activation et à l'agrégation des plaquettes par :

- sa membrane plasmique recouverte de protéoglycanes de type héparane sulfate (HSPG) : ceux-ci empêchent l'adhésion plaquettaire ;
- la sécrétion de PGI_2 qui inhibe l'adhérence des plaquettes en les désactivant (par augmentation de leur contenu en AMPc) ;
- la sécrétion de NO qui agit en synergie avec la PGI_2 ;
- son activité ADPase, qui limite la taille des agrégats plaquettaires à la surface de l'endothélium en convertissant l'ADP, agent agrégant, en AMP.

2-. Opposition à la coagulation (Figures 18 et 19) par :

- l'expression à sa surface de thrombomoduline, récepteur de surface pour la thrombine. Le complexe thrombine-thrombomoduline favorise l'activation de la protéine C qui à l'aide d'un cofacteur (la protéine S, synthétisée par les cellules endothéliales), inactive les facteurs Va et VIIIa de la coagulation par protéolyse ;
- la présence d'HSPG à sa surface. Le HSPG favorise l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine III, en interagissant avec cette dernière ;
- l'endocytose et la dégradation du facteur Xa de la coagulation.

Pour rappel, la coagulation peut à la fois être activée par une voie intrinsèque ou extrinsèque impliquant chacune de nombreux facteurs et aboutissant à la production de thrombine à partir de prothrombine (Figure 20). Cette thrombine va permettre la production à partir du fibrinogène de fibrine, constituant principal du caillot.

3-. Enfin, activation de la fibrinolyse (Figures 18 et 20) en :

- libérant des activateurs du plasminogène de type urokinase (u-PA) et tissulaire (t-PA). Ceux-ci permettent la transformation du plasminogène en plasmine. Cette dernière assure la dégradation du thrombus par attaque enzymatique du réseau de fibrine ;
- sécrétant de la prostacycline qui amplifie l'activité fibrinolytique de l'activateur tissulaire du plasminogène.

D'un autre côté, l'endothélium peut basculer vers un état pro-thrombotique (Figure 18) en :

- sécrétant des facteurs favorisant l'agrégation des plaquettes tels que le facteur de von Willebrand (vWF), le facteur activateur des plaquettes (PAF) et le TXA₂, ce dernier exerçant une action opposée à celle de la PGI₂ ;
- activant par voie enzymatique le facteur V et le facteur XII qui est l'agent déclenchant de la voie intrinsèque de la coagulation ;
- produisant et en libérant le facteur tissulaire (TF), qui constitue l'agent déclenchant de la voie extrinsèque de la coagulation ;
- enfin, en inhibant la fibrinolyse par synthèse de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1).

I.2.2. Fonction de régulation du tonus vasculaire

Les cellules endothéliales contribuent également à la régulation du tonus vasculaire, et ce, en exerçant différents effets (pour une revue, voir Demuth *et al.*, 1995) (Figure 21):

- **à court terme**, les cellules endothéliales contrôlent l'état de tension des vaisseaux en régulant la contraction des CML par la production de substances vasorelaxantes (PGI₂ et EDRF ou NO) et vasoconstrictrices (ET-1, TXA₂) ;
- **à long terme**, les cellules endothéliales influencent la structure de la paroi artérielle en produisant des facteurs qui stimulent (ET-1, TXA₂) ou qui inhibent (PGI₂, NO) la croissance des CML vasculaires.

La PGI₂ est un dérivé oxydé de l'acide arachidonique, qui va agir directement sur les CML en augmentant leur taux cytosolique en AMPc. Elle induit ainsi la relaxation musculaire et inhibe la croissance de ces même cellules (Henrich, 1991). Le NO, longtemps appelé facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF), agit en augmentant le taux en GMPc cytosolique des CML. Sa production est assurée par des enzymes appelées NO synthases. Celles-ci sont soit constitutives (cNOS), soit inductibles (iNOS).

En ce qui concerne les agents vasotoniques, nous pouvons citer le TXA₂ et l'endothéline-1 (ET-1). Cette dernière appartient à une famille de trois peptides (ET-1, -2, -3). Seule l'ET-1 est produite par les cellules endothéliales sous forme de précurseur, nécessitant dès lors un clivage enzymatique afin d'être activée.

La cellule endothéliale possède aussi deux systèmes enzymatiques lui permettant de participer au métabolisme de divers médiateurs vasoactifs :

- l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (ECA), vasoconstricteur et mitogène pour les CML ;
- l'endopeptidase neutre (NEP), capable d'hydrolyser la bradykinine, molécule vasorelaxante.

Quand la cellule endothéliale est au repos et possède l'intégrité de ses fonctions, elle parvient à maintenir un équilibre dans la production de ces substances. Lorsqu'elle est altérée, (lors de processus dégénératifs, du vieillissement ou d'une stimulation excessive par des cytokines inflammatoires par exemple), l'équilibre est rompu et il apparaît des anomalies de l'état de tension des vaisseaux ainsi qu'une prolifération des CML vasculaires. Parmi ces molécules, celles dont la synthèse varie le plus en fonction de l'état d'activation des cellules endothéliales sont l'ET-1, la PGI₂ et le NO. Dans la cellule endothéliale au repos par exemple, la cNOS contribue à une production stable mais limitée de NO. Dans la cellule endothéliale en condition pro-inflammatoire, la iNOS néo-synthétisée induit une production transitoire mais très intense de NO.

I.2.3. Participation aux réponses immunitaires et inflammatoires

Les cellules endothéliales sont stimulées par différents facteurs humoraux. Ceci les amène à modifier l'expression de leurs gènes et de leurs fonctions et à participer activement aux réponses immunitaires et inflammatoires (Figure 22) (pour une revue, voir Demuth *et al.*, 1995) en :

- modifiant l'expression de leurs antigènes de surface ;
- exprimant des molécules d'adhérence ;
- synthétisant et en sécrétant des facteurs de croissance et des cytokines ;
- produisant des médiateurs lipidiques.

I.2.3.1. Caractères antigéniques de surface

Comme toutes les cellules, les cellules endothéliales expriment de façon constitutive les antigènes du système ABO. Elles possèdent également les antigènes du complexe d'histocompatibilité (CMH) dont l'expression est inductible par différentes cytokines.

I.2.3.2. Expression de molécules d'adhérence

L'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales est une étape importante de la réponse inflammatoire puisqu'elle fait partie du processus de recrutement des leucocytes au niveau des lésions. Ces molécules d'adhérence n'interviennent pas seulement dans la liaison des leucocytes, mais participent également à leur migration transendothéliale.

Le mécanisme d'induction de ces molécules d'adhérence par les cellules endothéliales ferait intervenir entre autres un facteur de transcription nucléaire, NF- κ B, impliqué dans l'activation de nombreux gènes jouant un rôle dans la réponse inflammatoire.

Parmi les molécules d'adhérence des cellules endothéliales, **VCAM-1** et **ICAM-1** sont les plus impliquées dans la liaison des leucocytes aux cellules endothéliales. *In vivo*, ces molécules d'adhérence sont exprimées à des sites d'inflammation vasculaires et sont liées à une infiltration leucocytaire. Il a été démontré récemment que leur expression est augmentée dans les lésions athéromateuses et chez des patients hypercholestérolémiques.

Brièvement, l'adhérence et la migration des leucocytes à travers l'endothélium, se passent en 3 étapes (Cotran *et al.*, 1998) (Figure 23) :

- Tout d'abord, les monocytes circulants sont ralentis et entreprennent l'étape de « rolling » sur l'endothélium, grâce notamment, à la participation des sélectines leucocytaire (L-sélectine) et endothéliales (P- et E-sélectines).
- L'adhérence est ensuite renforcée afin que les monocytes s'immobilisent. Ce processus implique les intégrines en membrane des monocytes, qui reconnaissent des récepteurs de type immunoglobuline tels que ICAM-1 et VCAM-1 présents sur les cellules endothéliales.
- Enfin, la migration transendothéliale est entamée à l'aide de molécules chémoattractantes telles que le MCP-1.

Les molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales et jouant un rôle dans les interactions leucocytes-cellules endothéliales, sont renseignées dans le tableau 6. Certaines de ces molécules sont exprimées constitutivement (ICAM-2, ...) ; d'autres sont inductibles (E-sélectine, ICAM-1, ...) ; certaines sont stockées dans des granules intracellulaire, les corps de Weibel-Palade et requièrent un stimulus pro-inflammatoire pour être exprimées en surface (P-sélectine).

Ces molécules d'adhérence constituent donc des marqueurs d'activation des cellules endothéliales très intéressants dans le cadre de l'étude de l'athérosclérose.

1.2.3.3. *Synthèse de cytokines*

Quatre types de cytokines sont impliquées dans l'athérogenèse : les interleukines, les interférons, les facteurs de croissance hématopoïétiques et les autres facteurs de croissance.

La cellule endothéliale est ainsi à la fois cible et source de cytokines servant de signaux de communication entre les différents types cellulaires.

Les principales cytokines pro-inflammatoires retrouvées au sein de la plaque d'athérome (Tableau 7) sont :

- L'**IL-1** et le **TNF α** qui orientent les cellules endothéliales dans un sens pro-thrombotique et pro-inflammatoire, en augmentant l'expression de molécules d'adhérence (CAM), de chémokines (MCP-1) et de facteurs de croissance (PDGF). Ce dernier est puissamment athérogène puisqu'il induit à la fois la prolifération et la migration des CML depuis la média vers l'intima. Il est produit aussi bien par les cellules endothéliales que les macrophages. Quant au MCP-1, il s'agit d'un marqueur d'activation de ces cellules dans le contexte de l'athérosclérose ; il peut être produit par toutes les cellules de la paroi artérielle lorsqu'elles sont activées. Il possède une action chimiotactique absolument spécifique des monocytes qu'il peut donc attirer et activer (Ross, 1986).
- Le **TGF β** , qui favorise la conversion du phénotype contractile des CML en phénotype synthétique, en augmentant entre autres le niveau d'expression de la fibronectine (Ross, 1993).
- D'autres interleukines pro-inflammatoires (**IL-6, IL-8, IL-12**) qui voient leur expression augmentée. Toutes trois provoquent le recrutement des monocytes en stimulant la libération de MCP-1 par les cellules de la plaque et elles favorisent leurs adhérence à l'endothélium en induisant l'expression de molécules d'adhérence sur l'endothélium (Tedgui *et al.*, 2001).
- Les colony stimulating factor (**CSF**) : GM-CSF, M-CSF et G-CSF sont des facteurs de croissance hématopoïétiques qui ont leur expression augmentée au niveau des cellules de la plaque d'athérome (O'Brien *et al.*, 1994).

Enfin, il est important de signaler également l'activation de facteurs de transcription au sein de la plaque d'athérome. En effet, les réponses de la cellule endothéliale lors du développement de l'athérome passent par une modification d'expression de gènes qui sont sous le contrôle de facteurs tels que **NF κ B** (nuclear factor kappa binding) et **AP-1** (Activator Protein-1). Leur implication dans les réponses de type inflammatoire et en particulier dans les processus d'athérogenèse est à l'heure actuelle bien établie (Figure 24).

Les résultats des travaux de Brand *et al* (1996) ont mis en évidence, pour la première fois, la présence du dimère activé NF κ B au sein des cellules endothéliales de lésions athérosclérotiques.

En ce qui concerne AP-1, les résultats de Zhu *et al* (1997) ont prouvé l'existence d'une induction biphasique de ce facteur de transcription chez des cellules endothéliales dérivées de la veine de cordon ombilical (HUVEC) stimulées avec des LDL.

I.2.3.4. Production de médiateurs lipidiques

Ce sont des dérivés de phospholipides synthétisés par les cellules en réponse à une stimulation humorale. Nous pouvons citer :

- Le **PAF** : un médiateur de la réponse inflammatoire ; il est vasocontractant et active les plaquettes et les leucocytes. Il agit de façon combinée avec les prostaglandines (PG) pour augmenter la perméabilité vasculaire induite par l'IL-1 ;
- Les **éicosanoïdes** : ce sont des dérivés oxydés de l'acide arachidonique classés en deux groupes : les dérivés de la cyclooxygénase (prostaglandines et thromboxanes) et les dérivés de la lipoxygénase (leucotriènes, lipoxines et acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETEs) (Figure 25 et 26). Dans les conditions normales, la cellule endothéliale au repos synthétise majoritairement la prostacycline. Lorsque cette cellule est activée par les cytokines pro-inflammatoires ou par différentes cellules, la production des leucotriènes devient majoritaire, basculant l'équilibre vers un état pro-thrombotique (Demuth *et al.*, 1995).

I.2.4. Synthèse de composants du stroma

Les cellules endothéliales synthétisent et sécrètent des composants de leur lame basale et du stroma l'environnant, ainsi que des collagénases et d'autres protéases (Fajardo, 1989).

Pour le stroma, leur lame basale et leur surface cellulaire, elles produisent des **protéoglycanes** (PG) : certains ont une localisation péricellulaire (HSPG), d'autres sont interstitiels et localisés dans l'intima (chondroïnes sulfate (PG)) ou dans l'intima et la média (dermatan sulfate (PG)). L'ensemble des PG joue un rôle dans la capture, la rétention, la modification, et finalement l'accumulation des lipoprotéines au sein de la paroi artérielle.

En conclusion, lorsque les cellules sont activées, elles produisent d'avantage de PG. Ceci favorise le remodelage tissulaire et l'athérogenèse par accumulation et modification des lipoprotéines et par augmentation de l'action des facteurs de croissance sur les cellules de l'intima artérielle (Demuth *et al.*, 1995).

I.2.5. Intervention dans les phénomènes de réparation tissulaire et d'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus qui peut être physiologique ou pathologique. Il fait intervenir la migration, la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales principalement sous le contrôle de facteurs de croissance et de molécules de la matrice extracellulaire. Le phénomène de néo-angiogenèse joue un rôle très important dans la réparation tissulaire, mais aussi dans le développement des tumeurs. Une nouvelle thérapie anti-cancéreuse se base d'ailleurs sur la lutte anti-angiogène en inhibant des facteurs pro-angiogènes comme par exemple le vascular endothelial growth factor (VEGF).

Dans les conditions normales, les cellules endothéliales au repos croissent en monocouche et leur prolifération est maintenue à un taux très faible. Cette prolifération est bénéfique

lorsqu'elle aboutit à l'angiogenèse physiologique, mais devient nuisible dans un contexte d'inflammation chronique. Elle peut jouer alors un rôle dans le développement de la lésion athéromateuse.

D'une manière générale, toute dérégulation de la prolifération des cellules endothéliales participe au développement de l'athérosclérose en favorisant notamment le dépôt de lipides dans l'espace sous-endothélial.

I.2.6. Interaction avec les lipoprotéines

En raison de leur position anatomique stratégique entre le courant circulatoire et les tissus, les cellules endothéliales interagissent avec les différentes classes de lipoprotéines.

De plus, la circulation et la maturation des lipoprotéines, fait intervenir des échanges entre lipoprotéines de classes différentes et entre lipoprotéines et membranes cellulaires. Les cellules endothéliales favorisent ces échanges en :

- liant avec haute affinité les lipoprotéines natives (LDL via le R-LDL, VLDL via le R-VLDL, HDL via le récepteur SR-B1,...) (Wyne *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 2002) ;
- liant les lipoprotéines modifiées via LOX-1 (lectin-like ox-LDL receptor-1) (Moriwaki *et al.*, 1998) et SREC (scavenger receptor-endothelial cells) (Adachi *et al.*, 1997) ;
- interagissant avec la lipoprotéine (a) en raison d'une grande homologie de structure entre son apolipoprotéine (a) et le plasminogène (van den Ende *et al.*, 1996) ;
- liant la lipoprotéine lipase, enzyme qui hydrolyse les lipoprotéines riches en triglycérides, telles que les chylomicrons et les VLDL (Havel, 1988).

En ce qui concerne leur transport transendothélial, les différentes classes de lipoprotéines plasmatiques - à l'exception des chylomicrons en raison de leur grande taille - peuvent franchir la barrière de perméabilité sélective que constitue l'endothélium vasculaire. La diversité des voies de transport mises en jeu s'explique par la grande diversité de taille, de forme et de caractéristiques de liaison des lipoprotéines.

Le contrôle du transport des LDL est particulièrement important puisque sa dérégulation favorise le dépôt intimal de cholestérol et conduit au développement de la lésion athéroscléreuse. Ces lipoprotéines peuvent traverser la barrière endothéliale selon trois modes différents que nous ne ferons que citer (pour une revue, voir Demuth *et al.*, 1995) :

- l'endocytose non spécifique (endocytose indépendante de récepteur) ;
- l'endocytose d'adsorption (endocytose médiée par récepteur) ;
- le passage par les pores transitoires créés au niveau des jonctions intercellulaires lors de la multiplication, de la contraction ou de la rétraction des cellules endothéliales.

Généralement, lorsque les cellules endothéliales sont intactes, elles contribuent à la prévention d'une accumulation intimale excessive de cholestérol. En revanche, lorsque la perméabilité des cellules endothéliales est altérée, l'équilibre entre influx et efflux de LDL est

rompu en faveur de l'influx surtout en cas d'hypercholestérolémie, et le développement des lésions athéromateuses est favorisé.

Enfin, les cellules endothéliales participent également à la modification des LDL, comme nous l'avons déjà développé auparavant au point I.1.3.1.c.

I.2.7. Activation des cellules endothéliales et athérosclérose

L'hypothèse la plus acceptée à l'heure actuelle concernant l'élément déclencheur de l'athérosclérose, est le dysfonctionnement endothélial. Parmi l'ensemble des agents responsables de l'activation des cellules endothéliales, nous pouvons rappeler certains facteurs à risque tels que :

- L'hypertension artérielle qui conduit à une augmentation de la perméabilité endothéliale aux composants sanguins (O'Brien *et al.*, 1994).
- L'hyperlipidémie : un excès plasmatique de LDL a été associé à une accumulation pariétale précoce de cholestérol (Bonnet, 2001).
- Le tabac qui augmente la perméabilité endothéliale, l'adhésion plaquettaire, la synthèse de molécules vasoconstrictrices (TXA₂), etc (O'Brien *et al.*, 1994).

Nous retrouvons également une série d'autres facteurs comme :

- Certaines cytokines (TNF α et β , IL-1.....) : pour preuve, il a été démontré que de telles cytokines orientent l'endothélium dans un sens pro-thrombotique et pro-inflammatoire en augmentant la synthèse de PAI-1, de PAF, de TF, de molécules d'adhérence, de PDGF....etc (Demuth *et al.*, 1995).
- Différents stimuli d'ordre mécanique (sites soumis à des forces de cisaillements importantes) ou inflammatoire (LPS).
- Plusieurs processus dégénératifs, le vieillissement...etc.

En fait, ces différents agents pourraient contribuer, éventuellement de manière concertée, à un processus inflammatoire chronique. Ce dernier semble jouer un rôle prépondérant dans la transition des plaques d'athérome stables à instables, c'est à dire les plaques qui en se rompant, entraînent par exemple un syndrome coronarien aigu (Libby, 2001).

A cette liste non exhaustive d'agents activateurs de la cellule endothéliale, s'ajoutent également des lipides oxydés tels que l'isoprostane 8-iso-PGF_{2 α} qui a fait l'objet de notre étude au cours de ce mémoire. Nous allons donc consacrer le chapitre suivant de l'introduction aux isoprostanes et à leurs rôles possible dans l'athérogenèse.

I.3. Les isoprostanes

Les isoprostanes sont une vaste famille de composés « **prostaglandines-like** » produits à partir d'acides gras polyinsaturés (PUFA), et en particulier l'acide arachidonique, via une peroxydation catalysée par des radicaux libres. Ils sont donc produits indépendamment des

cyclooxygénases. Leur génération *in vitro* à partir de l'auto-oxydation des PUFA fut tout d'abord démontrée par Pryor et Porter, il y a 25 ans. Ce n'est qu'en 1990 que Morrow et *al* ont rapporté que ces composés étaient également produits *in vivo* chez l'homme, via une peroxydation non enzymatique de l'acide arachidonique catalysée par des radicaux libres, (pour une revue, voir Pratico, 1999). La concentration normale de ces composés dans le plasma se situe entre 5 et 40 pg/ml (Morrow *et al.*, 1990).

Depuis plusieurs années, cette grande famille de composés suscite de plus en plus l'attention quant à leur rôle dans de nombreuses pathologies caractérisées par l'implication de radicaux libres, dont l'athérosclérose. Parmi les diverses isoprostanes, les mieux connues sont des isomères de PGF₂, qui pour cette raison ont été appelées F₂-isoprostanes. Avant d'aborder les F₂-isoprostanes, nous allons rapidement rappeler le métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases.

I.3.1. Formation des prostaglandines via les cyclooxygénases

Chez l'homme, le précurseur le plus important des PG est l'**acide arachidonique** (AA), un acide gras polyinsaturé en C₂₀ à quatre doubles liaisons non conjuguées. L'AA est formé suite à l'hydrolyse de phospholipides membranaires par les phospholipases A₂ (PLA₂). Il y a deux voies principales de métabolisation de l'AA (Figure 25). La voie dite « **cyclique** » fait intervenir les cyclooxygénases et est inhibée par les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine : elle aboutit à la formation du cycle cyclopentane caractéristique des PG, prostacyclines et thromboxanes (Figure 26). Par contre, la voie dite « **linéaire** », n'est pas inhibée par les AINS ; elle conduit à la formation des leucotriènes et HPETE et fait intervenir les lipoxygénases.

Nous avons choisi de n'exposer que la voie cyclique, illustrée à la figure 26, afin de mettre en évidence les différences par rapport à la formation des composés « PG-like », de type isoprostanes. La première étape est catalysée par la PGH₂ synthase (prostaglandine endoperoxyde synthase), qui a 2 activités : cyclooxygénase et peroxydase (Figure 27). La première catalyse l'addition de 2 molécules d'O₂ sur l'AA, pour former la PGG₂. La seconde transforme la fonction hydroperoxy du PGG₂ en groupe OH (PGH₂). Ce dernier est le précurseur immédiat de toutes les PG, des prostacyclines et des thromboxanes (Figure 26) (Voet *et al.*, 1998). Il existe deux enzymes responsables de la synthèse du PGH₂, la cyclooxygénase-1 (COX-1) constitutive et la cyclooxygénase-2 (COX-2) inductible.

I.3.2. Formation non enzymatique des F₂-isoprostanes

Le mécanisme envisagé pour la formation de ces composés est montré à la figure 28. La soustraction d'hydrogènes bis-allyliques de l'acide arachidonique par des radicaux libres mène à la formation de trois radicaux arachidonoyl. Il s'en suit une attaque par l'O₂ qui donne lieu à quatre radicaux peroxy dérivés de l'acide arachidonique. Ces derniers vont subir une

endocyclisation suivie d'une addition d'O₂ pour former des bi-cyclo-endoperoxydes PGG₂-like. La réduction de ces endoperoxydes PGG₂-like, mène à la formation de composés PGF₂-like. Selon la localisation du radical peroxy dérivé de l'acide arachidonique, quatre régioisomères sont formés (I-IV). Chacun de ces régioisomères peut contenir huit diastéréomères racémiques. Une multitude de composés peuvent donc être générés par ce processus, bien que la formation de certains composés soit favorisée par rapport à d'autres. Parce que ces composés sont tous isomériques par rapport au PGF₂ dérivé de la cyclooxygénase avec un anneau prostane de type F, ils sont collectivement dénommés F₂-isoprostanes (F₂-IsoPs) (Roberts *et al.*, 1997).

Vu que la grande majorité de leur précurseur, l'acide arachidonique, est estérifié au niveau des phospholipides tissulaires, les F₂-IsoPs sont formés *in situ* et peuvent s'accumuler dans des tissus cibles. Par la suite, en réponse à une activation cellulaire et probablement via un mécanisme dépendant d'une phospholipase A₂, ils sont libérés et circulent dans le sang pour finalement être excrétés dans les urines (pour une revue, voir Pratico, 1999).

I.3.3. Implications biologiques des isoprostanes

1.3.3.1. Les F₂-isoprostanes en tant que marqueurs de la peroxydation lipidique et de stress oxydants in vivo

Un des intérêts majeurs de la découverte des F₂-IsoPs, a été le fait que la mesure de ces composés dans des liquides biologiques a pu offrir un indice quantitatif fiable de la peroxydation lipidique et de stress oxydatifs *in vivo*.

Les techniques traditionnelles comme le dosage des substances réactives à l'acide thio-barbiturique (TBARS) ou des hydroperoxydes lipidiques, souffrent en effet d'artéfacts divers : génération *ex vivo* et instabilité de ces composés, non spécificité de ces dosages,...(pour une revue, voir Pratico, 1999).

Le dosage des F₂-IsoPs s'est vite révélé comme un moyen fiable pour évaluer le niveau de stress oxydatif *in vivo* et plusieurs évidences laissent à suggérer que les F₂-IsoPs représentent une grande avancée dans ce domaine. Premièrement, les F₂-IsoPs constituent des molécules extrêmement stables, qui peuvent être détectées sous forme estérifiée en quantité importante dans tous les liquides biologiques (plasma, urine, bile, suc gastrique, ...etc). Deuxièmement, leur concentration augmente fortement dans des modèles animaux de stress oxydatif et ces concentrations peuvent être diminuées par administration d'anti-oxydants. Enfin, leur niveau croît également chez des animaux rendus déficients en anti-oxydants naturels, même en absence d'administration d'agent capable d'induire une peroxydation lipidique (pour une revue, voir Morrow *et al.*, 1996).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de démontrer que les F₂-IsoPs permettent bien de mesurer la peroxydation lipidique. Par exemple, il existe un modèle bien caractérisé

de stress oxydatif chez le rat, par administration de CCl_4 . Ce traitement augmente les niveaux de F_2 -IsoPs estérifiés et de malonalaldéhyde (MDA) dans le foie. Mais pour les F_2 -IsoPs, l'augmentation est de l'ordre de 80 fois, alors que pour le MDA, elle n'est que de 2,7 fois. Les F_2 -IsoPs semblent donc être un marqueur bien plus sensible que le MDA (pour une revue, voir Morrow *et al.*, 1996).

Enfin, le dosage des F_2 -IsoPs peut également être spécifiquement intéressant pour évaluer des anti-oxydants, en particulier, dans la sélection des cibles dans des études d'intervention et des doses appropriées de ces anti-oxydants (Pratico, 1999). Par exemple, il a déjà été démontré que la vitamine C réduit de manière significative certains F_2 -IsoPs dans les urines de gros fumeurs (pour une revue, voir Pratico, 1999).

Enfin, parmi les F_2 -IsoPs, plusieurs semblent avoir des propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo*. Ils constituent donc non seulement des marqueurs de peroxydation lipidique et de stress oxydatif, mais ils agissent également en tant que médiateurs des effets cellulaires de la blessure oxydative (Pratico, 1999).

1.3.3.2. Activité biologique des F_2 -IsoPs

Non seulement les F_2 -IsoPs sont des marqueurs de la **peroxydation lipidique** mais en plus, ils possèdent plusieurs **activités biologiques**. La recherche de ces activités a été limitée aux composés disponibles sous forme synthétique, à savoir le 8-iso-PGF_{2 α} . De plus, ce composé est l'une des isoprostanes majeures produites *in vivo* (Morrow *et al.*, 1996).

Les premières expériences visaient à tester l'effet du 8-iso-PGF_{2 α} sur les fonctions rénales des rats, après infusion. Le 8-iso-PGF_{2 α} s'est révélé être un puissant vasoconstricteur rénal, réduisant la filtration glomérulaire d'environ 40%, et ce à des concentrations nanomolaires. Des études ultérieures ont également mis en évidence son action vasoconstrictrice sur des artères pulmonaires chez des rats et des lapins (Pratico, 1999).

Le 8-iso-PGF_{2 α} est également capable d'induire la mitogenèse des CML et le relargage d'ET-1 par des cellules endothéliales bovines en culture (pour une revue, voir Roberts *et al.*, 1997). Enfin, Minuz *et al* (1995) ont montré que le 8-iso-PGF_{2 α} active les plaquettes, en favorisant l'adhérence des plaquettes et en réduisant l'activité inhibitrice du NO.

On a ensuite essayé de découvrir les mécanismes par lesquels le 8-iso-PGF_{2 α} exerce de tels effets. Un antagoniste du récepteur au TXA₂ (R-TXA₂), le SQ29548, semble inhiber totalement les effets du 8-iso-PGF_{2 α} sur la vasoconstriction rénale. Ceci suggérerait donc une interaction du 8-iso-PGF_{2 α} avec le R-TXA₂ (Pratico, 1999).

Pour tenter de confirmer cette éventuelle interaction, des études ultérieures se sont intéressées au rôle du 8-iso-PGF_{2 α} dans l'agrégation plaquettaire (Pratico, 1999). Étonnamment, le 8-iso-PGF_{2 α} ne se montrait pas comme un agoniste mais plutôt comme un antagoniste du récepteur au thromboxane des plaquettes. Deux explications sont possibles : soit le R-TXA₂ des plaquettes est différent de celui des parois vasculaires, soit il existe un récepteur unique aux « isoprostanes » au niveau des CML, absent des plaquettes, et différent du R-TXA₂, même s'il

présente des similitudes structurales avec le R-TXA₂. Les données expérimentales sont plutôt en faveur de la deuxième explication.

Au niveau des CML vasculaires chez les rats, il existe une grande discordance entre la capacité du 8-iso-PGF₂ α à déplacer le TXA₂ de son récepteur et sa capacité à induire une réponse vasoconstrictrice. En effet, de fortes concentrations en 8-iso-PGF₂ α (10⁻⁵ M) sont requises pour déplacer le TXA₂ de son récepteur, alors que l'activité vasoconstrictrice s'observe à des concentrations nanomolaires (Roberts *et al.*, 1997).

Les études de binding utilisant du 8-iso-PGF₂ α radioactif, appuient également l'hypothèse d'un récepteur unique sur les CML (pour une revue, voir Roberts *et al.*, 1997).

Plus récemment, Leitinger *et al.* (2001) ont montré que le 8-iso-PGF₂ α stimule les cellules endothéliales et favorise ainsi l'adhérence des monocytes à leur surface. Ces auteurs évoquent aussi la possibilité d'un récepteur aux isoprostanes.

Il est clair que seules des études de clonage moléculaire pourront définitivement confirmer cette hypothèse.

I.3.4. F₂-IsoPs et maladies cardio-vasculaires

Plusieurs facteurs à risque des maladies cardiovasculaires, comme la cigarette, le diabète sucré et l'hypercholestérolémie, ont été associés à une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique. En effet, depuis quelques années, plusieurs études ont rapporté une association entre l'augmentation de la concentration des F₂-IsoPs et plusieurs de ces facteurs à risque (Pratico, 1999).

De nombreuses expériences ont donc été réalisées afin de mettre en évidence le rôle joué par les F₂-IsoPs, et plus particulièrement le 8-iso-PGF₂ α , dans le développement des lésions athérosclérotiques. Nous citerons ici quelques travaux particulièrement significatifs qui suggèrent l'intervention du 8-iso-PGF₂ α dans l'athérosclérose.

Etant donné que les LDL oxydées sont athérogènes, plusieurs auteurs ont recherché la présence de F₂-IsoPs dans des préparations de **LDL** exposées à diverses conditions oxydantes (avec des ions Cu⁺⁺, en présence de cellules endothéliales et du Cu⁺⁺, ...) : on constate que la cinétique de formation des F₂-IsoPs suit celle des hydroperoxydes lipidiques et s'accompagne de changements relatifs en mobilité électrophorétique des LDL, typiques des LDL fortement oxydées. La figure 29 montre la cinétique de production du 8-iso-PGF₂ α total et libre, dans des LDL incubées pour oxydation en présence de cellules endothéliales et de Cu⁺⁺.

Lorsqu'on incube *in vitro* des LDL avec du peroxy-nitrite, formé à partir du NO et de l'anion superoxyde, on observe à nouveau la formation de F₂-IsoPs (Moore *et al.*, 1995). Cette formation de F₂-IsoPs dépend de la concentration en peroxy-nitrite. Elle est totalement inhibée par la présence de la superoxyde dismutase, qui empêche la formation de peroxy-nitrite. Les F₂-IsoPs sont donc formés dans les lipoprotéines oxydées de diverses manières *in vitro* (pour une revue, voir Morrow *et al.*, 1996).

Les chercheurs ont également voulu vérifier la présence des F₂-IsoPs au sein des **lésions** athérosclérotiques. Nous savons que la formation de lésions est accompagnée de peroxydation lipidique au site de développement de la lésion. Comme principaux produits de peroxydation lipidique, on retrouve des dérivés de l'acide linoléique et des oxystérols, mais également des F₂-IsoPs comme produit de peroxydation lipidique de l'acide arachidonique (Gniwotta *et al.*, 1997). De plus, ces auteurs ont observé que 5 sur 1.000 résidus linoléate sont présents en tant que dérivés hydroxylés, ce qui n'est pas détecté dans des vaisseaux sains, pris comme contrôle. Ces données tendent à montrer que d'une part, les lésions athérosclérotiques contiennent des quantités importantes d'acide linoléique hydroxylé et d'isoprostanes en comparaison avec des vaisseaux sains, et que d'autre part un lien entre la peroxydation lipidique locale et la progression de la pathologie existe.

D'autres chercheurs se sont intéressés à la formation *in vivo* du 8-iso-PGF₂ α chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale (homozygotes) (Davi *et al.*, 1997). Dans ce but, des échantillons d'urines de patients hypercholestérolémiques ont été analysés et comparés à des échantillons d'individus sains de même âge et de même sexe. L'excrétion urinaire du 8-iso-PGF₂ α est significativement plus importante chez ces patients que dans les groupes contrôles. Ce taux d'excrétion est de plus inversement proportionnel à la quantité de vitamine E contenue dans les LDL. L'administration de vitamine E entraîne une réduction dose-dépendante de l'excrétion urinaire du 8-iso-PGF₂ α chez ces patients (Figure 30). La même équipe a également montré, en faisant appel aux techniques de GC (gas chromatography)/MS (mass spectrometry), que plusieurs F₂-IsoPs, dont le 8-iso-PGF₂ α , augmentaient au niveau des LDL circulantes obtenues à partir de ces patients. Toutes ces données confirment donc bien le lien entre l'hypercholestérolémie et l'augmentation de la peroxydation lipidique, entraînant la formation d'isoprostanes décelables, et dans les LDL et dans les urines (pour une revue, voir Pratico, 1999).

Le **tabagisme** est aussi un facteur de risque bien connu pour les maladies pulmonaires obstructives, le cancer et l'athérosclérose. On a également mesuré les F₂-IsoPs libres dans le plasma, les F₂-IsoPs estérifiés dans les lipides plasmatiques et l'excrétion urinaire des métabolites de F₂-IsoPs chez des fumeurs et non fumeurs du même âge et sexe (Morrow *et al.*, 1995). Ces travaux révèlent une augmentation de la concentration en F₂-IsoPs dans la circulation des fumeurs et supportent donc l'hypothèse que la cigarette provoque bien des modifications oxydatives de molécules biologiques importantes *in vivo* (Figure 31).

En conclusion, les isoprostanes et en particulier le 8-iso-PGF₂ α , semblent donc bien jouer un rôle dans les maladies cardio-vasculaires, et ce à la fois comme molécules activatrices et comme marqueurs de la maladie. Dans ce travail, c'est aux propriétés biologiques des isoprostanes que l'on va s'intéresser. Comme les mécanismes d'action des isoprostanes sur les cellules de la paroi vasculaire restent largement méconnus, nous avons décidé de tester les

effets du 8-iso-PGF₂ sur les cellules endothéliales, et plus particulièrement de voir dans quelle mesure l'expression de ces cellules était affectée.

I.4. Approches pour étudier les effets de l'isoprostane 8 sur l'expression des cellules endothéliales

Afin de mieux comprendre l'influence de stimuli pro-athérogènes tels que l'hyperhomocystéinémie ou le 8-iso-PGF₂, deux approches s'offraient à nous : l'étude au niveau ARN et l'étude au niveau protéines.

I.4.1. Le niveau transcriptionnel

Pour une étude au niveau transcriptionnel, nous pouvons distinguer :

- Une approche dite à « *a priori* » : où l'on fait le choix d'étudier les effets de notre molécule sur l'expression d'un nombre limité de gènes connus et que l'on suspecte généralement d'être impliqués dans le phénomène étudié. Parmi ces techniques, nous citerons principalement :
 - Le northern blot (NB) : approche classique encore fortement utilisée. L'avantage est bien sûr lié à sa facilité.
 - La TaqMan-Real-Time PCR : elle repose sur le principe d'une émission de fluorescence pour chaque ARNm rétro transcrit, permettant une quantification « en direct ».
 - La RT-PCR semi-quantitative : celle-ci se base sur une quantification par rapport à un gène dont l'expression est supposée rester constante après modification des conditions expérimentales.
- Une approche dite **sans** « *a priori* » : permettant sans idée préconçue des gènes impliqués, d'étudier sur notre modèle de cellules endothéliales humaines, les effets d'un stimulus pro-athérogène au niveau de la quasi totalité du génome (approches transcriptomiques), soit par le :
 - Differential Display qui révèle l'expression différentielle de gènes peu exprimés autant que ceux qui le sont fortement. Toutefois, cette technique ne permet pas une quantification du fait qu'elle implique une étape de PCR (Figure 32). De plus, le nombre de combinaisons de primers utilisés définit la couverture du génome analysé. Elle présente également de nombreux faux positifs.
 - Les membranes à haute densité. Cette approche repose sur une détection d'hybrides formés d'une sonde de capture, greffée sur le support membranaire, et d'un ADNc, copie inverse d'un ARNm à détecter.

L'approche transcriptomique présente malgré tout quelques limites :

- Elle ne permet pas d'aborder les modifications post-traductionnelles, pourtant importantes (phosphorylation, acétylation, ...);
- Elle n'explique pas la raison pour laquelle un gène est exprimé à un moment donné;
- La transcription d'un gène n'entraîne pas nécessairement l'accumulation de la protéine correspondante (par exemple, en normoxie le gène encodant HIF-1 est transcrit, mais la protéine est dégradée de manière constitutive).

I.4.2. Le niveau protéinique

A nouveau, nous pouvons distinguer des techniques ciblées à « *a priori* », telles que le western blotting (fort semblable au NB), Elisa, et des techniques **sans** « *a priori* », où nous étudions l'expression d'un grand nombre de protéines, notamment par l'utilisation des gels d'électrophorèse bidimensionnels (approche protéomique).

L'avantage d'une telle approche est que la protéine, composant clé dans la cellule, constitue l'acteur final. Toutefois, nous pouvons citer certaines limites de la protéomique telles que :

- Faible résolution limitant la séparation à 500-2000 protéines maximum, ce qui sous-entend la perte de nombreuses protéines à cause :
 1. d'un manque de solubilité pour les protéines membranaires
 2. d'un niveau d'expression trop faible (ex : cytokines, facteurs de transcription...). Ce problème est moins critique au niveau de l'approche transcriptomique, puisque des techniques d'amplification (RT-PCR) peuvent permettre la quantification d'ARNm « low copy ».
- Difficulté d'identification et de quantification de l'expression de protéines très lourdes ou très légères, très acides ou très basiques.

I.4.3. Notre choix : l'approche protéomique par les gels 2D

Bien que les deux approches présentent des inconvénients et soient toutes deux complémentaires, il a fallu faire un choix, et nous avons opté pour l'approche protéomique.

Séparant les protéines cellulaires à la fois en fonction de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire, la technique des gels bidimensionnels nous permettra non seulement de comparer les profils électrophorétiques obtenus pour différentes conditions de stimulation, mais aussi de mettre en évidence de possibles modifications post-traductionnelles suite à la stimulation en présence d'isoprostane 8.

Après avoir obtenu un gel moyen pour chaque condition de stimulation, un petit groupe de protéines dont l'expression est significativement augmentée ou diminuée sera sélectionné. Ces protéines pourront alors être identifiées à l'aide de la spectrométrie de masse (MS/MS Q-TOF ou MALDI) après une digestion tryptique. Suite à l'ionisation des différents peptides obtenus par trypsinisation (par une technique de type MALDI ou Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, ou par une technique de ESI ou Electrospray ionisation), une étape de « **peptide mapping** » consistera à déterminer les masses de ces différents peptides. Si la protéine est déjà répertoriée dans une banque, le profil de masse des fragments peptidiques

ionisés permettra de l'identifier dans cette banque de données. Par contre si celle-ci ne peut être identifiée à ce stade, nous effectuerons alors un micro-séquençage à l'aide d'un spectromètre de type Q-TOF. A nouveau, les résultats obtenus seront confrontés à des séquences en acides aminés dans des banques de données.

Cette technique va nous permettre d'étudier la sur- ou sous-expression de protéines par les cellules endothéliales humaines HUV-EC-C suite à une stimulation avec notre molécule d'intérêt : l'isoprostane 8. Nous espérons par cette approche mieux comprendre à la fois les effets de l'isoprostane 8 et son mécanisme d'action.

I.5. Objectif du mémoire

En URBC, une équipe s'intéresse dans le cadre d'un programme PAI, aux mécanismes moléculaires jouant un rôle dans les étapes précoces de l'athérogenèse. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, différents acteurs cellulaires sont impliqués, dans les monocytes et les cellules endothéliales, sur lesquelles l'URBC concentrent ses efforts.

Il semble que le dysfonctionnement endothélial joue un rôle essentiel dans les étapes précoces de l'athérogenèse. Ce dysfonctionnement peut avoir diverses origines : stress hémodynamiques, concentrations excessives en LDL ou homocystéine, contexte pro-inflammatoire,... Dans ce contexte, nous avons voulu étudier le dysfonctionnement endothélial induit par l'isoprostane 8. Cette molécule, d'abord considérée comme un marqueur de stress oxydatif et de peroxydation lipidique *in vivo*, est effectivement plus abondante dans les parois vasculaires atteintes, dans le plasma et les urines de patients hypercholestérolémiques.

Mais, elle a également des effets biologiques qui en font une molécule pro-athérogène : elle est vasoconstrictrice, elle favorise l'agrégation des plaquettes et plus récemment, Leitinger et al (2001) ont montré qu'elle favorise l'adhérence des monocytes sur des cellules endothéliales.

Ce travail comporte donc deux parties. Dans la première partie, nous avons voulu confirmer les résultats de Leitinger et al (2001) sur le modèle de cellules endothéliales utilisées en URBC, les HUV-EC-C, des cellules endothéliales dérivées de cordon ombilical humain. Ces cellules sont disponibles à l'ATCC. Nous avons donc testé l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes et sur l'activation de facteurs de transcription. Obtenant des résultats positifs, nous sommes passés à la deuxième partie, c'est à dire de définir le dysfonctionnement endothélial induit par l'isoprostane 8, en étudiant les effets de la molécule sur l'expression des protéines, par l'approche protéomique. Dans ce travail, nous n'irons que jusqu'à l'analyse des gels pour identifier un ensemble de protéines dont l'expression est significativement altérée par l'isoprostane 8.

La perspective majeure de ce travail sera d'identifier ces protéines par les méthodes de la spectrométrie de masse.

Nous espérons par cette approche, obtenir un éclairage moléculaire nouveau, sur le concept de dysfonctionnement endothélial.

II. Matériels et méthodes

II.1. Culture Cellulaire

II.1.1. Cellules endothéliales HUV-EC-C

Lors de ce mémoire, nous avons utilisé une lignée de cellules endothéliales, dérivées de veines de cordons ombilicaux humains : les HUV-EC-C disponibles à l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Ces cellules se révèlent positives pour le facteur de von Willebrand, propre aux cellules endothéliales. En présence de divers facteurs de croissance, elles peuvent atteindre jusqu'à 50 à 60 doublements de population.

II.1.1.1. Culture cellulaire des HUV-EC-C

II.1.1.1.a. Matériels

- Cellules endothéliales HUV-EC-C (ATCC, No.CRL-1730)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm² (T25) ou de 75 cm² (T75) (Costar, USA)
- Solution stérile de trypsine-EDTA : trypsine à 0,05% ; EDTA 0,53 mM (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu de rinçage chaud : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Milieu F12K (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu F12K+ Hepes = milieu F12K stock
- Antibiotiques (Pénicilline, 50 U/ml-Streptomycine, 50 µg/ml) (BioWhittaker, Belgique)
- Fungizone (0,25 µg/ml) (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Tamponné à l'Hepes (10 mM) (Janssen Chimica, Belgique)
- Milieu F12K stock +10% de sérum (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu F12K complet (Gibco BRL, Royaume-Uni):
 - L-glutamine 2 mM
 - 1,5 g/l de bi-carbonate de sodium
 - 0,1 mg/ml d'héparine (Sigma H-3149)
 - 0,03-0,05 mg/ml de "endothelial cell growth supplement"(ECGS) (E-0760/Sigma, USA)
 - Sérum de veau fœtal à 10% (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Tube de 10 ml (Becton Dickinson, Royaume-Uni)
- Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)
- Gélatine 0,2% (Merck, Allemagne)
- Chambre de Neubauer (Vel, Belgique)
- Microscope inversé (Diavert, Leitz)
- Solution de Bleu de trypan à 4%, préparée dans 0,81% de NaCl et 0,06% de phosphate de potassium (Sigma, USA)
- Ampoules à congélation (Nunc, Danemark)
- DMSO (Acros Chimica, Belgique)
- Ethanol absolu (Merck, Allemagne)

II.1.1.1.b. Méthodes

a) Repiquage des cellules HUY-EC-C

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture stériles de 75 cm² (T75) préalablement incubées avec de la gélatine 0,2%. Ces boîtes de culture sont maintenues dans une étuve à 37°C + 5% de CO₂ afin de maintenir un pH adéquat. Les cellules en division sont cultivées dans du milieu F12K complet. Lorsqu'elles arrivent à confluence, c'est à dire lorsqu'elles forment un tapis cellulaire recouvrant toute la boîte de culture, ce qui correspond en moyenne à environ 3.10⁶ cellules, ces cellules sont alors repiquées de 1 en 3.

Pour ce faire, le milieu de culture de la T75 est d'abord décanté, puis, les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS préchauffé afin d'éliminer toute trace de sérum. Les cellules sont ensuite détachées suite à une incubation de 3 minutes à 37°C avec 1 ml de trypsine-EDTA. Une fois le détachement complet des cellules terminé, 9 ml de F12K+10% de sérum sont additionnés afin d'inhiber l'action de la trypsine. Le tout est récupéré dans un tube de 10 ml.

A ce stade, quelques µl de suspension cellulaire sont prélevés dans le but de réaliser un comptage cellulaire. Le reste de la suspension cellulaire sera, quant à elle, centrifugée pendant 10 minutes à 1.000 RPM, ce qui permet ainsi l'élimination complète de la trypsine. Le culot cellulaire est alors resuspendu dans 10 ml de F12K complet. Selon la quantité de cellules désirée, un certain volume de la suspension cellulaire est déposé dans la T75, préalablement incubée avec de la gélatine 0,2%, et le tout est porté à 15 ml de milieu F12K complet par T75.

Comptage des cellules

Le comptage est effectué dans une chambre de Neubauer illustrée en figure 33. La suspension cellulaire est tout d'abord diluée deux fois dans une solution de Bleu de Trypan qui va permettre de distinguer les cellules mortes (colorées en bleu) des cellules vivantes (non colorées). Ensuite, 10 µl de la dilution sont déposés de part et d'autre de la chambre de Neubauer et le comptage se fait sur les quatre carrés du haut et les quatre carrés du bas. Afin de connaître la quantité de cellules par ml, quelques corrections sont nécessaires, à savoir :

- une moyenne des huit carrés
- une multiplication par deux (dilution deux fois)
- une multiplication par 10.000 (facteur de correction : rapport entre le volume d'un des huit carrés et la quantité de solution déposée)

Exemple :

$$\left(\frac{x}{8}\right) \times 2 \times 10.000 = y$$

x : nombre de cellules calculé dans la chambre de Neubauer

y : nombre de cellules par millilitre

b) Congélation des HUV-EC-C

Une fois la confluence cellulaire atteinte, les cellules sont rincées, trypsinisées et recueillies dans 9 ml de F12K + 10% de sérum. Comme lors du repiquage, les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 1.000 RPM.

Le culot sera cette fois resuspendu dans 1 ml de milieu F12K, contenant 20% de sérum et 10% de DMSO, lequel constitue un cryoprotecteur sur les cellules.

L'équivalent de chaque T75 est alors transvasé dans un cryotube, placé dans un système de refroidissement (tube de 10 ml scellé et placé dans un tube de 50 ml scellé, le tout dans une bouteille remplie d'éthanol absolu) pour une nuit à -70°C . Par la suite, le cryotube est placé à -196°C dans de l'azote liquide. Cette technique permet d'une part, une congélation progressive et d'autre part, d'éviter la formation de cristaux au sein des cellules.

c) Décongélation des HUV-EC-C

Les cellules sont stockées dans des cryotubes, plongés dans de l'azote liquide (-196°C). Dès son retrait de l'azote liquide, l'ampoule doit être immédiatement plongée dans un bain d'eau à 37°C . La décongélation ne doit pas durer plus d'une minute. Les cellules sont ensuite déposées dans une T75 contenant 15 ml de F12K + 10% de sérum. Le lendemain, on veillera à changer le milieu afin d'éliminer le DMSO pouvant être toxique pour les cellules.

II.1.1.2. Test de cytotoxicité

Ce test est fondé sur la méthode au bromure d'éthidium et acridine-orange et permet d'évaluer une éventuelle cytotoxicité de nos molécules d'intérêt à des concentrations élevées sur les cellules endothéliales humaines HUV-EC-C. Le principe de ce test se base sur le fait que l'acridine-orange colore le noyau des cellules vivantes en vert et que le bromure d'éthidium colore le noyau des cellules mortes en orange. La cytotoxicité peut alors être évaluée en fonction du pourcentage de cellules fluorescentes en vert et en orange.

II.1.1.2.a. Matériels

Plaque 24 puits (Costar, USA)

Milieu F12K+Hepes (voir point II.1.1.1.a)

Milieu de rinçage : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4

Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz)

Solution de coloration diluée 100 fois dans du PBS et conservée un mois à 4°C :

- 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma, USA)
- 15 mg d'acridine-orange (Sigma, USA)
- Dissous dans 1 ml d'éthanol 95% et dans 49 ml d'eau distillée.

II.1.1.2.b. Méthodes

Les cellules sont repiquées la veille dans une plaque 24 puits à raison de 50.000 cellules par puits. Suite au rinçage des cellules à l'aide du milieu F12K + Hepes, les solutions de stimulation sont déposées dans les puits. Les puits « contrôles », quant à eux, ne reçoivent que

du milieu F12K + Hepes. Après une incubation établie durant un temps déterminé, les cellules sont observées au microscope à contraste de phase dans le but d'évaluer le nombre de cellules mortes flottantes. Les puits sont alors décantés et rincés deux fois avec 1 ml de PBS préchauffé. L'évaluation de la cytotoxicité se fait après dépôt de quelques gouttes de la solution de bromure d'éthidium/acridine-orange grâce à l'observation directe au microscope à fluorescence.

II.1.1.3. Molécules d'intérêts étudiées

- La DL-homocystéine (H-4628) (Sigma Aldrich, Royaume-Uni) provient d'un stock à 100 mM dissout dans du milieu F12K + Hepes. Ce stock sera dilué à la concentration voulue dans ce même milieu de culture F12K + Hepes et est préparé fraîchement avant chaque expérience.
- La DL-homocystéine thiolactone (H0376) (Sigma Aldrich, Royaume-Uni) provient d'un stock à 100 mM obtenu après dissolution dans du milieu de culture F12K + Hepes. Ce stock sera dilué à la concentration voulue dans ce même milieu de culture et est préparé fraîchement avant chaque expérience.
- L'isoprostane 8-iso-PGF₂ (Cayman, USA) provient d'un stock à 10 mM dilué dans de l'éthanol 0,5%. Ce stock sera dissout à la concentration désirée dans du milieu F12K + Hepes avec ou sans sérum (10%).

II.1.1.4. Mise en évidence du facteur de von Willebrand dans les cellules endothéliales de la lignée cellulaire HUV-EC-C

Les cellules endothéliales sont caractérisées par la présence de corps de Weibel-Palade. Ces derniers correspondent à des vésicules allongées servant de lieu de stockage pour le facteur de von Willebrand ainsi que pour l'interleukine-8, la P-sélectine et l'endothéline (Ross *et al.*, 1976). Le facteur de von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine plasmatique qui joue un rôle important dans l'hémostase. Il sert de médiateur entre l'adhésion et l'agrégation des plaquettes à des sites vasculaires altérés et transporte de manière extracellulaire le facteur VIII, un cofacteur essentiel du système de coagulation. La technique du marquage du facteur VIII permet ainsi de mettre en évidence la présence de ce dernier et donc la présence du vWF au sein de la lignée cellulaire étudiée. De cette manière, nous caractérisons la lignée cellulaire comme étant bien une lignée de cellules endothéliales.

II.1.1.4.a. Matériels

- Plaque 24 puits (Costar, USA)
- Couvre-objet de 13 mm de diamètre (Assistent, Allemagne)
- Gélatine 0,2% (Merck, Allemagne)
- Solution de rinçage : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Paraformaldéhyde 4% (PFA) (0376/Sigma, USA) : dilué dans du PBS
- Triton 1% (X100/Sigma, USA)
- PBS/BSA 2% (Albumine bovine A-4503/Sigma Aldrich, Angleterre)
- Boîte de pétri (Falcon, USA)

Parafilm (American National Can, Chicago, USA)
Papier humide
Anticorps primaire de lapin anti-vWF humain (Dako, Danemark)
Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin, couplé à une sonde fluorescente Alexa (488 nm) (A-11008/Molecular Probes)
TO-PRO 3 : dilué 80 x dans du PBS + 2 mg/ml de RNase (ICN cat. 101075 lot 9973B, Costa Mesa, USA)
Moviol (Sigma Aldrich, Royaume-Uni)
Plaque chauffante (Techne, Dri-block, DB-2D)
Microscope confocal à fluorescence TCS SP équipé d'un laser Argon/Krypton (488,568,647 nm) (Leica, Allemagne)
Lames (Menzel-Glaser, Allemagne)

II.1.1.4.b. Méthodes

a) Préparation des cellules

Les cellules endothéliales sont ensemencées la veille en plaque multipuits sur des couvre-objets stériles pré-incubés avec de la gélatine 0,2% de telle manière qu'elles soient sub-confluentes pour l'expérience. Les conditions de stimulation sont réalisées en double.

b) Fixation des cellules

Les puits sont décantés et les cellules sont directement incubées pendant 10 minutes dans du PFA 4% glacé afin de les fixer. Trois lavages au PBS sont réalisés avant de perméabiliser les cellules pendant 5 minutes au Triton 1%.

c) Dépôt de l'anticorps primaire

Trois lavages ont alors lieu dans du PBS/BSA 2% afin de saturer tous les sites non-spécifiques avant le marquage avec l'anticorps primaire. Le dépôt de ce dernier s'effectue en condition humide afin d'éviter l'évaporation de l'anticorps. Pour cela, cette chambre humide est constituée d'un morceau de parafilm déposé dans une boîte de Pétri en verre contenant du papier humidifié. Une goutte de 50 µl d'anticorps primaire dilué 50 fois y est déposée. Les dilutions des anticorps sont réalisées dans du PBS/BSA 2%. Sur cette goutte, on retourne le couvre-objet « côté cellules » qu'on laisse incuber 2 heures à température ambiante.

d) Dépôt de l'anticorps secondaire

Les anticorps primaires non fixés sont éliminés par trois rinçages au PBS/BSA 2% pendant 10 minutes. On dépose à nouveau le couvre-objet sur 50 µl d'anticorps secondaire dilué 500 fois dans du PBS/BSA 2% (toujours en chambre humide). L'incubation dure 1 heure à l'obscurité afin de ne pas altérer la fluorescence.

e) Marquage des noyaux au TO-PRO 3

Les cellules sont à nouveau rincées deux fois 5 minutes au PBS/BSA 2% puis de même avec du PBS. De la même manière que pour les anticorps primaire et secondaire, les cellules

sont incubées sur une goutte de 50 µl de TO-PRO3 pendant 30 à 35 minutes, à l'abri de la lumière. Enfin, les couvre-objets sont rincés deux fois 5 minutes dans du PBS. Pour l'observation au microscope, les couvre-objets sont montés sur lame avec du moviol chauffé à 56°C. La prise des photos se fera de préférence le lendemain, après polymérisation complète du moviol en chambre froide.

II.1.2. Cellules monocytaires humaines THP-1

Il s'agit d'une lignée monocyttaire humaine issue d'un jeune individu atteint d'une forme sévère de leucémie monocyttaire (Tsuchiya *et al.*, 1980). Ces cellules étant en suspension dans le milieu, le maintien de leur culture est différent de celui que nous venons de décrire pour les HUV-EC-C. Ces cellules nous ont été données par le Professeur C. Remacle (UCL).

II.1.2.1.a. Matériels

Cellules monocytaires THP-1

Boîtes de culture stériles de 25 cm² (T25) ou de 75 cm² (T75) (Costar, USA)

Solution stérile de trypsine-EDTA : trypsine à 0,05% ; EDTA 0,53 mM (Gibco BRL, Royaume-Uni)

Tube de 10 ml (Becton Dickinson, Royaume-Uni)

Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)

Chambre de Neubauer (Vel, Belgique)

Microscope inversé (Diavert, Leitz)

Solution de Bleu de trypan à 4%, préparée dans 0,81% de NaCl et 0,06% de phosphate de potassium (Sigma, USA)

Ampoules à congélation (Nunc, Danemark)

DMSO (Acros Chimica, Belgique)

Ethanol absolu (Merck, Allemagne)

Milieu de culture RPMI + 10% de sérum (Gibco BRL, Royaume-Uni)

II.1.2.1.b. Méthodes

a) Repiquage des THP-1

Les cellules en suspension se divisent en formant des grappes et sont repiquées deux fois par semaine, après avoir atteint une densité d'environ $1,6 \cdot 10^6$ cellules par ml. Les THP-1 de la T75 sont transvasées dans un tube de 10 ml afin d'être centrifugées 8 minutes à 1.000 RPM. Le culot est resuspendu dans 10 ml de RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal. La moitié de cette suspension est alors distribuée dans une nouvelle T75 contenant déjà 10 ml de RPMI + 10% de sérum.

b) Congélation des THP-1

Les cellules sont récoltées dans un tube de 10 ml afin d'être centrifugées 8 minutes à 1.000 RPM. Le culot est ensuite resuspendu dans 1 ml de milieu constitué de 92% de sérum et 8% de DMSO. Comme pour les HUV-EC-C, le contenu d'une T75 est alors déposé dans un

cryotube, lui-même dans le système de refroidissement pour une nuit à -70°C . Le lendemain, le cryotube est placé dans l'azote liquide.

c) Décongélation des THP-1

Le principe est identique à celui des HUV-EC-C mis à part la différence de milieu contenu dans la T75 : les cellules sont diluées dans 15 ml de RPMI + 20% de sérum préchauffé. Une fois que les cellules ont repris un rythme de division normal, le milieu de culture est substitué par du RPMI + 10% de sérum.

II.2. Caractérisation de l'état d'activation des cellules endothéliales HUV-EC-C

II.2.1. Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription NF κ B par dosage colorimétrique

Le facteur de transcription NF κ B est un facteur clé intervenant dans tous les phénomènes inflammatoires. Bon nombre d'études suggèrent d'ailleurs son implication dans les processus d'athérogenèse. Pour suivre son activation, nous avons un dosage colorimétrique mis au point par Renard et *al* en 2001. Le test se base sur la capacité du facteur de transcription NF κ B activé, à se fixer sur sa séquence consensus d'ADN.

En bref : les plaques 96 puits sont pré-conditionnées avec de la streptavidine ; des sondes de capture double brin, contenant la séquence consensus et portant une biotine à leur extrémité, sont déposées, la biotine se liant à la streptavidine. Dès lors, les dimères de NF κ B activés déposés dans les puits, vont se fixer sur leur séquence consensus. La détection de cette liaison se fait par incubation d'un anticorps primaire anti-NF κ B et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dont l'activité se révèle par colorimétrie (Figure 34).

II.2.1.1.a. Matériels

a) Fixation des sondes de capture double brin.

Plaque 96 puits pré-conditionnées avec de la streptavidine (Roche, Allemagne)

PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH7,4

Sondes de capture biotinylées de 127 paires de bases contenant la séquence consensus de NF κ B (Eurogentec, Liège, Belgique)

Tween 20 à 0,1% (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)

Eau distillée

PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH7,4

b) Stimulation des cellules et dosage des protéines par la méthode de Bradford

Boîtes de culture T25 (Costar, USA)

Milieu F12K+Hepes (Gibco BRL, Royaume-Uni)

TNF alpha (10 ng/ml) comme contrôle positif (R&D Systems, Belgique)

PBS froid : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4

Racloir

Centrifugeuse à 4°C (Labofuge 44R, Heraeus, Allemagne)

Stock tampon de lyse :

- Hepes 20 mM pH 7,5 (Janssen Chimica, Belgique)
- NaCl 3,5 M (Merck, Allemagne)
- MgCl₂ 1 mM (Merck, Allemagne)
- EDTA 0,5 mM pH 7,5 (Merck, Allemagne)
- EGTA 0,1 mM pH 7,5 (Merck, Allemagne)
- Glycérol 20% (Merck, Allemagne)
- Nonidet P-40 1% (NP-40) (ON-6537, Sigma, USA)
- Porté à 100 ml avec de l'eau filtrée sur millex 0,22 µm et à pH 7,5

Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Complete, Boehringer, Allemagne)

Dithiothréitol (DTT) : solution stock à 1 M (D-8024, Sigma, USA)

Tampon de lyse: 1 ml de stock + 40 µl PIC + 5 µl DTT (1M)

Vortex

Etalon BSA : Sérum Albumine Bovine (5 µg dans 3,6 µl d'eau distillée) (Sigma, USA)

Spectrophotomètre (Uvikon 930, Kontron Instruments, Suisse)

Colorant Bleu de Coomassie (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories)

Eau distillée

c) Test colorimétrique proprement dit

Tampon de lyse : 1 ml de stock + 40 µl PIC + 5 µl DTT (1M)

Tampon BB stock :

- Hepes 10 mM pH 7,5 (Janssen Chimica, Belgique)
- KCl 300 mM (Merck, Allemagne)
- Glycérol 20% (Merck, Allemagne)
- DTT (10 mM) (D-8024, Sigma, USA)

Tampon BBC :

- 400 µl de tampon BB stock
- 200 µl d'eau autoclavée
- 200 µl de BSA 5% (A-3059, Sigma, USA)
- 200 µl de DNAss stock 10 mg/ml
- 2 µl DTT 1 M (D-8024, Sigma, USA)

PBS bis: NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH7,4

Tween 20 à 0,1% (Sigma Aldrich, Allemagne)

Caséine (Sigma, USA)

Anticorps primaire polyclonal (IgG) de lapin anti-p65 humain (Santacruz, USA)

Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) (Roche, Allemagne)

Solution Chromogen (TMB) (BioSource, Belgique)

Solution stop (BioSource, Belgique)

Lecteur de multi-plaque (Ultramark, BioRad, USA)

II.2.1.1.b. Méthodes

a) Fixation des sondes de capture

Les sondes de capture biotinylées sont déposées dans les puits pré-conditionnés à la streptavidine, à une concentration de 2 picomoles par puits et diluées dans du PBS. Après une heure d'incubation à 37°C, les puits sont lavés deux fois avec 100 µl de PBS bis + Tween 20 à 0,1% puis une fois avec 200 µl d'eau distillée. Ces lavages éliminent ainsi l'excès de sondes non fixées à la streptavidine. Enfin, les puits sont séchés à 37°C pendant environ une heure, puis stockés en chambre froide à 4°C.

b) Stimulation des cellules et extraction protéique

Le milieu de culture de la T25 confluente est décanté et les cellules sont rincées avec 2 ml de F12K + HEPES. Ensuite, les cellules sont incubées pendant une durée déterminée avec les solutions de stimulation. Le contrôle positif est réalisé avec du TNF_α et le contrôle négatif correspond à du F12K + HEPES. Suite à la stimulation, les T25 sont déposées sur glace et rincées deux fois avec 5 ml de PBS froid.

Les cellules sont alors raclées deux fois dans 750 µl de PBS froid et récupérées dans un eppendorf. Celui-ci est centrifugé dix minutes à 1.000 RPM à 4°C afin de récolter les cellules. Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse pendant dix minutes sur glace pour faire éclater les cellules. Par la suite, une centrifugation de 20 minutes à 13.000 RPM à 4°C permet d'éliminer les débris. Les surnageants, contenant les protéines, sont finalement récupérés et stockés à -20°C. Ils serviront et au dosage des protéines par la méthode de Bradford et au dosage colorimétrique en tant que tel.

c) Méthode de Bradford

En complément de nos échantillons dosés en double, deux étalons (3,6 µl de BSA), deux blancs étalons (3,6 µl d'eau distillée) et deux blancs échantillons (4 µl de tampon de lyse) sont également réalisés.

En pratique, dans un premier temps, 1 ml de colorant, dilué 5 fois dans de l'eau distillée, est déposé dans chaque tube. Dans un second temps, toutes les 30 secondes, 4 µl d'extrait protéique y sont additionnés. Après 5 minutes d'incubation, la lecture de l'absorbance à 595 nm débute, également de 30 secondes en 30 secondes. La concentration en protéines se calcule de la manière suivante (µg/µl) :

$$\frac{\{(moyenne \text{ échantillon} - moyenne \text{ blanc}) / (moyenne \text{ étalon} - moyenne \text{ blanc étalon})\} \times 5}{\text{volume des échantillons}}$$

d) Fixation des extraits cellulaires

Les extraits cellulaires sont déposés dans les puits de manière à obtenir 25 µg de protéines par puits pour un volume final de 20 µl (à compléter avec du tampon de lyse). Ensuite, 30 µl de tampon de liaison BBC sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est alors incubée une

heure à température ambiante sous légère agitation. Par la suite, les puits sont lavés trois fois deux minutes avec 200 μ l par puits de PBS bis + Tween 20 à 0,1% pour éliminer toutes protéines non liées à la séquence consensus.

e) Fixation de l'anti-p65

L'anticorps primaire, dilué 1.000 fois dans du PBS bis + caséine 1%, est déposé à raison de 100 μ l par puits et incubé une heure à température ambiante. Afin d'éliminer les anticorps non fixés, les puits sont rincés trois fois deux minutes avec 200 μ l par puits de PBS bis + Tween 20 à 0,1%.

f) Fixation du conjugué

L'anticorps secondaire conjugué à la HRP, dilué 1.000 fois dans du PBS bis + caséine 1%, est déposé de manière identique que l'anticorps primaire et les puits sont, par après, lavés quatre fois deux minutes avec 200 μ l par puits de PBS bis + Tween 20 à 0,1%. Afin de mettre en évidence l'activité de la HRP (human raifort protein), 100 μ l de TMB sont déposés dans chaque puits à l'abri de la lumière. Après 10 minutes d'incubation, 100 μ l de solution stop sont directement ajoutés dans chaque puits pour arrêter la réaction et l'activation de NF κ B est alors estimée grâce à un lecteur de multi-plaques à 405 nm.

II.2.2. Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par dosage colorimétrique

Ce test est comparable à celui utilisé pour le dosage de NF κ B, excepté quelques différences concernant le protocole d'extraction nucléaire de AP-1 (Figure 34).

II.2.2.1.a. Matériels

a) Fixation des sondes de capture :

Plaque 96 puits pré-conditionnée avec de la streptavidine (Roche, Allemagne)
Sondes de capture double brin biotinylées contenant la séquence oligo-nucléotidique consensus pour AP-1 (Eurogentec, Liège, Belgique)
PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
Eau distillée
Tween 20 à 0,1% (Sigma Aldrich, Allemagne)

b) Extraction et dosage protéique :

Solution de rinçage 1 : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
Solution de rinçage 2 : PBS + Na₂MoO₄ 1 mM + NaF 5 mM
HB 2x : pour 100 ml
- 0,95 g d'Hepes (40 mM) (Janssen Chimica, Belgique)
- 42 mg de NaF (10 mM) (Merck, Allemagne)

- 48 mg de Na₂MoO₄ (2 mM) (Sigma, USA)
 - 7,45 mg d'EDTA (0,2 mM) (Merck, Allemagne)
- HB 1x : diluer deux fois du HB 2x dans de l'eau filtrée

PIB : pour 10 ml

- 1,25 ml de NaF 1 M (Merck, Allemagne)
- 250 µl de NaVO₃ 1 M
- 2,5 ml de PNPP 1 M
- 2,5 ml de _-glycérol phosphate 1 M
- 3,5 ml d'eau

Tampon de lyse : pour 20 ml

- 10 ml de HB 2x
- 400 µl de Nonidet P-40 10% (NP-40) (Sigma, USA)
- 9,6 ml d'eau

RE stock : pour 20 ml

- 10 ml de HB 2x
- 4 ml de glycérol 87% (Merck, Allemagne)
- 6 ml d'eau

RE complet :

- 500 µl de RE stock
- 20 µl de PIC (Boehringer, Allemagne)
- 20 µl de PIB

SA stock : pour 20 ml

- 10 ml de HB 2x
- 4 ml de glycérol 87% (Merck, Allemagne)
- 4 ml de NaCl 4 M (Merck, Allemagne)
- 2 ml d'eau

SA complet :

- 500 µl de SA stock
- 20 µl de PIC (Boehringer, Allemagne)
- 20 µl de PIB (Boehringer, Allemagne)

Extraits protéiques de cellules stimulées ou non

Réactif de protéine : bleu de Coomassie dilué 5 fois dans de l'eau distillée (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories)

Etalon : BSA 5 µg dans 3,6 µl d'eau distillée (Sigma, USA)

Centrifugeuse (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne)

c) Dosage colorimétrique proprement dit :

Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)

PMA (0,1 µg/ml) (Sigma, USA) + ionomycine (1 µM) (I.0634/Sigma, USA)

Tampon de lyse complet :

- 1 ml de RE stock
- 1 ml de SA stock
- 80 µl de PIC (Boehringer, Allemagne)
- 80 µl de PIB
- 2 µl de DTT 1 M (Sigma, USA)

Tampon de binding complet :

- 200 µl de tampon de binding 3x
- 338 µl d'eau autoclavée
- 2 µl de Poly dI-dC 0,05 µg/µl (Roche, Allemagne)
- 0,6 mg de Gloria (Nestlé, Belgique)

- 60 µl de DTT 10 mM (Sigma, USA)
- Tampon de binding 3x :
- NaCl 24 mM (Merck, Allemagne)
 - Hepes 6 mM (Janssen Chimica, Belgique)
 - EDTA 0,6 mM (Merck, Allemagne)
 - Glycérol 36% (Merck, Allemagne)
 - Ajusté à pH 7,9
- PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- BSA (A-3059/Sigma, USA)
- Anticorps primaire polyclonal (IgG) de lapin anti-cFos (Santacruz, USA)
- Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Roche, Allemagne)
- TMB (Bio Source, Belgique)
- Solution Stop (Bio Source, Belgique)
- Lecteur multi-plaque (Ultramark, Bio-Rad, USA)

II.2.2.1.b. Méthodes

a) Fixation des sondes de capture :

Les sondes de capture biotinylées sont déposées dans les puits pré-conditionnés à la streptavidine, à une concentration finale de 4 picomoles pour 50 µl de PBS par puits. Après, une heure d'incubation à 37°C, les puits sont lavés deux fois avec 100 µl de PBS bis + Tween 20 à 0,1% puis une fois avec 200 µl d'eau distillée. Ces lavages éliminent ainsi l'excès de sondes non fixées à la streptavidine. Enfin, les puits sont séchés à 37°C pendant environ une heure puis stockés en chambre froide à 4°C.

b) Stimulation des cellules et extraction protéique :

Les cellules HUV-EC-C sont repiquées la veille en boîte de culture T25 à une densité moyenne de 1.10^6 cellules. Les contrôles négatifs correspondent à des cellules incubées en présence du milieu F12K + Hepes ou du tampon de dilution de la substance testée. Les contrôles positifs correspondent à une stimulation avec une solution de PMA (0,1 µg/ml) et d'ionomycine (1 µM).

La stimulation finie, les boîtes vont être une première fois rincées avec 3 ml de PBS froid afin d'éliminer la solution de stimulation. Ensuite, un second rinçage est effectué avec 3 ml de solution de rinçage 2, contenant des inhibiteurs de phosphatases. Les cellules sont alors incubées durant 10 minutes sur glace en présence de 3 ml de HB 1x froid. Cette solution hypotonique permet aux cellules de gonfler. Suite à cette incubation, le HB est décanté et on ajoute 200 µl de tampon de lyse afin de claquer les membranes cellulaires. Les cellules vont être raclées dans ce dernier et centrifugées 30 secondes à 13.000 RPM. Le culot est alors resuspendu dans 30 µl de RE complet et un volume identique de SA complet est ajouté. Cette solution hypertonique permet l'extraction des protéines nucléaires vers le tampon. L'incubation sur roue dure au moins 30 minutes à 4°C afin d'éliminer les membranes nucléaires. Le surnageant est alors aliquoté, dosé par Bradford et peut être conservé à -70°C.

c) Dosage colorimétrique proprement dit :**Fixation des lysats cellulaires**

Les extraits cellulaires sont dilués dans du tampon de lyse de façon à obtenir 10 µg de protéines par puits et pour un volume final de 20 µl. Ces 20 µl sont déposés dans chaque puits en plus de 30 µl de tampon de binding complet, fraîchement préparé. L'incubation dure une heure sous légère agitation. Trois lavages de deux minutes au PBS bis + Tween 20 à 0,1% permettent d'éliminer les protéines non liées à la séquence AP-1.

Fixation de l'anticorps primaire anti-cFos

100 µl d'anticorps dilué 1.000 fois dans du PBS bis + BSA 1% sont déposés dans chaque puits pour une heure d'incubation à température ambiante. Suite à cela, les puits seront rincés trois fois avec du PBS bis + Tween 20 à 0,1%.

Fixation de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase :

De nouveau, l'anticorps dilué 1.000 fois est déposé dans les plaques pour une heure d'incubation, puis rincé quatre fois au PBS bis + Tween 20 (0,1%).

Réaction colorimétrique :

100 µl de TMB sont déposés dans chaque puits à l'abri de la lumière. Après une incubation de 10 minutes, la réaction est immédiatement arrêtée grâce à l'ajout de 100 µl de solution stop. La lecture se fait à l'aide d'un lecteur de multi-plaques à 450 nm.

II.2.3. Dosage de l'expression de MCP-1 par Elisa

Plusieurs équipes de chercheurs ont démontré l'action des ox-LDL et d'autres stimuli pro-athérogènes sur l'augmentation de l'adhérence et de la migration des monocytes sur et à travers l'endothélium. Cette expérience va donc tenter de mettre en évidence l'augmentation de l'expression d'une molécule chémoattractante, le MCP-1, par les cellules endothéliales HUV-EC-C, stimulées avec les molécules d'intérêts.

II.2.3.1.a. Matériels

- Plaque 24 puits (Costar, USA)
- TNF alpha (10 ng/ml) comme contrôle positif (R&D Systems, Belgique)
- Etalon BSA (200 µg/ml)
- Solution de NaOH 1 N (Merck, Allemagne)
- Solution de NaOH 0,5 N (Merck, Allemagne)
- Milieu de rinçage : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH7,4
- Solution A :

- 400 ml de Na₂CO₃ 2% (Sigma Aldrich, Royaume-Uni)
 - 4 ml de Tartrate 2% (Sigma Aldrich, Royaume-Uni)
 - 4 ml de CuSO₄ 1% (Sigma Aldrich, Royaume-Uni)
- Folin dilué 2 fois dans de l'eau distillée (Merck, Allemagne)
- Vortex
- Eppendorfs
- Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)
- Spectrophotomètre (Uvikon 930, Kontron instruments, Suisse)
- Tubes de 5 ml
- Milieu F12K+Hepes (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Quantikine h-MCP-1 Immunoassay (DCP00/ R & D systems, Royaume-Uni) contenant :
- Plaque 96 puits au fond desquels sont fixés des Ac monoclonaux murins anti-hMCP-1
 - Conjugué MCP-1 : Ac polyclonal anti-MCP-1, conjugué à une HRP
 - Solution standard de MCP-1
 - Diluant de calibration RD5L concentré 5 fois
 - Solution de rinçage concentrée 25 fois
 - Réactif de coloration A : peroxyde d'hydrogène
 - Réactif de coloration B : tétraméthylbenzidine
 - Solution stop : acide sulfurique

II.2.3.1.b. Méthodes

a) Stimulation des cellules HUV-EC-C :

Le repiquage des cellules est effectué la veille dans une plaque 24 puits à raison de 100.000 HUV-EC-C par puits. Le jour de l'expérience, le milieu de culture est décanté et les cellules arrivées à confluence sont rincées une fois au F12K + Hepes. Les milieux de stimulation sont alors déposés dans les puits « tests » adéquats. Le contrôle positif est le TNF_α (10 ng/ml) et les conditions sont réalisées en double.

b) Récupération du surnageant

Après la stimulation, le surnageant contenant ou non le MCP-1 secrété par les cellules, est délicatement récupéré et centrifugé 3 minutes à 13.000 RPM afin d'éliminer toutes cellules flottantes ou débris. Le surnageant est alors aliquoté et congelé à -20°C pour effectuer plus tard le dosage du MCP-1 secrété en tant que tel.

D'un autre côté, après avoir repris le surnageant des puits de la plaque, les cellules sont directement rincées deux fois au PBS préchauffé, afin de les préparer pour le dosage des protéines par la méthode de Folin.

c) Dosage des protéines par la méthode de Folin

Un ml de NaOH 0,5 N est ajouté sur les cellules pour une incubation de 30 minutes à température ambiante. Un étalon BSA et un blanc (eau distillée) seront également préparés dans du NaOH 1 N. Après quoi, les surnageants contenant alors les protéines libérées, sont récupérés et congelés à -20°C pour réaliser plus tard le Folin.

Pratiquement, pour le Folin, 400 µl de protéines sont prélevés et ajoutés à 2 ml de la solution A, préparée fraîchement. Les solutions sont alors agitées et incubées 15 minutes. Ensuite, 200 µl de Folin dilué deux fois dans de l'eau distillée sont ajoutés à chaque condition toutes les 30 secondes. Les échantillons sont à nouveau agités et incubés pendant 30 minutes. L'absorbance se lira au spectrophotomètre à 660 nm de 30 secondes en 30 secondes.

d) Dosage du MCP-1 secrété par utilisation du kit R&D Quantikine human MCP-1

La première étape de ce dosage sera la reconstitution du standard afin de réaliser par après la droite d'étalonnage. Pour cela, il faut tout d'abord reconstituer le Standard MCP-1 avec 5 ml du diluant de calibration RD5L. Cette dilution produit une solution stock de 2.000 pg/ml. A partir de ce stock, des dilutions de 2 en 2 avec du diluant de calibration RD5L sont réalisées jusqu'à une concentration de 31,2 pg/ml. Cette droite d'étalonnage nous permettra ensuite de calculer la concentration en MCP-1 contenue dans nos échantillons stimulés ou non avec les molécules d'intérêts (Figure 35).

La deuxième étape n'est autre que le dosage en tant que tel réalisé dans une plaque 96 puits pré-incubée avec un anticorps monoclonal spécifique du MCP-1 (Figure 36). Les aliquots ainsi que les différentes dilutions du standard sont déposés à raison de 200 µl par puits. L'incubation dure deux heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés trois fois avec 300 µl de la solution de rinçage diluée 25 fois dans de l'eau distillée. 200 µl d'un anticorps polyclonal, spécifique du MCP-1 et couplé à une peroxydase, sont alors déposés dans chaque puits. L'anticorps en question ira reconnaître (pour s'y lier) le MCP-1, lui-même fixé au fond de chaque puits. L'incubation dure une heure à température ambiante. Trois lavages sont alors réalisés comme précédemment afin d'éliminer le conjugué-HRP non fixé. 200 µl de solution de coloration sont déposés dans les puits à l'obscurité pendant 20 minutes. Suite à la réaction enzymatique, il apparaît un produit de réaction qui vire au jaune après l'ajout des 50 µl de solution stop. Le dosage des molécules MCP-1 est réalisé par lecture en colorimétrie à 450 nm. De plus, le lecteur de plaque, par une mesure duale (à 450 nm et 570 nm), permet d'éliminer les interférences dues aux imperfections de la plaque.

II.2.4. Etude de l'adhérence des cellules monocytaires humaines THP-1 sur les cellules endothéliales HUV-EC-C en plaque multi-puits

Par ce test, nous voulons tenter de mettre en évidence une augmentation de l'adhésion monocyttaire sur les cellules endothéliales HUV-EC-C stimulées avec les molécules d'intérêts. La mesure de l'adhérence se fait en cytofluorimétrie, suite à un marquage préalable des cellules THP-1 à la calcéine sous forme d'acétoxyméthyl ester, par utilisation du «Vybrant™ Cell Adhesion Assay Kit» (Figure 37). Il s'agit d'une molécule non fluorescente qui pénètre dans les cellules où elle sera clivée par les estérases endogènes en un produit fluorescent (Figure 38). Un puits « 100% » est réalisé afin de mesurer la fluorescence émise par 150.000

THP-1, pour calibrer le test. Un puits « blanc » se fera sur des cellules endothéliales non stimulées avec des THP-1 non marqués. Un puits « contrôle » permettra également de mesurer l'adhérence sur des cellules endothéliales non stimulées. Ces trois conditions permettront de quantifier l'adhérence des monocytes en nombre de THP-1.

II.2.4.1.a. Matériels

Plaque 96 puits (Costar, USA)
Milieu de culture F12K+Hepes (Gibco BRL, Royaume-Uni)
TNF alpha (10ng/ml) comme contrôle positif (R&D Systems, Belgique)
Tubes de 10 ml
Chambre de Neubauer (Vel, Belgique)
Microscope inversé (Diavert, Leitz)
Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)
Milieu de rinçage : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
RPMI sans sérum (Gibco BRL, Royaume-Uni)
Vybrant™ Cell Adhesion Assay Kit, comportant de la Calcéine-AM 1 mM (Molecular Probes)
Cytofluostar (BMG)

II.2.4.1.b. Méthodes

a) Stimulation des cellules HUV-EC-C

Les cellules ont été repiquées la veille en plaque 96 puits à raison de 20.000 cellules par puits. Le lendemain, arrivées à confluence, les cellules sont rincées une fois avec du milieu F12K + Hepes et incubées à 37° pendant six heures avec les différentes solutions de stimulation. Toutes les conditions de stimulation sont réalisées en quadruple.

b) Préparation des cellules monocytaires humaines THP-1

La suspension cellulaire de la T75 contenant les THP-1 est prélevée de manière à obtenir 150.000 THP-1 par puits. Les cellules sont centrifugées et lavées deux fois avec du PBS stérile pour finalement être resuspendues dans 10 ml de RPMI sans sérum. A ce stade, le prélèvement d'une partie de la suspension cellulaire est nécessaire pour constituer les blancs alors que les cellules restantes seront marquées à la calcéine AM. Ce marquage consiste en une incubation de 30 minutes à 37°C, en totale obscurité et en présence de calcéine AM (5 µM final). Cette suspension est mélangée délicatement toutes les 10 minutes.

Le marquage terminé, les THP-1 sont centrifugés et rincés deux fois avec 10 ml de RPMI sans sérum pour finalement être suspendus à raison de 1.500.000 cellules par ml de F12K + Hepes.

c) Dépôt des THP-1 sur les cellules HUV-EC-C

Après les six heures de stimulation, les cellules HUV-EC-C sont rincées délicatement avec du F12K + hepes et incubées pendant une heure à 37°C avec 100 µl de la suspension de THP-1 marqués (ou non pour les blancs). L'incubation terminée, les puits sont délicatement

rincés quatre fois avec du F12K + Hepes préchauffé pour éliminer les THP-1 non fixés (sauf pour les 100% et les blancs). Après ajout de 200 µl de PBS dans les puits lavés et décantés, la fluorescence est mesurée au cytofluostar à une longueur d'onde d'excitation de 494 nm et d'émission de 517 nm.

II.3. Analyse protéomique par gels 2D

La technique d'électrophorèse par gels à deux dimensions est une méthode puissante permettant d'approcher de façon quantitative et qualitative l'expression protéique d'un système particulier, dans notre cas, des cellules stimulées ou non à l'isoprostane-8.

L'approche consiste à séparer l'ensemble des protéines contenues dans un extrait cellulaire selon deux propriétés indépendantes : le poids moléculaire et la charge.

La préparation de l'échantillon protéique est également déterminante. En effet, l'extraction doit être efficace, c'est à dire permettre de solubiliser au maximum les protéines tout en veillant au maintien de l'intégrité des protéines, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de protéases. Pour ces raisons, nous utilisons un tampon de lyse contenant :

- de l'urée : qui va assurer la solubilisation des protéines en exposant leurs charges ;
- de la thiourée : qui va assurer la solubilisation des protéines membranaires ;
- un détergent zwitterionique, le CHAPS : il permet d'éviter les interactions hydrophobes ;
- du DTT : qui va réduire les ponts hydrophobes ;
- des inhibiteurs de protéases.

II.3.1. Première dimension : isoélectrofocalisation (IEF)

Au cours de cette étape, les protéines migrent dans un champ électrique, le long d'un gradient de pH immobilisé, pour rejoindre leur point isoélectrique. Pour rappel, les protéines ayant atteint leur pI possèdent une charge totale neutre.

La mise au point de ces gradients à pH immobilisés, aussi appelés gradients à immobilines, consiste à incorporer de façon covalente des molécules venant d'un gradient de tampons comportant des groupements acides et basiques dans le gel de polyacrylamide lors de son coulage. Cela permet donc d'obtenir un véritable réseau comportant différentes zones tampons dans lesquelles viendront s'immobiliser les protéines à leur point isoélectrique (Figure 39).

Ces gels ont plusieurs avantages :

- simple d'utilisation, ils se présentent sous forme déshydratée
- très reproductibles, car les groupements chargés fixés de façon covalente dans le gel, ne dérivent plus au cours du temps
- large choix dans la gamme de pH permettant de focaliser la séparation de protéines plus acides ou basiques selon le pH ciblé et choix de gradients linéaires ou non
- capacité de chargement en protéines importante

II.3.2. Deuxième dimension : séparation des protéines selon leur poids moléculaire

Afin de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, on se base sur le principe de l'électrophorèse en conditions SDS-PAGE. Celles-ci se basent sur les propriétés du SDS (sodium dodécyl sulfate), détergent anionique, à dénaturer les protéines en se liant sur le squelette polypeptidique. Cette liaison permet ainsi de masquer la charge électrique intrinsèque de chaque protéine et de conférer une charge proportionnelle à la masse de la protéine. La charge initiale des protéines n'intervient donc plus sur la séparation des protéines.

Afin d'obtenir ces conditions dénaturantes, le strip de première dimension doit tout d'abord subir une rééquilibration dans un tampon contenant les réactifs suivants :

- tris assurant le pH 8,8 et donc la charge négative ;
- urée pour la solubilisation des protéines ;
- glycérol afin de faciliter le passage des protéines dans le second gel ;
- DTT réduisant les ponts disulfures ;
- diiodoacétamide qui en se fixant sur le soufre empêche la formation des ponts disulfures et maintient donc les protéines sous forme réduite ;
- traces de bleu de bromophénol pour la visualisation ;
- SDS.

Une fois équilibré, le gel de première dimension est déposé sur l'extrémité cathodique du gel SDS-PAGE. Les protéines, toutes chargées négativement, vont alors migrer en fonction de leur poids moléculaire vers l'extrémité anodique suite à l'application d'un courant électrique.

II.3.3. Visualisation des protéines

Les protéines peuvent être révélées par différentes techniques de coloration utilisant le bleu de Coomassie, le nitrate d'argent ou encore des réactifs fluorescents ou radioactifs (méthionine S^{35}). Elles diffèrent notamment par leur sensibilité, le fait qu'elle soit quantitative ou plutôt qualitative,etc.

Le choix de la méthode de révélation va donc dépendre à la fois de la résolution recherchée et du type d'analyse à effectuer après séparation des protéines (spectrométrie de masse, séquençage,) (Gorg *et al.*, 2000).

La coloration au bleu de Coomassie nécessite de charger plus de protéines que dans le cas d'une coloration à l'argent (environ 100 μ g).

II.3.4. Identification des protéines

La première étape de l'analyse des gels est la digitalisation de ceux-ci, c'est à dire la transformation de l'image expérimentale en une image numérique utilisable par l'ordinateur. Lors de la digitalisation, le scanner (Image Scanner), préalablement calibré à des conditions de

brillance et de contraste particulières, découpe l'image en pixels de différentes intensités. Un logiciel (Image Master 3.1) traite ensuite, en différentes étapes, les images obtenues :

- La première étape du traitement des gels est la détection des spots sur ces derniers. Durant celle-ci, différents paramètres sont fixés indiquant au logiciel les caractéristiques nécessaires à un spot pour être accepté comme étant significatif. Parmi ces paramètres, on peut notamment citer la sensibilité, « l'operator size » qui indique la distance entre deux points afin qu'ils soient considérés comme distincts et le « noise factor », c'est à dire le nombre de pixels minimum pour former un spot. Le logiciel fourni alors une série de spots choisis parmi les taches du gel mais cette série est encore modifiable manuellement.
- La seconde étape est celle de la soustraction du bruit de fond.
- Puis, afin de comparer une série de gels entre eux, on choisit parmi ceux-ci un gel « maître » (en l'occurrence ici le gel contrôle) qui servira de référence. Vient alors l'étape de « matching » durant laquelle le logiciel compare les intensités des spots correspondant à une même protéine sur les différents gels.
- L'étape suivante consiste à calibrer nos gels selon les échelles de poids moléculaire et de point isoélectrique.
- Ensuite, l'étape de normalisation sera effectuée ; elle permettra de corriger la surcharge en protéines de certains gels afin d'obtenir une même intensité pour tous les gels et ainsi de surmonter le problème de la quantité effective d'échantillon chargée.
- Enfin, une dernière étape de filtration permet de mettre en évidence les spots présentant des caractéristiques intéressantes telles qu'une augmentation par rapport au gel de référence,

II.3.4.1.a. Matériels

a) Première dimension

Tampon de lyse : pour 10 ml

- 1,52 g de thiourée (2 M) (Sigma, USA)
- 3 g d'urée (7 M) (Pharmacia, Suède)
- désioniser la solution sur résine puis ajouter :
- 0,2 g de CHAPS (2 %) (Pharmacia, Suède)
- 0,2 g de SB 3-10 (2 %) ou sulfobétaïne (Sigma, USA)
- 0,1 g de DTT (1 %) (Sigma chemical, USA)
- 0,2 ml de pharmalyte 3-10 (2 %) (Amersham Pharmacia, Suède)
- 200 µl d'inhibiteurs de protéases

PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4

Centrifugeuse (Biofuge Pico, Heraeus, Allemagne)

Tampon de réhydratation : pour 2,5 ml

- 10,8 g d'urée (6 M) (Pharmacia, Suède)
- 4,5 g de thiourée (2 M) (Sigma, USA)
- désioniser la solution sur résine puis ajouter :
- 7 mg de DTT (Sigma chemical, USA)
- 1,2 g de CHAPS (4 %) (Pharmacia, Suède)
- traces de bleu de bromophénol (Merck, Allemagne)

- 12,5 µl d'IPG buffer (Pharmacia, Suède)
- Immobiline drystrip de diverses gammes de pH (Amersham Pharmacia, Suède)
- Huile de paraffine
- IPGphor isoelectric focusing system (Amersham Pharmacia, Suède)

b) Deuxième dimension

Criterion™ Precast Gel (1 mm d'épaisseur, 11 cm ; 12,5%) (Bio Rad, Allemagne)
 Ettan™ DALT II Gel (1 mm d'épaisseur, 18 cm ; 12,5%) (Amersham pharmacia, Suède)
 Ettan DALT II Buffer Kit, contenant :

- Anode buffer (5 M de diéthanolamine et 5 M d'acide acétique)
- Cathode buffer (0,25 M Tris ; 1,92 M Glycine ; 1% SDS)
- Gel buffer
- Sialing solution (0,5% d'agarose et 0,002% de bleu de bromophénol)

Tris HCl 1,5 M pH 8,8

- 545 g de Tris (Pharmacia, Suède)
- 150 ml d'HCl 6 M pH 8,8 (Pharmacia, Suède)
- porter à 3 litres avec de l'eau distillée

Solution d'équilibration : pour 200 ml

- 6,7 ml de Tris HCl 1,5 M pH 8,8,
- 72,07 g d'urée 6 M (Pharmacia, Suède)
- 69 ml de glycérol (30 %) (Merck, Allemagne)
- bleu de bromophénol (Merck, Allemagne)
- 4 g de SDS (2 %) (Pharmacia, Suède)

Préparation d'équilibration avec DTT : par gel

- 10 ml de tampon d'équilibration
- 100 mg de DTT (Sigma Chemical, USA)

Préparation d'équilibration avec diiodoacétamide : par gel

- 10 ml de tampon d'équilibration
- 350 mg d'iodoacétamide (Acros organics, Belgique)

Tampon d'électrophorèse SDS : pour 1 litre

- 3 g de Tris (Pharmacia, Suède)
- 14,4 g de glycine (Pharmacia, Suède)
- 1 g de SDS (Pharmacia, Suède)

Solution d'agarose :

- 25 ml de tampon d'électrophorèse SDS
- 125 mg d'agarose
- traces de bleu de bromophénol (Merck, Allemagne)

Etalon : See Blue^R Plus 2 (Tris-Glycine) (Invitrogen, USA) (Figure 40)

c) Révélation

Coloration au Bleu de Coomassie

eau distillée

Gel Code Blue Stain Reagent (Perbio Science, Belgique)

Coloration à l'argent

Solution de fixation : 150 ml/gel

- 60 ml de méthanol (Acros Organics, Belgique)
 - 15 ml d'acide acétique (Merck, Allemagne)
 - 75 ml d'eau distillée
- solution d'incubation « sensitizing » : 150 ml/gel
- 30 mg de sodium thiosulfate (Sigma, USA)
 - 150 ml d'eau distillée
- eau distillée
- solution argentique : 150 ml/gel
- 0,15 g de nitrate d'argent (Merck, Allemagne)
 - 150 ml d'eau distillée
- solution de lavage : 150 ml/gel
- 75 ml d'eau distillée
 - 75 ml de méthanol
- solution de développement : 300 ml/gel
- 6 g de NaCO₃ (Merck, Allemagne)
 - 300 ml d'eau distillée
 - 120 µl de formaldéhyde (Sigma, USA)
- solution stop : 300 ml/gel
- 15 ml d'acide acétique (Merck, Allemagne)
 - 285 ml d'eau distillée
- solution de conservation : 150 ml/gel
- 1,5 ml d'acide acétique (Merck, Allemagne)
 - 148,5 ml d'eau distillée

II.3.4.1.b. Méthodes

a) Stimulation des cellules et extraction protéique

Il est préférable de stimuler les cellules à confluence (environ $3 \cdot 10^6$ cellules par T75) afin d'obtenir de meilleurs effets. Une fois la stimulation terminée, l'extraction des protéines a lieu. Tout d'abord, les cellules vont être rincées deux fois avec du PBS à température ambiante. Ensuite, elles seront raclées dans 500 µl de PBS et récoltées dans un eppendorf. Après une centrifugation de 10 minutes à 1.000 RPM, le culot est resuspendu dans 150 µl de tampon de lyse pour une incubation de 20 minutes à température ambiante. Afin d'éliminer les débris membranaires, les extraits sont centrifugés 10 minutes à 13.000 RPM. Les extraits peuvent alors être dosés à l'aide d'un dosage protéique de type Bradford (voir point II.2.1.1.b), puis stockés à -70°C .

b) Première dimension

Pour effectuer une coloration au Bleu de Coomassie sur des mini-gels (11 cm), nous déposons 100 µg de protéines pour un volume total de 200 µl de tampon de réhydratation, alors que pour les grands gels précoulés (18 cm), nous déposons environ 200 µg de protéines pour 350 µl total. Pour une coloration à l'argent, 30 µg de protéines pour un volume final de 200 µl de tampon de réhydratation suffisent pour les mini-gels, alors que 70 µg de protéines pour un volume final de 350 µl seront déposés pour les grands gels. Ce volume est alors déposé entre les deux électrodes du sarcophage où le gel est ensuite posé (face gel contre la

solution). Une première incubation de 10 minutes permet au gel de commencer sa réhydratation. 1 ml d'huile de paraffine est alors placé sur le montage avant de le couvrir.

La migration peut alors commencer. Afin d'assurer une meilleure pénétration des protéines dans le gel, nous effectuons une étape de réhydratation active (13 heures à 40 volts) avant de lancer la véritable migration durant laquelle le voltage augmente progressivement : une heure à 200 volts, une heure à 500 volts, une heure à 1000 volts et enfin 2 heures à 8000 volts.

c) Deuxième dimension

Après les 18 heures de migration assurant la séparation des protéines selon leur point isoélectrique, les gels sont rincés à l'eau distillée afin d'éliminer les traces d'huile. Vient ensuite l'étape de rééquilibration durant laquelle les protéines vont être dénaturées par une solution contenant notamment du SDS. Cette étape se déroule en deux parties : tout d'abord, le gel est placé 15 minutes dans une première solution de rééquilibration contenant du DTT et ensuite, il est incubé à nouveau 15 minutes avec une solution contenant, cette fois, du diiodoacétamide.

Les gels de première dimension peuvent dès lors être transférés contre le gel de deuxième dimension contenu entre les deux plaques de verre. 10 µl d'étalon seront aussi déposés sur ce gel et le tout est scellé dans quelques ml de solution d'agarose.

Les plaques sont alors placées dans la cuve d'électrophorèse et les compartiments inférieurs et supérieurs sont remplis de tampon d'électrophorèse. Les gels vont alors subir une migration durant 55 minutes (200 V) à température ambiante.

d) Coloration au Bleu de Coomassie

Suite à la migration, le gel est délicatement démoulé afin de subir une étape de coloration.

Il s'agit d'une succession de bains dans différentes solutions :

- Les deux premiers bains de lavage se réalisent pendant une incubation de 15 minutes dans de l'eau distillée.
- Ensuite, le gel est déposé pour une heure minimum dans la solution de coloration ;
- Et pour finir, le gel est alors rincé deux fois une minute dans de l'eau distillée et est conservé dans cette même solution avant d'être scanné.

e) Coloration à l'argent

Il s'agit également d'une succession de bains de différentes solutions :

- Le premier bain comprend une incubation de 20 minutes dans une solution de fixation permettant la précipitation des protéines dans le gel en milieu acide. Cette étape permet à la fois d'empêcher les protéines de diffuser à travers le gel, mais aussi d'éliminer un maximum d'éléments pouvant perturber la coloration à l'argent (ions, détergents, tampons, ...)
- Ensuite, un premier lavage de 10 minutes se fera dans une solution contenant 50% de méthanol ;

- Un second lavage de minimum deux heures, à l'eau distillée, permettra d'éliminer toute trace de méthanol ;
- Ensuite, le gel est déposé pendant 1 minute dans une solution appelée « sensitizing » ; celle-ci va permettre de maintenir le milieu oxydant tout en modifiant les protéines afin de favoriser la fixation de l'argent sur celles-ci. Cette modification est notamment assurée par la glutaraldéhyde dont le rôle est de couvrir les protéines de groupements aldéhydes sur lesquels va venir réagir l'argent ;
- Après avoir rincé deux fois 1 minute dans de l'eau distillée, le gel est incubé 20 minutes avec la solution de nitrate d'argent ;
- Le gel est alors rincé deux fois 1 minute dans de l'eau avant d'être développé quelques minutes dans une solution contenant du formaldéhyde et du carbonate de sodium. Ces substances rendent le milieu alcalin et permettent donc le passage de l'argent de la forme ionique à la forme métallique, colorée (Figure 41) ;
- La coloration est stoppée grâce à une incubation d'environ 10 minutes dans un bain contenant de l'acide acétique ;
- Et pour terminer, le gel est placé dans une solution de conservation avant d'être scanné.

III. Résultats et discussion

III.1. Notes liminaires

Pour rappel, l'objectif premier de ce mémoire était l'étude du dysfonctionnement endothélial sur des cellules HUV-EC-C en culture, stimulées par l'homocystéine. L'absence de résultats prépondérants, malgré les efforts fournis, nous a par la suite amené à abandonner l'étude des effets de l'homocystéine sur les cellules endothéliales au profit d'une autre molécule pro-athérogène : l'isoprostane 8.

Par cette démarche *in vitro*, nous espérons, dans un premier temps, élucider les différents modes et voies d'action de l'isoprostane 8 au sein du processus d'athérogenèse, et dans un second temps, étudier l'expression différentielle des cellules endothéliales par une approche protéomique.

Mais avant d'entamer l'étude *in vitro* des événements induits par des molécules pro-athérogènes, il convient de choisir un modèle cellulaire adéquat.

III.2. Choix du modèle cellulaire

Un modèle cellulaire *in vitro* n'est jamais parfait, mais toutefois nécessaire afin d'analyser les différents mécanismes moléculaires aussi complexes que ceux menant à l'athérosclérose.

Argumenter en faveur d'un modèle de cellules endothéliales peut se justifier aisément. En effet, la cellule endothéliale constitue l'acteur central du processus d'athérogenèse, elle est directement en contact avec tous les éléments sanguins, elle joue un rôle dans la régulation des réponses pro-inflammatoires, dans le maintien d'un état anti-thrombotique, ...

Les cellules endothéliales peuvent provenir de différents organismes. Le choix de l'origine animale est beaucoup plus délicat et présente différentes contraintes sur le plan pratique : la disponibilité des cellules, leur coût, leur mise en culture, l'existence d'anticorps commerciaux, de banques de gènes appropriés, ... Toutefois, il est impératif que ce modèle soit relevant physiologiquement.

Le premier choix qui prévaut est le modèle cellulaire humain pour sa relevance biologique et la disponibilité des séquences génomiques, d'anticorps,... Plusieurs types de cellules endothéliales humaines existent.

Premièrement, le plus utilisé dans la littérature est celui des cellules endothéliales humaines **HUV-EC**, c'est à dire des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale. Ces primocultures présentent cependant des inconvénients majeurs : leur mise en culture est délicate et prend énormément de temps. Ensuite, il s'agit de cellules endothéliales dérivées de veines. Or, les lésions athérosclérotiques affectent plus particulièrement les artères, bien qu'elles aient fait l'objet de nombreux travaux dans le contexte de l'athérosclérose.

Deuxièmement, nous avons les **HCAEC** (human coronary arterial endothelial cells), disponibles commercialement. Leur grand avantage est sans conteste leur origine artérielle.

Par contre, leur culture très coûteuse, nécessite un milieu très riche qui les active de manière constitutive. Elles se sont donc révélées décevantes.

Troisièmement, il existe également des cellules endothéliales humaines immortalisées telles que les cellules **EA.hy 926**. Cette lignée résulte de la fusion entre des HUV-EC et des cellules humaines immortelles de carcinome (A549). Cette lignée de cellules hybrides présente de nombreuses caractéristiques des cellules endothéliales vasculaires, à savoir la présence des corps de Weibel-Palade, du facteur de von Willebrand, d'activités fibrinolytiques,... (Edgell *et al.*, 1983; Emeis *et al.*, 1988). Plusieurs études sur l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales EA.hy 926 ont déjà été réalisées et confirmées (Brown *et al.*, 1993). Cependant, elles dérivent de cellules endothéliales veineuses et les interférences dues aux cellules de carcinomes restent possibles.

Enfin, nous pouvons encore citer comme modèle d'étude des cellules endothéliales de la micro-vascularisation : les **HMEC-1** (human microvascular endothelial cell). Celles-ci proviennent de la transfection et de l'immortalisation des cellules endothéliales humaines micro-vasculaires dermiques (HMEC) par l'antigène T du virus SV40 (simian virus 40). Il a été démontré que cette lignée cellulaire conserve toujours les caractéristiques propres aux cellules endothéliales et présente une mise en culture beaucoup plus simple que les HMEC, mais il est certain, de part leur origine, que les HMEC-1 ne sont pas les plus appropriées pour l'étude des événements d'athérosclérose (Ades *et al.*, 1992).

A côté de ces cellules humaines, il existe le modèle murin, de plus en plus utilisé et connu. En effet, malgré la résistance naturelle des souris au développement des lésions athéromateuses, un nombre croissant d'études portent sur des souris transgéniques ou des souris "knock-out" susceptibles de développer spontanément la maladie (voir par exemple Carmeliet *et al.*, 1998). Les plus connus sont les souris ApoE^{-/-}, les souris ob/ob déficientes en récepteur aux LDL ou encore les souris transgéniques surexprimant l'apo B humaine. Les deux premiers modèles sont disponibles dans le laboratoire du Professeur P. Holvoet (KUL) (Réseau PAI). La lignée de cellules endothéliales murines **bEND5** a d'ailleurs fait l'objet de l'étude du dysfonctionnement endothélial induit par l'homocystéine, au cours du mémoire d'Aurélien Tacheny. Toutefois, dans la suite de ses recherches, après de nombreuses expériences et le manque de résultats convaincants, ce modèle murin a été abandonné en faveur d'un modèle humain : les **HUV-EC-C**. En effet, non seulement il s'agit d'un modèle humain, ce qui est bien plus relevant dans l'étude de l'athérosclérose, mais ces cellules HUV-EC-C présentent une mise en culture beaucoup moins contraignante (par rapport aux HUV-EC) de par leur potentiel prolifératif prolongé et, elles sont disponibles à l'ATCC à la génération 15. Cette lignée cellulaire est caractérisée par la production du facteur VIII et par une durée de vie moyenne de 50 à 60 doublements de population. La figure 42 illustre d'ailleurs le marquage en immunocytochimie des corps de Weibel-Palade. Pour rappel, ces derniers contiennent le vWF qui, lui, transporte le facteur VIII. Ce marquage permet ainsi de caractériser notre lignée cellulaire comme étant bien une lignée de cellules endothéliales.

Ces cellules sont repiquées deux fois par semaine après avoir formé un tapis cellulaire confluent d'environ $3 \cdot 10^6$ de cellules (Figure 43).

Signalons à cet égard que les modèles humains sont ceux pour lesquels les banques de données sont les plus complètes. Ceci constitue dès lors un atout pour l'étude de l'expression protéique par les gels bidimensionnels.

III.3. Etude du dysfonctionnement des cellules endothéliales HUV-EC-C induite par l'homocystéine

L'hyperhomocystéinémie est de plus en plus reconnue comme étant un facteur de risque entraînant un développement athérosclérotique allant parfois jusqu'à des complications cardiaques. Bien que son mode d'action *in vivo* reste encore très hypothétique, nous avons tenté de voir dans quelle mesure l'homocystéine affectait les cellules endothéliales, ce qui pourrait nous aider à comprendre comment cette molécule mène au développement de l'athérosclérose.

Pour cela, lors des expériences réalisées, nous avons, dans un premier temps, suivi le protocole de préparation de l'homocystéine fourni par la firme Sigma. Le stock, dissous dans de l'HCl était à une concentration de 1 M, et conservé à -20°C . La solution de stimulation était ensuite diluée dans du milieu de culture F12K + Hepes à la concentration désirée.

Les premiers événements pouvant jouer un rôle dans l'athérogenèse, tels que l'adhérence monocyttaire, l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence et l'activation de facteurs de transcription, ont alors été étudiés par différents tests *in vitro*.

Le manque de résultats probants nous a alors amené vers une nouvelle recherche dans la littérature. Nous avons alors pris contact avec une équipe qui étudie également le dysfonctionnement endothélial induit par l'homocystéine sur la même lignée cellulaire que nous (Sung *et al.*, 2001). Ces derniers ont en effet récemment mis en évidence une augmentation de l'expression de la protéine MCP-1 suite à une stimulation par l'homocystéine sur les HUV-EC-C. Nous avons dès lors suivi le protocole de préparation appliqué par cette équipe : la poudre est conservée à -20°C , le stock est dissous dans du milieu de culture F12K + Hepes à une concentration finale de 100 mM et la solution de stimulation, diluée dans ce même milieu de culture, est préparée fraîchement avant chaque expérience.

La première étape dans cette étude du dysfonctionnement endothélial a été d'évaluer la cytotoxicité de l'homocystéine sur notre modèle cellulaire. Ensuite, ayant prouvé sa non cytotoxicité, la seconde étape a été de réaliser une série de tests nous permettant de suivre un état d'activation éventuel des cellules suite à une stimulation à l'homocystéine. Pour cela, nous avons étudié *in vitro*, les différentes étapes menant au développement de

l'athérosclérose, à savoir : l'augmentation de l'activation de certains facteurs de transcription, l'augmentation de la sécrétion de chémokines et l'augmentation de l'adhérence monocytaire aux cellules endothéliales.

III.3.1. Evaluation de la cytotoxicité de l'homocystéine

Deux formes d'homocystéine ont été testées en fonction de leur relevance physiologique *in vivo* : la DL-homocystéine thiolactone et la DL-homocystéine. Il s'agit des deux formes les plus couramment reconnues comme étant pro-athérogènes et les plus souvent rencontrées dans la littérature scientifique. De plus, elles sont toutes deux présentes et stables dans le sang.

L'évaluation de leur cytotoxicité sur les cellules HUV-EC-C nous permettra d'être certain que les effets observés par la suite au cours des expériences, ne sont pas dus à un début de mortalité des cellules.

Pour cela, nous avons tout d'abord effectué une coloration au bromure d'éthidium et à l'acridine orange permettant de mettre en évidence un pourcentage de mortalité des cellules endothéliales. En effet, suite à une observation au microscope à fluorescence, on peut différencier les cellules vivantes possédant un noyau coloré en vert des cellules mortes dont le noyau est orange (résultats non montrés).

Au cours de cette expérience, nous avons décidé de tester le temps d'incubation maximal, à savoir 6 heures, pour une concentration maximale en homocystéine de 500 μM . Nous avons également prévu des cellules « contrôles » correspondants à des cellules incubées pendant 6 heures avec du milieu F12K + Hepes 10 mM. Les pourcentages de mortalité résultant d'incubations en présence de DL-homocystéine et de DL-homocystéine thiolactone à 500 μM mettent en évidence une faible cytotoxicité de ces composés, ne dépassant pas les 7% de mortalité.

Ensuite, les effets de ces deux formes d'homocystéine ont également été évalués sur la morphologie des cellules HUV-EC-C à l'aide d'un microscope à contraste de phase. La figure 44 compare des cellules HUV-EC-C « contrôles », c'est-à-dire des cellules incubées dans du F12K + Hepes 10 mM, des cellules incubées pendant 6 heures en présence d'homocystéine à 500 μM et des cellules incubées pendant 6 heures en présence d'homocystéine thiolactone à 500 μM .

Comme nous pouvons à nouveau le constater, la morphologie des cellules ne semble pas être affectée de manière significative par l'homocystéine à une concentration de 500 μM . Notons que les zones réfringentes présentes aux bords des photos correspondent aux bords des puits.

III.3.2. Effets de l'homocystéine sur l'activation du facteur de transcription NF_ B

Comme évoquée dans l'introduction, une des étapes précoces de l'athérogenèse est l'adhérence des leucocytes circulants sur les cellules endothéliales. De nombreux gènes

encodant des molécules favorisant l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales sont sous le contrôle du facteur de transcription NF_ B (Collins, 1993).

Or, ce même facteur de transcription semble être activé par des cytokines (TNF_, IL-1), des virus, des mitogènes et d'autres agents causant une activation des cellules endothéliales, étape préliminaire du développement de l'athérosclérose.

De plus, Brand *et al* ont démontré pour la première fois, en 1996, la présence du facteur NF_ B activé au sein des lésions athérosclérotiques.

Nous avons donc voulu voir si l'homocystéine était capable d'induire l'activation sur nos cellules endothéliales humaines de ce facteur. Pour ce faire, nous avons utilisé le dosage colorimétrique en multi-puits mis au point au sein du laboratoire (Renard *et al.*, 2001).

Les deux formes d'homocystéine ont été incubées pendant 2 heures à des concentrations de 100 μ M et 500 μ M. Le mode de préparation est identique à celui présenté au point (II.1.1.3 des matériels et méthodes). Un contrôle négatif (cellules non traitées et incubées dans du milieu F12K + Hepes 10 mM) a été prévu. De plus, une stimulation des cellules avec du TNF_ (10 ng/ml) est utilisé comme contrôle positif permettant ainsi de comparer les résultats avec les stimulations à l'homocystéine. Les résultats sont présentés à la figure 45.

Afin de mieux visualiser les effets de l'homocystéine sur le graphe, le contrôle positif n'est pas présenté. En effet, celui-ci induisait une activation de plus de 700% par rapport au contrôle négatif. La solution d'homocystéine utilisée ne présentait aucune toxicité vu que nous n'avons détecté aucune diminution de la biomasse pour les extraits cellulaires traités avec la molécule d'intérêt (Figure 46).

Cette expérience donne des résultats assez peu convaincants, en ce qui concerne les expositions à l'homocystéine. En effet, bien que nous ayons réalisé plusieurs fois cette même expérience, dans les mêmes conditions, aucune d'elles n'est parvenue à démontrer une activation significative du facteur de transcription NF_ B. A 500 μ M, l'homocystéine semblerait même plutôt inhiber cette réponse.

III.3.3. Effets de l'homocystéine sur la sécrétion de MCP-1

Le recrutement des leucocytes circulants par les cellules endothéliales, requiert une variété de chémokines, plus particulièrement la protéine MCP-1. En effet, en réponse à différents stimuli athérogènes tels que les LDL oxydées, le MCP-1 est induit par les cellules endothéliales et favorisant alors la transmigration des monocytes à travers la barrière endothéliale (Sasayama *et al.*, 2000). Effectivement, une augmentation de l'activité « MCP-like » et d'ARNm de MCP-1 a été observée dans des surnageants de cellules HUVEC stimulées avec du sérum enrichi en mmLDL (Nelken *et al.*, 1991).

Enfin, Sasayama (2000) a observé chez des souris déficientes en apo E et présentant une suppression du récepteur au MCP-1 (CCR2), une inhibition de l'accumulation des macrophages, et dès lors, une atténuation des lésions athérosclérotiques. Ceci confirme bien le rôle essentiel du MCP-1 dans l'athérosclérose.

Nous avons donc voulu doser la sécrétion de MCP-1 par les cellules endothéliales HUV-EC-C stimulées à l'homocystéine. Pour ce faire, nous avons réalisé un ELISA MCP-1 selon le kit fourni par la firme R&D. Un contrôle négatif (cellules incubées pendant 6 heures dans du milieu F12K + Hepes 10 mM) et un contrôle positif (cellules incubées pendant 6 heures avec du TNF α à 10 ng/ml) ont été réalisés. Les cellules incubées avec du TNF α produisent du MCP-1 en fortes quantités (environ 5600% par rapport aux contrôles négatifs). Enfin, les cellules ont été stimulées pendant 6 heures avec les deux formes d'homocystéine à 100 et 500 μ M.

Les résultats présentés à la figure 47 sont exprimés en pg de MCP-1 par μ g de protéines totales. Les protéines ont été dosées selon la méthode Folin (voir point II.2.3.1.b). Ce dosage n'a d'ailleurs mis en avant aucune diminution de protéines pour les cellules incubées en présence d'homocystéine et donc aucune cytotoxicité.

Mais, nous n'observons aucun effet des deux formes d'homocystéine sur la sécrétion de MCP-1. Au contraire, il semble même plutôt se produire une diminution de la sécrétion de MCP-1.

III.3.4. Effets de l'homocystéine sur l'adhérence des THP-1 sur les cellules HUV-EC-C

L'attachement des monocytes aux cellules endothéliales fait intervenir un certain nombre de molécules d'adhérence telles que ICAM-1 et VCAM-1 qui, elles, sont sous le contrôle de facteur de transcription tel que NF κ B (Brand *et al.*, 1996). Bien que n'ayant pu mettre en évidence une augmentation de l'activité de ce dernier suite à une stimulation à l'homocystéine, nous avons tout de même voulu tester les effets de l'homocystéine sur l'adhérence de cellules monocytaires aux cellules endothéliales.

Afin d'étudier ce phénomène *in vitro*, nous avons utilisé une approche quantitative qui consiste en un test d'adhérence en plaque multi-puits. Celui-ci nous permettra de déterminer en fluorescence la proportion de cellules monocytaires adhérentes sur un tapis confluent de cellules endothéliales (voir point II.2.4 des matériels et méthodes).

La lignée monocyttaire humaine utilisée était celle des THP-1. De façon pratique, les cellules HUV-EC-C ont tout d'abord été stimulées avec une solution de DL-homocystéine et DL-homocystéine thiolactone à des concentrations de 100 et 500 μ M durant 6 heures. Cette période de stimulation est suffisante pour permettre aux molécules d'adhérence d'être transcrites, traduites puis exprimées en membrane des cellules endothéliales. Un contrôle négatif a été réalisé et consiste en l'incubation pendant 6 heures dans du F12K + Hepes, alors que le contrôle positif consiste en l'incubation avec du TNF α .

Les THP-1 sont alors marqués à la calcéine-AM comme décrit au point II.2.4.1.b, puis déposés pendant 1 heure sur les cellules endothéliales stimulées ou non. Après rinçage des monocytes non adhérents, la quantité de THP-1 adhérents est estimée par fluorimétrie.

Les résultats, présentés à la figure 48, montrent pour le contrôle positif, une moyenne de 140.000 THP-1 adhérents par puits par rapport aux 150.000 déposés dans les puits. Par contre, malgré un contrôle négatif toutefois assez élevé, on observe qu'une très faible adhérence des cellules THP-1 sur les cellules endothéliales stimulées à l'homocystéine, non significative vu les écarts-types.

En outre, pour l'homocystéine thiolactone (500 μ M), bien qu'une adhérence d'environ 120% est observée, nous n'avons pas considéré cela comme un résultat suffisamment significatif pour continuer à travailler avec cette molécule.

III.3.4.1. Discussion

En ce qui concerne les différents tests basés sur l'évaluation de la cytotoxicité des deux formes d'homocystéine, ceux-ci permettent de conclure que leur effet cytotoxique est très limité. Par ailleurs, différents auteurs tels que Mercie et *al* (2000) ne constatent qu'un très faible taux de cytotoxicité de l'homocystéine sur des HUVEC. Enfin, signalons que des dosages protéiques de type Bradford et Folin réalisés après incubation des HUV-EC-C avec l'homocystéine, nous ont permis de confirmer ces résultats. En effet, la biomasse des cellules stimulées à l'homocystéine était semblable à celle des cellules non stimulées (Figure 46).

En ce qui concerne l'action possible de l'homocystéine sur l'activation de facteur de transcription tels que NF κ B, rappelons que celui-ci a souvent été évoqué dans le contexte inflammatoire et les réponses aux stress. Toutefois, nos résultats ne montrent qu'une très faible activation suite à une stimulation à l'homocystéine, alors que le contrôle positif montre une très belle activation. Or, ces données ne concordent pas avec certains résultats de la littérature. En effet, Mercie et *al* (2000) et Hofmann et *al* (2001) ont montré une activation de NF κ B sur des cellules HUV-EC : dans le premier cas, elles étaient incubées 1 heure avec de l'homocystéine thiolactone à des concentrations de 1 et 5 mM, ce qui correspond à des concentrations non physiologiques et, dans le second cas, 8 heures avec de l'homocystéine à 100 μ M. Nous n'avons pas testé des temps d'incubation aussi longs, peu classiques pour activer NF κ B.

En ce qui concerne l'augmentation de l'expression de molécules chémo-attractantes comme le MCP-1, et l'augmentation de l'adhérence monocyttaire à l'endothélium, aucun de nos tests effectués (ELISA MCP-1 et test d'adhérence en multi-puits), ne semblent mettre en évidence de tels événements. En effet, pour la sécrétion de MCP-1, nos conclusions sont plutôt une inhibition de cette sécrétion plutôt qu'une augmentation. Enfin, malgré une adhérence maximale observée de 120%, les écarts-types nous forcent à abandonner toute conclusion en faveur d'une augmentation de l'adhérence monocyttaire suite à une stimulation à l'homocystéine. Or, des résultats de la littérature scientifique ne manquent pas. Nous pouvons tout d'abord rappeler les résultats de Sung et *al* (2001) qui ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion de MCP-1 sur des HUV-EC-C stimulées à l'homocystéine, et enfin, les travaux de Hofmann et *al* (2001) qui ont mis en évidence l'augmentation, *in vivo* et

in vitro, de l'expression de molécules d'adhérence de type CAM induite par un taux excessif d'homocystéine. Des contacts par courrier électronique ont été pris avec l'équipe de Sung, mais nous ne sommes pas parvenus à reproduire leurs résultats. Nous n'avons donc pas d'explication pour cette discordance, mais vu les résultats décevants avec l'homocystéine, nous avons préféré étudier une autre molécule reconnue comme étant athérogène, l'isoprostane 8.

III.4.L'isoprostane 8

Le manque de résultats concernant l'homocystéine nous ont mis face à un choix. Un effet de 120 % observé uniquement sur l'adhérence monocyttaire sur l'endothélium, suite à une stimulation à l'homocystéine thiolactone (500 μM), ne nous permet pas d'établir une base assez solide pour l'étude de l'expression protéique par l'approche protéomique. Nous avons dès lors décidé d'abandonner l'homocystéine. De nouvelles recherches en littérature, nous ont alors conduit vers une autre molécule pro-athérogène : l'isoprostane 8. En effet, de nombreux auteurs ont déjà mis en évidence son rôle dans le développement de l'athérosclérose (voir point I.3.4 de l'introduction).

La décision fut donc prise d'étudier le dysfonctionnement endothélial induit suite à une incubation de nos cellules HUV-EC-C en présence d'isoprostane 8. Les différents tests *in vitro* ont donc été semblables à ceux réalisés au début de ce travail avec l'homocystéine. Autrement dit, dans un premier temps, la cytotoxicité de l'isoprostane 8 a été évaluée sur les HUV-EC-C avant de définir, dans un second temps, les conditions d'activation des cellules par différents tests à *a priori*. Ceci nous permettra alors d'aborder, dans un dernier temps, l'étude de l'expression différentielle des protéines sur les HUV-EC-C stimulées à l'isoprostane 8 par une technique, cette fois-ci, sans *a priori*.

III.4.1. Evaluation de la cytotoxicité de l'isoprostane 8

Les isoprostanes sont des composés « PG-like » comprenant de nombreux isomères. L'isomère le plus étudié dans la littérature et, en outre, étudié au cours de ce travail est le 8-iso-PGF₂. Les expériences réalisées afin d'évaluer la cytotoxicité de l'isoprostane 8 sur les cellules HUV-EC-C, sont identiques à celles effectuées pour l'homocystéine. Ainsi, un premier marquage au bromure d'éthidium et à l'acridine orange, a été entrepris sur des cellules HUV-EC-C en culture suite à une incubation pendant 6 heures avec de l'isoprostane 8 à une concentration maximale de 50 μM . Le pourcentage de mortalité ne surpassant pas les 7% (résultats non montrés), nous avons voulu confirmer ces résultats par une observation au microscope à contraste de phase. Pour cela, les cellules HUV-EC-C ont également été incubées pendant 6 heures en présence d'isoprostane 8 à 50 μM .

Comme attendu, fort peu de cellules stimulées à l'isoprostane 8 par rapport à des cellules contrôles, présentaient un noyau réfringent et une morphologie plus arrondie (Figure 49).

Encore une fois, ces résultats ont été confirmés par un dosage Bradford mettant en avant une biomasse comparable pour des cellules traitées ou non à l'isoprostane 8 (Figure 50).

Pour chacune de ces expériences, des cellules contrôles incubées pendant 6 heures dans du milieu F12K HEPES (10 mM) + 10% de sérum + éthanol 0,5% ont été prévues. En effet, vu que le stock d'isoprostane 8 a été solubilisé dans de l'éthanol, il est essentiel d'évaluer son éventuelle cytotoxicité sur les cellules. Enfin, le sérum est également nécessaire vu que pour toutes les expériences qui ont suivi, les solutions de stimulation de l'isoprostane 8 ont été diluées dans du milieu contenant 10% de sérum, ce qui n'était pas le cas avec l'homocystéine, et ce qui est plus relevant d'un point de vue physiologique.

III.4.1.1. Discussion

Nous pouvons conclure, suite à ces différents tests que l'effet cytotoxique de l'isoprostane 8 sur l'intégrité membranaire des cellules HUV-EC-C est très faible. D'ailleurs, aucune donnée de la littérature ne met en avant une éventuelle cytotoxicité de l'isoprostane 8. La non cytotoxicité de l'isoprostane 8 prouvée, nous avons dès lors essayé de définir des conditions d'activation des cellules HUV-EC-C stimulées à l'isoprostane 8 par différents tests à *a priori*, qui vont être développés ci-après.

III.4.2. Effets de l'isoprostane 8 sur les facteurs de transcription

Le premier niveau d'activation étudié concerne les facteurs de transcription. Toute sécrétion protéique ou phénomène d'adhérence nécessite, en amont, l'activation de certains facteurs de transcription. Nous nous sommes, lors de ce mémoire, plus particulièrement intéressés aux facteurs de transcription NF_κB et AP-1.

III.4.2.1. Effets sur l'activation de NF_κB

Nous avons déjà rappelé auparavant le rôle de NF_κB dans les phénomènes inflammatoires et plus particulièrement l'athérosclérose, ainsi que les différents travaux ayant mis en évidence son activation au sein de lésions athérosclérotiques (voir point I.2.3 de l'introduction).

Ainsi, grâce à un test colorimétrique disponible au laboratoire et conçu afin de quantifier de façon simple, rapide et fiable l'activation de ce facteur, nous avons stimulé les cellules avec de l'isoprostane 8 (50 μM), pour la cinétique de temps suivante : 15, 30, 45 et 60 minutes. Un contrôle négatif, c'est à dire des cellules incubées en présence de milieu F12K HEPES (10 mM) + 10% de sérum + éthanol à 0,5% a été prévu pour chaque temps, afin de mettre en évidence un éventuel effet du milieu dans lequel est dissout l'isoprostane 8.

Nous pouvons également signaler que trois contrôles négatifs supplémentaires ont été réalisés afin d'étudier l'effet du sérum seul (F12K + HEPES 10 mM), de l'éthanol seul (F12K HEPES + éthanol 0,5%) et de l'HEPES seul (F12K + HEPES 10 mM). Comme ces trois contrôles se

comportent de la même manière (résultats non montrés), nous avons dès lors pu comparer nos résultats de stimulation au contrôle F12K Hepes + 10% sérum + éthanol 0,5%.

Un contrôle positif est réalisé et correspond à une incubation pendant 1 heure en présence de TNF α (10 ng/ml). Les résultats obtenus sont présentés à la figure 51. Cette expérience ne met en évidence aucune activation du facteur de transcription NF κ B, sauf pour le contrôle positif. Par contre, elle semble montrer qu'au cours du temps, nos cellules semblent avoir une activité constitutive de NF κ B qui augmente.

III.4.2.2. Effets sur l'activation de AP-1

Le terme AP-1 regroupe une série de facteurs de transcription dimériques composés de membres de la famille Fos et Jun. Ces derniers interviennent dans la régulation de nombreux gènes pouvant notamment jouer un rôle dans l'athérosclérose :

- gènes jouant un rôle dans la diapédèse des monocytes (MCP-1) (Korenaga *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998)
- gènes jouant un rôle dans l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (ICAM-1, VCAM-1) (Wang *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1998).

Nous avons donc voulu confirmer via un dosage colorimétrique son activation suite à une stimulation avec un stimulus pro-athérogène : l'isoprostane 8.

Afin de cibler la cinétique d'action de l'isoprostane 8, nous avons testé des stimulations en présence d'isoprostane 8 à 50 μ M, sur l'échelle de temps suivante : 15, 30, 60 et 90 minutes. Un contrôle négatif (cellules non traitées et incubées dans du F12K Hepes + 10% de sérum + éthanol 0,5%) a été prévu pour chaque temps, ainsi qu'un contrôle positif correspondant à des cellules incubées en présence de PMA (0,1 μ g/ml) + ionomycine (1 μ M). Afin, de mieux visualiser l'activation par l'isoprostane 8, le contrôle positif induisant un effet activateur de 7800% a été supprimé du graphe. A nouveau, trois contrôles négatifs supplémentaires ont accompagné nos stimulations, avec un signal très faible et comparable (résultats non montrés).

Les résultats obtenus sont montrés à la figure 52. Comme on peut l'observer, un effet maximum est observé après 45 minutes suite à une stimulation à l'isoprostane 8 (50 μ M). Pour mieux mettre en évidence ces résultats, ces derniers ont été exprimés en pourcentage par rapport au contrôle négatif. Les résultats sont montrés à la figure 53. On remarque donc clairement que l'activation du facteur de transcription AP-1 augmente jusqu'à plus de 500% par rapport au contrôle négatif pour la durée d'incubation de 45 minutes avec l'isoprostane 8 (50 μ M). Afin de confirmer ces résultats, l'expérience fut recommencée dans le but de reproduire cette activation, ce qui a bien été le cas (résultats non montrés).

III.4.2.2.a. Discussion

La première étape dans cette étude du dysfonctionnement endothélial, suite à une stimulation à l'isoprostane 8, a été de tester l'activation de deux facteurs de transcription

(NF_Β, AP-1) connus pour avoir un rôle prééminent dans tous les phénomènes de stress tels que ceux impliqués dans l'athérogenèse.

En ce qui concerne le facteur NF_Β, nous n'avons mis en évidence aucune augmentation de son activité au sein des cellules endothéliales HUV-EC-C stimulées à l'isoprostane 8. Ces résultats peuvent facilement être comparés à ceux observés dans la littérature scientifique. En effet, l'équipe de Leitinger et *al* (2001) a montré que la dégradation de IκB menant à la translocation de NF_Β dans le noyau n'était pas induite suite à une stimulation des cellules par l'isoprostane 8, et donc que les effets que l'isoprostane 8 induit sur les cellules endothéliales étaient bien indépendants de NF_Β. Nous confirmons donc les résultats de Leitinger et *al* (2001) sur les cellules HUV-EC-C, ce qui d'une certaine manière valide le choix de notre modèle cellulaire.

Ceci suppose dès lors l'activation d'autres facteurs de transcription. Nous avons alors réalisé le dosage colorimétrique sur le facteur de transcription AP-1. Grâce à la réalisation d'une cinétique de stimulation, nous avons pu cibler une activation maximale de ce facteur de transcription aux environs de 45 minutes. Ceci apporte dès lors une information supplémentaire aux résultats obtenus par l'équipe de Leitinger et *al* (2001), concernant l'effet de l'isoprostane 8 sur l'activation de facteurs de transcription.

Une activation du facteur AP-1 mise en évidence, la seconde étape a donc été de mettre en évidence un effet sur l'expression protéique. Nous avons dès lors choisi une protéine fort citée dans la littérature pour avoir un rôle dans les étapes précoces de l'athérosclérose : le MCP-1. De plus, de nombreux travaux ont démontré une augmentation de son expression suite à une sur-expression du facteur de transcription AP-1 chez des HUVEC (Wang *et al.*, 1999).

III.4.3. Effets de l'isoprostane 8 sur la sécrétion de MCP-1

Afin de doser la quantité de MCP-1 sécrété, suite à une stimulation à l'isoprostane 8 sur les HUV-EC-C en culture, nous avons réalisé un ELISA MCP-1 (kit fournit par la firme R&D) (voir point II.2.3 des matériels et méthodes).

De façon pratique, la première étape est la réalisation d'une courbe standard qui nous permettra de quantifier le MCP-1 exprimé par les cellules stimulées. Cette quantification sera exprimée par rapport à la quantité de protéines totales suite à un dosage protéique de type Folin. Dans une première expérience, nous avons testé une stimulation de 6 heures avec de l'isoprostane 8 à 10 et 50 μM. Un contrôle négatif (cellules non traitées et incubées dans le milieu de dilution de l'isoprostane 8) et les trois contrôles négatifs développés auparavant (non montrés) ont été testés, ainsi qu'un contrôle positif (TNF_α), non présenté dans le graphe. Les résultats de la figure 54 montre une sécrétion du MCP-1 qui est dose-dépendante avec un maximum de 155% pour la concentration de 50 μM.

Afin de confirmer et d'affiner ces résultats, une deuxième expérience a été effectuée. Dans ce cas, une cinétique a été prévue pour les temps suivants : 6, 12 et 24 heures. Les cellules ont été incubées avec une concentration de 10, 25 et 50 μM . Enfin, des contrôles négatifs et positifs, identiques à la première expérience ont été ajoutés. Les résultats, présentés à la figure 55, montrent tout d'abord une augmentation de l'expression constitutive du MCP-1 pour les contrôles négatifs au cours du temps. Par contre, c'est après 6 heures d'incubation des cellules en présence d'isoprostane 8 à 25 μM , que l'on observe une belle augmentation de la sécrétion de MCP-1. A 12 et 24 heures, cet effet est atténué de par l'augmentation significative des contrôles négatifs. Donc, le seul point discordant dans cette expérience par rapport à la première est que la sécrétion maximale de MCP-1 est obtenue pour de l'isoprostane 8 à 25 μM et non à 50 μM .

III.4.3.1. Discussion

Ces expériences mettent donc bien en évidence une augmentation de l'expression de MCP-1 suite à une stimulation pendant 6 heures des cellules HUV-EC-C en présence d'isoprostane 8 à 25 et 50 μM . Or, il est inutile de rappeler le rôle essentiel du MCP-1 dans les événements précoces de l'athérosclérose ; en effet, ce dernier induit l'attraction des monocytes aux cellules endothéliales. Ce phénomène est bien souvent accompagné de l'augmentation de l'adhérence de ces monocytes à l'endothélium. Le dernier test à *a priori* a donc été de mettre en évidence cette adhérence des monocytes aux cellules endothéliales HUV-EC-C, stimulées ou non avec l'isoprostane 8.

III.4.4. Effets de l'isoprostane 8 sur l'adhérence des THP-1 sur les cellules HUV-EC-C

Pour rappel, ce phénomène fait intervenir un grand nombre de molécules d'adhérence qui sont sous le contrôle de facteurs de transcription tels que AP-1 et NF κ B. Or, de nombreuses expériences ont déjà démontré une augmentation de l'expression de telles molécules (ICAM-1, VCAM-1) au sein de lésions (pour exemple, voir Wang *et al.*, 1999). Nous avons dès lors voulu reproduire cet effet avant de nous engager dans l'approche protéomique.

Nous avons dès lors réalisé un test d'adhérence des cellules monocytaires humaines THP-1 sur les cellules HUVEC-C. Cette expérience nous permettra, par une mesure en fluorimétrie, d'évaluer le nombre de THP-1 adhérents. Ces derniers, préalablement marqués à la calcéine, sont déposés pour 1 heure sur les cellules HUV-EC-C stimulées pendant 6 heures à l'isoprostane 8 (voir point II.2.4 des matériels et méthodes).

Les concentrations testées ont été les suivantes : 5, 10, 20 et 50 μM . Un contrôle négatif accompagné des trois autres contrôles négatifs (non montrés), identiques aux expériences précédentes, ont également été testés. Un contrôle positif a aussi été prévu : le TNF α (10 ng/ml). Les résultats sont présentés à la figure 56. Etant donné que l'adhérence des cellules THP-1 sur les cellules endothéliales non traitées est loin d'être négligeable et afin de mieux

visualiser l'augmentation de l'adhérence des THP-1 en fonction de la concentration en isoprostane 8, nous avons rapporté la valeur du $TNF\alpha$ au contrôle négatif. Ce rapport correspond arbitrairement à la valeur 1. Ensuite, toutes nos conditions de stimulation ont été comparées à ce rapport.

Ainsi, ressort plus nettement l'effet de l'isoprostane 8 sur l'adhérence monocytaire aux cellules endothéliales.

III.4.4.1. Discussion

Cette dernière expérience nous permet de conclure que l'isoprostane 8 induit bien une augmentation de l'adhérence monocytaire des THP-1 sur l'endothélium. Cet effet est à nouveau plus important pour une concentration à 50 μ M d'isoprostane 8.

Ces résultats concordent avec les travaux de Leitinger et al (2001). En effet, ces derniers ont mis en évidence une interaction spécifique des monocytes et des cellules endothéliales suite à une stimulation à l'isoprostane 8, bien que la méthode utilisée par ces auteurs soit différente. Encore une fois, nous confirmons les effets de l'isoprostane 8 sur les cellules HUV-EC-C.

Nous pouvons donc conclure qu'à travers toutes les expériences réalisées, nous avons démontré le rôle pro-athérogène de l'isoprostane 8. Cette dernière s'est révélé induire une augmentation de l'activité du facteur de transcription AP-1, lequel induit une modification de l'expression génique. De ce fait, il s'ensuit une augmentation de l'expression d'une chémokine (MCP-1) et de l'adhérence monocytaire. Ceci pourrait donc favoriser *in vivo* la liaison des monocytes à l'endothélium, leur migration et diapédèse vers l'intima. Tous ces effets favorisent donc le développement des lésions athérosclérotiques.

Ainsi, ayant choisi le temps de stimulation (6 heures) et la concentration en isoprostane 8 (50 μ M) induisant un dysfonctionnement des cellules endothéliales, nous pouvons entamer la deuxième grande étape de ce mémoire. Il s'agit de l'étude de l'expression différentielle des protéines par l'approche des gels bidimensionnels.

III.4.5. Effets de l'isoprostane 8 sur l'expression des cellules endothéliales

Comme l'isoprostane 8 induit un dysfonctionnement endothélial, celui-ci risque d'affecter l'expression au niveau protéinique des cellules. Cette expression sera analysée via les gels 2D. Cette approche protéomique va permettre, sans *a priori* au départ, de mettre en évidence une augmentation ou une diminution éventuelles de l'expression de certaines protéines, voire même l'apparition de protéines, connues ou non.

Comme nous l'avons déjà développé au point II.3.4 des matériels et méthodes, cette technique permet de séparer les protéines suivant leur point isoélectrique et suivant leur poids moléculaire. Il en résulte un profil d'expression protéique spécifique du type cellulaire utilisé et des conditions de stimulation de ces cellules. Au cours de ce travail, nous désirons par cette

technique, mettre en évidence des différences d'expressions protéique entre des cellules incubées avec ou sans isoprostane 8.

Cette technique n'ayant pas encore été utilisée sur notre modèle cellulaire, nous nous sommes tout d'abord attelés à une étape préliminaire de mise au point. Pour cela, une première série de gels a été effectuée sur une gamme de pH très large (3-10) et sur un gel SDS-page (deuxième dimension) de 4 à 20% Tris HCl. Les extraits protéiques utilisés correspondaient à des cellules non traitées (résultats non montrés).

Les résultats ainsi obtenus nous ont permis de choisir une zone de pH plus ciblée et couvrant la majorité des protéines : il s'agit d'une gamme linéaire de pH allant de 4 à 7. La gamme de poids moléculaires va, quant à elle, de 4 à 148 kD (SDS-page de 10 à 20%).

Une fois ces conditions mises au point, nous avons alors entamé la deuxième série de gels correspondant à 6 grands gels (18 cm) précoulés de 12,5%. Nous avons pu réaliser ces gels grâce à un équipement qui nous a été prêté pendant quelques semaines par la firme Pharmacia. Ces grands gels ont été réalisés sur des extraits protéiques totaux obtenus à partir de cellules HUV-EC-C incubées durant 6 heures soit dans une solution d'isoprostane 8 à 50 μM (3 gels), soit dans du milieu F12K Hepes + 10% de sérum + éthanol 0,5% (3 gels). En effet, il est inutile, à ce stade, d'étudier l'effet du sérum seul ou de l'éthanol seul puisque les tests à *a priori*, réalisés auparavant, ont bien démontré l'absence de réaction pour ces contrôles négatifs.

Notre but était de mettre en évidence des différences entre les gels « contrôles » et les gels « isoprostane 8 ». Pour cela, nous avons opté pour une coloration à l'argent. Son principal avantage est de présenter une grande sensibilité, mais cette coloration ne nous permettra pas d'aller plus loin dans l'identification des protéines. En effet, la coloration à l'argent, contrairement au bleu ne permet pas une approche quantitative car l'intensité de la coloration ne correspond pas nécessairement à la quantité de protéines présentes au niveau de la tache. Par contre, la coloration au bleu de Coomassie, plus quantitative, est plus appropriée pour l'analyse en spectrométrie de masse car l'intensité du spot est proportionnelle à la quantité de protéine. On sait également qu'un spot visible en bleu de Coomassie, correspond à une quantité suffisante de matériel pour passer en spectrométrie de masse. Le choix d'effectuer des triplicats a pour but d'obtenir un gel moyen que nous utiliserons pour la comparaison des profils protéiques, obtenus avec l'isoprostane 8 et le contrôle. Malheureusement, lors de l'étape de coloration, certains gels ont présenté des zones fortement assombries (probablement dus à un mauvais lavage de la vaisselle). Dès lors, nous avons décidé de ne travailler que sur les deux gels présentés à la figure 57 et représentant un gel contrôle et un gel isoprostane 8. Nous n'avons donc ici pas pu réaliser un gel moyen par condition.

Lors de l'analyse bio-informatique, nous avons choisi le gel contrôle comme référence pour établir les comparaisons. Nous avons commencé par digitaliser nos gels à l'aide du scanner et poursuivi les différentes étapes de détection des spots (voir point II.3.4). Les spots obtenus sur

le gel isoprostane 8 ont alors été comparés à ceux obtenus sur le gel de référence. Les renseignements qui en découlent sont les suivants :

- Le gel de référence présente un total de 864 pots
- Le gel isoprostane 8 en contient 951, dont 602 se superposent au gel de référence.

Nous avons alors analysé chacun des spots qui apparaissait en plus dans le gel de stimulation. Malheureusement, aucun de ceux-ci ne s'est avéré intéressant. En effet, il s'agissait soit de « faux » spots (présence de trainées dans le gel), soit d'erreurs de « matching » de la part de l'ordinateur. Nous avons dès lors décidé de rechercher les taches présentant une augmentation ou une diminution d'intensité par rapport au contrôle.

La figure 58 reprend les spots augmentant d'au moins deux fois d'intensité (taches vertes) et diminuant de deux fois d'intensité (taches jaunes) par rapport au gel de référence. Nous avons ensuite voulu vérifier si certains spots voyaient leur intensité augmentée de plus de trois fois. La figure 59 montre les 13 spots présentant une intensité supérieure à 3 fois par rapport au contrôle. Enfin, en poursuivant cette analyse à fonds, on a observé la présence d'un seul spot dont l'intensité augmentait de plus de 9 fois. La figure 60 représente la zone agrandie contenant ce spot (spot n° 1) et présentée par rapport au gel de référence.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons répété l'expérience avec les mêmes extraits protéiques totaux. Nous avons utilisé, dans ce cas-ci, 4 mini-gels (11 cm) précoulés de 12,5%. En effet, les mini-gels permettent de réaliser une expérience complète, en beaucoup moins de temps et avec une résolution toujours très bonne. Deux d'entre eux étaient destinés à une coloration à l'argent et les deux autres à une coloration au bleu de Coomassie. Pour chaque type de coloration, un gel contrôle (F12K HEPES + 10% de sérum + éthanol 0,5%) et un gel représentant des extraits stimulés à l'isoprostane 8 (50 μ M) pendant 6 heures ont été effectués.

La coloration au bleu a été réalisée afin d'éventuellement détecter un spot susceptible de nous intéresser et qui pourrait, dès lors, faire l'objet d'une étude en spectrométrie de masse.

La figure 61 représente le gel contrôle et le gel isoprostane 8 colorés à l'argent, et la figure 62 reprend ceux colorés au bleu de Coomassie.

L'analyse bio-informatique, réalisée sur les deux gels à l'argent, en prenant le gel contrôle comme référence, a révélé les informations suivantes :

- Le gel de référence présente au total 1006 spots
- Le gel isoprostane 8 en contient 1064, dont 718 se superposent au gel contrôle.

A nouveau, nous avons recherché les taches présentant une augmentation ou une diminution d'intensité par rapport au contrôle. Cette analyse révèle la disparition d'un spot au niveau du gel isoprostane 8, bien présent dans le gel contrôle (spot n° 2), comme illustré à la figure 63.

La figure 64 permet de visualiser à la fois les spots dont l'intensité augmente d'au moins deux fois par rapport au contrôle (taches vertes) et les spots dont l'intensité diminue d'au moins deux fois (taches jaunes).

Afin de pousser l'analyse au plus loin, nous avons ensuite recherché les taches qui augmentaient au maximum par rapport au contrôle. La figure 65 reprend les 11 spots qui augmentent de plus de trois fois. Notons que cette augmentation ne dépasse pas les 300%. En effet, nous avons tenté de détecter une augmentation de quatre fois par rapport au contrôle, mais dans ce cas, plus aucun spots n'était repris dans la sélection de l'ordinateur. Nous n'avons donc pas retrouvé le spot qui augmentait de plus de 9 fois (Figure 60). Mais, la confrontation des figures 57 et 61, confirme qu'il est difficile de comparer des patterns de migration obtenus dans des conditions différentes d'électrophorèse (dans ce cas, les grands gels pour la figure 57 et les mini-gels pour la figure 61).

Nous avons ensuite réalisé les mêmes analyses et les mêmes recherches concernant les deux gels colorés au bleu de Coomassie. Les résultats sont les suivants :

- Le gel de référence (gel contrôle) contient 376 spots
- Le gel de stimulation à l'isoprostane 8 en contient 321, dont 276 se retrouvent dans le gel de référence.

Nous avons alors poursuivi l'analyse comme précédemment où 17 spots augmentant de plus de deux fois par rapport au contrôle, et 19 diminuant de moitié ont été sélectionnés. La figure 66 reprend l'ensemble de ces spots. Enfin, la figure 67 montre les 7 spots qui augmentent de trois fois, maximum, par rapport à la référence. Outre les augmentations/diminutions d'intensité de spots, nous avons aussi pu observer un certain nombre de déplacements (« shift ») de protéines en comparant les gels. Ces glissements selon le poids moléculaire ou le point isoélectrique, suggèrent une modification post-traductionnelle des protéines suite aux incubations avec la molécule activatrice. La figure 68 montre en effet, un shift selon le point isoélectrique. On a présenté également une zone nous semblant intéressante et illustrée à la figure 69. Celle-ci révèle la présence de deux spots supplémentaires (spots n°3 et 4), alignés horizontalement le long de l'axe des points isoélectriques, correspondant probablement à des phosphorylations de la même protéine.

Poussant plus loin l'analyse, nous avons entrepris une recherche dans une base de données (HSC-2DPAGE) mis à disposition sur le net par HEART SCIENCE CENTRE (www.harefield.nthames.nhs.uk/nhli/protein/index.html). On y trouve entre autres des gels 2D réalisés à partir d'extraits protéiques de la lignée cellulaire EA.hy926. Il s'agit de cellules endothéliales (HUVEC) immortalisées par fusion avec des cellules humaines de carcinome (A549) (voir point III.2 des résultats et discussions).

En comparant les deux patterns, on peut retrouver des zones fort semblables (Figure 70) et on peut émettre l'hypothèse que la série de spots présentant un shift vers le côté acide (zone sélectionnée sur le graphe B) correspondrait à la protéine GRP78/BiP identifiée dans la base de données HCS. Il faut néanmoins insister sur les limitations quant au niveau de confiance à accorder à de telle comparaison de patterns obtenus avec des conditions d'électrophorèse bidimensionnelle différentes et à partir de lignées cellulaires différentes. Seule une identification par spectrométrie de masse pourra confirmer que ces spots correspondent bien à la GRP78.

Par ailleurs, et comme illustré dans le tableau 8, nous avons cependant observé une bonne corrélation entre les poids moléculaires et les points isoélectriques théoriques et observés dans les deux systèmes d'électrophorèse bidimensionnels. Tout en gardant la prudence d'usage quant à l'identification de cette protéine, nous voudrions néanmoins signaler quelques informations intéressantes dans le cadre de ce travail.

GRP78/BiP est une protéine résidente du réticulum endoplasmique qui fait partie de la famille des protéines hsp70 (Haas, 1994) et qui jouerait un rôle dans la réponse au stress dans le réticulum endoplasmique (Ma *et al.*, 2002). Elle jouerait un rôle dans le contrôle de qualité des récepteurs aux LDL néo-synthétisées (Jorgensen *et al.*, 2000). Enfin, Satoh *et al.* (1993) ont montré que sa fonction pourrait être modulée par phosphorylation.

En résumé, nous sommes bien conscients que le travail effectué dans le cadre de ce mémoire est un travail préliminaire qui a permis de dégrossir le problème. Les mini-gels ont montré une résolution excellente, mais il faut avouer que la migration dans les grands gels n'était pas idéale, avec une surcharge de protéines dans la partie supérieure gauche du gel, probablement par manque d'expérience. La résolution n'est donc pas celle à laquelle on aurait pu s'attendre.

A ce stade des résultats et de l'analyse, nous pouvons d'ores et déjà évoquer les expériences à réaliser pour la suite de cette étude ; en effet, l'idéal serait de refaire au minimum une série de 6 grands gels (3 par condition) afin de pouvoir générer des gels moyens, et cela dans des expériences indépendantes. En effet, il est essentiel de reproduire les expériences sur différents extraits protéiques. Le choix de la coloration se portera sur le bleu de Coomassie afin de pouvoir aller plus loin dans l'analyse, c'est à dire jusqu'à l'identification d'une protéine d'intérêt sélectionnée sur un gel, par spectrométrie de masse.

En outre, les mini-gels colorés avec le bleu de Coomassie (figure 62), même s'ils ne révèlent qu'entre 321 et 376 spots, nous ont quand même permis de repérer des différences dans l'expression et peut-être dans les modifications post-traductionnelles (Figure 66 à 69).

En conclusion, il faudra refaire plusieurs expériences indépendantes car ce n'est qu'à cette condition que l'on pourra confirmer quels sont effectivement les spots protéiques affectés par l'isoprostane 8, qu'il s'agisse de disparition, d'augmentation en intensité ou de modification post-traductionnelle. Quand ces spots seront repérés avec certitude, nous pourrions tenter de les identifier par spectrométrie de masse.

Nous pouvons donc conclure que l'approche protéomique, sans cesse en évolution, s'avère très prometteuse pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par une molécule pro-athérogène, telle que l'isoprostane 8.

IV. Conclusions et perspectives

Depuis plusieurs années, l'isoprostane 8, composé « PG-like » dérivé de la peroxydation de l'acide arachidonique par des radicaux libres, fait l'objet de plusieurs études. En effet, cette molécule, d'abord considérée comme un marqueur de stress oxydatifs et de peroxydation lipidique *in vivo*, est effectivement plus abondante dans les parois vasculaires atteintes, dans le plasma et les urines de patients hypercholestérolémiques. De plus, ce composé possède également des effets biologiques qui en font une molécule pro-athérogène. Elle semble avoir une réaction vasoconstrictrice et semble favoriser l'adhérence monocyttaire sur des cellules endothéliales.

Dans ce contexte, l'objectif de ce mémoire était d'étudier les effets de cette molécule sur un modèle de cellules endothéliales humaines, les cellules HUV-EC-C afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement endothélial pouvant mener au développement de la pathologie qu'est l'athérosclérose.

Pour cela, nous avons réalisé une série d'expériences en utilisant à la fois des techniques dites à *a priori* et sans *a priori*. Ces expériences avaient pour but de confirmer le rôle pro-athérogène de l'isoprostane 8 sur les cellules HUV-EC-C, pour pouvoir s'engager dans un deuxième temps dans l'étude de l'expression protéique des HUV-EC-C stimulées par cette molécule, car son mode d'action sur les cellules endothéliales et ses effets sur celles-ci à l'échelle moléculaire, ont été peu étudiés et restent peu compris jusqu'à présent.

La première partie de notre étude avait pour but de mettre en évidence, suite aux incubations en présence d'isoprostane 8, l'induction de phénomènes ponctuels qui, *in vivo*, sont liés aux premières étapes de l'athérogenèse. Nous avons donc voulu tester l'activation de facteurs de transcription (NF- κ B et AP-1), l'augmentation de la sécrétion d'une chémokine bien connue pour avoir un rôle dans l'athérosclérose (MCP-1) et l'adhérence de cellules monocytaires sur les cellules endothéliales. La figure 71 récapitule les principaux résultats obtenus.

Tout d'abord, nous avons mis en évidence l'activation du facteur de transcription AP-1, mais pas de NF- κ B. Nous avons alors étudié l'impact de cette activation sur la sécrétion de MCP-1, qui, elle, s'est également révélée être augmentée. Enfin, pour terminer et compléter l'étude de tous ces événements qui *in vivo*, mènent au développement de l'athérosclérose, nous avons testé l'isoprostane 8 sur l'adhérence monocyttaire, et celle-ci était bien augmentée.

Les résultats probants obtenus suite à ces approches très ciblées, nous ont alors permis d'entamer la deuxième partie de notre étude plus vaste qui va nous permettre d'obtenir une vue plus globale du problème. Celle-ci consiste en l'étude des changements d'expression protéique au sein des cellules stimulées ou non à l'isoprostane 8 et ce, à l'aide de l'approche protéomique via les gels d'électrophorèse bidimensionnels. Les gels bidimensionnels sont devenus au cours des dernières années, une technique de choix pour l'étude du protéome. Ce dernier, pour rappel, représente la quasi-totalité des protéines exprimées dans un système particulier, dans notre cas, des cellules HUV-EC-C stimulées ou non à l'isoprostane 8.

La plupart des applications concernant cette technique consistent à comparer les profils obtenus pour un état de référence des cellules (dans notre cas, le contrôle négatif, où les cellules ne sont pas stimulées) par rapport à un état d'activation (dans notre cas, des cellules stimulées à l'isoprostane 8).

Cette technique performante est complémentaire d'autres approches étudiant, elle, l'expression des ARNm. Une approche transcriptionnelle par les damiers à haute densité est d'ailleurs prévue pour la suite de ces recherches dans le cadre de la thèse d'Aurélien Tacheny. En outre, la technique des damiers à faible densité a déjà été utilisée par Sébastien Toffoli lors de son mémoire, mais sur un autre type cellulaire, également au cœur des étapes précoces de l'athérogenèse, le monocyte.

Au cours de ce mémoire, l'approche protéomique n'a pas pu être approfondie par manque de temps, mais elle nous a déjà permis de déboucher sur des perspectives intéressantes.

Au terme de ce travail, 6 grands gels, colorés à l'argent ont été générés et analysés. Ils ont été complétés par une série de mini-gels, dont la réalisation est bien plus rapide et la résolution encore excellente. Les mini-gels ont également été analysés, après coloration à l'argent et au bleu de Coomassie.

La coloration à l'argent avait l'avantage de présenter une très grande sensibilité et donc de mettre en évidence un maximum de différences d'expression des protéines. On a, pour rappel, mis en évidence, dans les grands gels, une sur-expression d'une protéine de plus de 9 fois par rapport au contrôle. Par contre, cette technique est moins recommandée pour le passage au stade suivant, c'est à dire lorsqu'on veut aller jusqu'à l'identification de protéines d'intérêt sur le gel via la spectrométrie de masse.

La coloration au bleu de Coomassie, bien que moins sensible, permettra une approche plus quantitative pouvant se poursuivre par les techniques de spectrométrie de masse. Dans les mini-gels, nous avons mis en évidence une série de différences dans les gels correspondant aux cellules traitées à l'isoprostane 8 :

- disparition d'un spot (figure 63),
- « shift » d'un spot (figure 68),
- augmentation et diminution en intensité pour un certain nombre de spots (figures 64 à 67),
- apparition d'isoformes supplémentaires (figure 69).

Toutes ces modifications doivent être reproduites et confirmées. Mais, nous avons quand même émis une hypothèse concernant l'identification d'une série de spots apparaissant en plus dans le gel de stimulation à l'isoprostane 8 et s'avérant correspondre à la GRP78/BiP. Comme déjà discuté dans les résultats, GRP78/BiP est une chaperonne résidente du réticulum endoplasmique intervenant dans les phénomènes de stress et dans le contrôle de qualité des R-LDL. Toutefois, la prudence est de rigueur et seule une analyse en spectrométrie de masse pourra confirmer cette identification.

Malheureusement, le manque de temps ne nous a pas permis d'en arriver jusque là, d'autant plus qu'il serait nécessaire de refaire des gels pour chaque condition des triplicats, dans

plusieurs expériences indépendantes, afin de pouvoir discriminer les variations aléatoires liées aux manipulations expérimentales.

L'étape suivante consistera à identifier les protéines qui seront sélectionnées lors de l'analyse des gels d'électrophorèse bidimensionnels, et ce, par spectrométrie de masse (MS). La MS permet de déterminer avec précision un paramètre intrinsèque des molécules : leur masse. Elle représente la méthode de choix pour l'identification des protéines séparées par gels 2D et la caractérisation de leurs éventuelles modifications post-traductionnelles. Il existe deux méthodes principales permettant d'identifier les protéines par MS (pour une revue, voir (Dierick *et al.*, 2002)). Premièrement, le « **peptide mapping** » permet d'identifier une protéine sur base de la liste des poids moléculaires des peptides la composant et obtenus après digestion de la protéine par une protéase spécifique, classiquement la trypsine (Mann *et al.*, 1993; Mortz *et al.*, 1994) (Figure 72). Cette liste de poids moléculaire obtenue de manière expérimentale est comparée à une liste de poids moléculaires théoriques obtenue par digestion « théorique » de toutes les séquences protéiques présentes dans les banques de données. Le « peptide mapping » est effectué à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted laser desorption/ionisation-Time-of-Flight) disponible au sein du service de Spectrométrie de masse. Cette méthode est relativement simple à mettre en œuvre, rapide, facilement automatisable et ne requiert que de très faibles quantités d'échantillon. Toutefois, cette méthode, ne permet l'identification d'une protéine que si sa séquence est répertoriée dans les banques de données. De plus, si un spot contient un ensemble de protéines, une petite protéine ou une protéine fortement modifiée post-traductionnellement, l'identification sera difficile, et on aura dès lors recours à une seconde méthode : le « **peptide sequencing** » (Figure 73).

Dans ce cas, les peptides issus de la digestion sont séquencés un à un. La séquence d'un peptide peut être déduite par l'analyse des fragments obtenus lors de la collision d'un peptide avec un gaz inerte (N₂, He). A nouveau, les résultats obtenus seront confrontés à des séquences en acides aminés dans des banques de données. Le « peptide sequencing », effectué à l'aide d'un MS de type ESI-Q-TOF (Electrospray-Quadrupole-TOF) est plus puissant que la première méthode, mais il est plus complexe à mettre en œuvre, plus lent, difficilement automatisable et requiert une plus grande quantité d'échantillon.

Les différentes caractéristiques du **MALDI-TOF** (peptide mapping) et de l'**ESI-Q-TOF** (peptide sequencing) ont conduit à un schéma général pour l'identification de protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle (Figure 74). Une petite fraction du mélange de peptides issus de la digestion d'une protéine, est tout d'abord prélevée afin de réaliser un « peptide mapping ». Si cette méthode ne permet pas de dégager un candidat dans les bases de données, un « peptide sequencing » sera réalisé avec le reste de l'échantillon. Les éléments de séquence ainsi obtenus seront utilisés pour cribler les bases de données de séquences protéiques ou nucléotidiques.

Au département de Biologie, un spectromètre de masse de type ESI-Q-TOF est déjà fonctionnel mais sera bientôt complété par un MALDI-TOF, déjà installé mais pas encore fonctionnel.

Ces différentes techniques nous permettront donc d'identifier des protéines dont l'expression diffère suite à une stimulation à l'isoprostane 8.

Ayant déjà mis en avant une expression altérée de certaines protéines suite à l'incubation avec l'isoprostane 8, on peut donc espérer que l'approche protéomique soit essentielle afin d'arriver à une meilleure compréhension quant aux mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement endothélial, induit par l'isoprostane 8, mais aussi par d'autres agents pro-athérogènes.

V. Bibliographie

- **Adachi H., M. Tsujimoto, H. Arai and K. Inoue**, *Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells*, J Biol Chem, 272, 31217-20., 1997.
- **Ades E. W., F. J. Candal, R. A. Swerlick, V. G. George, S. Summers, D. C. Bosse and T. J. Lawley**, *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*, J Invest Dermatol, 99, 683-90., 1992.
- **Alpert M. A.**, *Homocyst(e)ine, atherosclerosis, and thrombosis*, South Med J, 92, 858-65., 1999.
- **Anderson T. J., M. D. Gerhard, I. T. Meredith, F. Charbonneau, D. Delagrangue, M. A. Creager, A. P. Selwyn and P. Ganz**, *Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis*, Am J Cardiol, 75, 71B-74B., 1995.
- **Andreotti F., F. Burzotta, A. Manzoli and K. Robinson**, *Homocysteine and risk of cardiovascular disease*, J Thromb Thrombolysis, 9, 13-21., 2000.
- **Ares M. P., B. Kallin, P. Eriksson and J. Nilsson**, *Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth muscle cells*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15, 1584-90., 1995.
- **Berge K. E., H. Tian, G. A. Graf, L. Yu, N. V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes and H. H. Hobbs**, *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*, Science, 290, 1771-5., 2000.
- **Berliner J. A. and J. W. Heinecke**, *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*, Free Radic Biol Med, 20, 707-27, 1996.
- **Black P. H. and L. D. Garbutt**, *Stress, inflammation and cardiovascular disease*, J Psychosom Res, 52, 1-23., 2002.
- **Bonnet J.**, *L'athérosclérose : un défi commun du biologiste et du clinicien*, Medecine/Sciences, 17, 151-154, 2001.
- **Brand K., S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P. A. Baeuerle and D. Neumeier**, *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*, J Clin Invest, 97, 1715-22., 1996.
- **Brattstrom L. and D. E. Wilcken**, *Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect?*, Am J Clin Nutr, 72, 315-23., 2000.
- **Breslow J. L.**, *Mouse models of atherosclerosis*, Science, 272, 685-8., 1996.
- **Brown K. A., A. Vora, J. Biggerstaff, C. J. Edgell, S. Oikle, G. Mazure, N. Taub, A. Meager, T. Hill, C. Watson and et al.**, *Application of an immortalized human endothelial cell line to the leucocyte:endothelial adherence assay*, J Immunol Methods, 163, 13-22., 1993.
- **Brown M. S. and J. L. Goldstein**, *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*, Annu Rev Biochem, 52, 223-61, 1983.

- **Bucala R.**, *Lipid and lipoprotein modification by advanced glycosylation end- products: role in atherosclerosis*, Exp Physiol, 82, 327-37., 1997.
- **Carmeliet P., L. Moons and D. Collen**, *Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis*, Cardiovasc Res, 39, 8-33., 1998.
- **Carr A. C., M. R. McCall and B. Frei**, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20, 1716-23., 2000.
- **Cockerill G. W. and S. Reed**, *High-density lipoprotein: multipotent effects on cells of the vasculature*, Int Rev Cytol, 188, 257-97, 1999.
- **Collins T.**, *Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion*, Lab Invest, 68, 499-508., 1993.
- **Cotran R. S. and T. Mayadas-Norton**, *Endothelial adhesion molecules in health and disease*, Pathol Biol (Paris), 46, 164-70., 1998.
- **Cox D. A. and M. L. Cohen**, *Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis*, Pharmacol Rev, 48, 3-19., 1996.
- **Crossman D. C., D. P. Carr, E. G. Tuddenham, J. D. Pearson and J. H. McVey**, *The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester*, J Biol Chem, 265, 9782-7., 1990.
- **Davi G., P. Alessandrini, A. Mezzetti, G. Minotti, T. Bucciarelli, F. Costantini, F. Cipollone, G. B. Bon, G. Ciabattoni and C. Patrono**, *In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17, 3230-5., 1997.
- **de Winther M. P., K. W. van Dijk, L. M. Havekes and M. H. Hofker**, *Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20, 290-7., 2000.
- **Demuth K., I. Myara and N. Moatti**, *[Biology of the endothelial cell and atherogenesis]*, Ann Biol Clin, 53, 171-91, 1995.
- **Dierick J. F., M. Dieu, J. Remacle, M. Raes, P. Roepstorff and O. Toussaint**, *Proteomics in experimental gerontology*, Exp Gerontol, 37, 721-34., 2002.
- **Doshi S. N., J. Goodfellow, M. J. Lewis and I. F. McDowell**, *Homocysteine and endothelial function*, Cardiovasc Res, 42, 578-82., 1999.
- **Dudman N. P., C. Hicks, J. F. Lynch, D. E. Wilcken and J. Wang**, *Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro*, Arterioscler Thromb, 11, 663-70., 1991.

- **Duplaa C., T. Couffinhal, L. Labat, C. Moreau, M. E. Petit-Jean, M. S. Doutre, J. M. Lamaziere and J. Bonnet**, *Monocyte/macrophage recruitment and expression of endothelial adhesion proteins in human atherosclerotic lesions*, *Atherosclerosis*, 121, 253-66., 1996.
- **Edgell C. J., J. E. Haizlip, C. R. Bagnell, J. P. Packenham, P. Harrison, B. Wilbourn and V. J. Madden**, *Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926*, *In Vitro Cell Dev Biol*, 26, 1167-72., 1990.
- **Edgell C. J., C. C. McDonald and J. B. Graham**, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3734-7., 1983.
- **Emeis J. J. and C. J. Edgell**, *Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926)*, *Blood*, 71, 1669-75., 1988.
- **Esterbauer H., J. Gebicki, H. Puhl and G. Jurgens**, *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*, *Free Radic Biol Med*, 13, 341-90., 1992.
- **Fajardo L. F.**, *The complexity of endothelial cells. A review*, *Am J Clin Pathol*, 92, 241-250, 1989.
- **Frishman W. H.**, *Biologic markers as predictors of cardiovascular disease*, *Am J Med*, 104, 18S-27S., 1998.
- **Fukunaga M., T. Yura and K. F. Badr**, *Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2 alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release*, *J Cardiovasc Pharmacol*, 26, S51-2., 1995.
- **Gniwotta C., J. D. Morrow, L. J. Roberts and K. Kühn**, *Prostaglandin F2-like compounds, F2-Isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 17, 3236-3241, 1997.
- **Goldstein J. L. and M. S. Brown**, *Molecular medicine. The cholesterol quartet*, *Science*, 292, 1310-2., 2001.
- **Gopaul N. K., J. Nourooz-Zadeh, A. I. Mallet and E. E. Anggard**, *Formation of F2-isoprostanes during aortic endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein*, *FEBS Lett*, 348, 297-300., 1994.
- **Gorg A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber and W. Weiss**, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*, *Electrophoresis*, 21, 1037-53. [pii], 2000.
- **Graham I. M. and P. O'Callaghan**, *The role of folic acid in the prevention of cardiovascular disease*, *Current Opinion in Lipidology*, 11, 577-587, 2000.
- **Grundy S. M.**, *Liver, lipoproteins, and atherosclerosis. An overview*, *Bile acids and atherosclerosis*, 15, 1-12, 1986.
- **Haas I. G.**, *BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum*, *Experientia*, 50, 1012-20., 1994.
- **Hajjar K. A.**, *Homocysteine: a sulph'rous fire*, *J Clin Invest*, 107, 663-4., 2001.

- **Hall E. D.**, *Lipid peroxidation*, Adv Neurol, 71, 247-57, 1996.
- **Halliwell B.**, *Lipid peroxidation in vivo and in vitro in relation to atherosclerosis: some fundamental questions*, Agents Actions Suppl, 26, 223-31, 1988.
- **Havel R. J.**, *Regulation of lipoprotein metabolism by lipoprotein receptors*, Atherosclerosis Reviews, 17, 1-8, 1988.
- **Hazzard W. R.**, *Atherosclerosis and aging: a scenario in flux*, Am J Cardiol, 63, 20H-24H., 1989.
- **Henrich W. L.**, *The endothelium--a key regulator of vascular tone*, Am J Med Sci, 302, 319-28., 1991.
- **Hobbs H. H., J. L. Goldstein and M. S. Brown**, The metabolic and molecular bases of inherited disease, chap120, 2001.
- **Hofmann M. A., E. Lalla, Y. Lu, M. R. Gleason, B. M. Wolf, N. Tanji, L. J. Ferran, Jr., B. Kohl, V. Rao, W. Kiesel, D. M. Stern and A. M. Schmidt**, *Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model*, J Clin Invest, 107, 675-83., 2001.
- **Holvoet P. and D. Collen**, *Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis*, Faseb J, 8, 1279-84., 1994.
- **Jacobsen D. W.**, *Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease*, Clin Chem, 44, 1833-43., 1998.
- **Jakubowski H.**, *Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans*, J Nutr, 130, 377S-381S., 2000.
- **Jakubowski H. and E. Goldman**, *Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells*, FEBS Lett, 317, 237-40., 1993.
- **Jakubowski H., L. Zhang, A. Bardeguet and A. Aviv**, *Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis*, Circ Res, 87, 45-51., 2000.
- **Jorgensen M. M., O. N. Jensen, H. U. Holst, J. J. Hansen, T. J. Corydon, P. Bross, L. Bolund and N. Gregersen**, *Grp78 is involved in retention of mutant low density lipoprotein receptor protein in the endoplasmic reticulum*, J Biol Chem, 275, 33861-8., 2000.
- **Korenaga R., J. Ando, K. Kosaki, M. Isshiki, Y. Takada and A. Kamiya**, *Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells*, Am J Physiol, 273, C1506-15., 1997.
- **Kozian D. H. and B. J. Kirschbaum**, *Comparative gene-expression analysis*, Trends Biotechnol, 17, 73-8., 1999.
- **Lee**, Nature Med, 27, 79, 2001.

-
- **Lefer D. J. and D. N. Granger**, *Monocyte rolling in early atherogenesis: vital role in lesion development*, *Circ Res*, 84, 1353-5., 1999.
 - **Leitinger N., J. Huber, C. Rizza, D. Mechtcheriakova, V. Bochkov, Y. Koshelnick, J. A. Berliner and B. R. Binder**, *The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation*, *Faseb J*, 15, 1254-6., 2001.
 - **Libby P.**, *What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation*, *Am J Cardiol*, 88, 3J-6J., 2001.
 - **Lusis A. J.**, *Atherosclerosis*, *Nature*, 407, 233-41., 2000.
 - **Ma K., K. M. Vattem and R. C. Wek**, *Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress*, *J Biol Chem*, 277, 18728-35., 2002.
 - **Mallat Z., I. Philip, M. Lebreton, D. Chatel, J. Maclouf and A. Tedgui**, *Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure*, *Circulation*, 97, 1536-9., 1998.
 - **Mann M., P. Hojrup and P. Roepstorff**, *Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases*, *Biol Mass Spectrom*, 22, 338-45., 1993.
 - **Massy Z. A. and W. F. Keane**, *Pathogenesis of atherosclerosis*, *Semin Nephrol*, 16, 12-20., 1996.
 - **Mercie P., F. Belloc, C. Bihlou-Nabera, C. Barthe, A. Pruvost, M. Renard, M. Seigneur, P. Bernard, G. Marit and M. R. Boisseau**, *Comparative methodologic study of NFkappaB activation in cultured endothelial cells*, *J Lab Clin Med*, 136, 402-11., 2000.
 - **Minuz P., G. Andrioli, M. Degan, S. Gaino, R. Ortolani, R. Tommasoli, V. Zuliani, A. Lechi and C. Lechi**, *The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1248-56., 1998.
 - **Moore K. P., V. Darley-Usmar, J. Morrow and L. J. Roberts, 2nd**, *Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite*, *Circ Res*, 77, 335-41., 1995.
 - **Moriwaki H., N. Kume, T. Sawamura, T. Aoyama, H. Hoshikawa, H. Ochi, E. Nishi, T. Masaki and T. Kita**, *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1541-7., 1998.
 - **Morrow J. D., B. Frei, A. W. Longmire, J. M. Gaziano, S. M. Lynch, Y. Shyr, W. E. Strauss, J. A. Oates and L. J. Roberts, 2nd**, *Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage*, *N Engl J Med*, 332, 1198-203., 1995.
-

-
- **Morrow J. D., K. E. Hill, R. F. Burk, T. M. Nammour, K. F. Badr and L. J. Roberts, 2nd**, *A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*, Proc Natl Acad Sci U S A, 87, 9383-7., 1990.
 - **Morrow J. D., T. A. Minton and L. J. Roberts, 2nd**, *The F₂-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F₂ alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist*, Prostaglandins, 44, 155-63., 1992.
 - **Morrow J. D. and L. J. Roberts, 2nd**, *The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research*, Biochem Pharmacol, 51, 1-9., 1996.
 - **Mortz E., O. Vorm, M. Mann and P. Roepstorff**, *Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search*, Biol Mass Spectrom, 23, 249-61., 1994.
 - **Munro J. M. and R. S. Cotran**, *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation*, Lab Invest, 58, 249-61., 1988.
 - **Navab M., A. M. Fogelman, J. A. Berliner, M. C. Territo, L. L. Demer, J. S. Frank, A. D. Watson, P. A. Edwards and A. J. Lusis**, *Pathogenesis of atherosclerosis*, Am J Cardiol, 76, 18C-23C., 1995.
 - **Nelken N. A., S. R. Coughlin, D. Gordon and J. N. Wilcox**, *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*, J Clin Invest, 88, 1121-7., 1991.
 - **Nofer J. R., B. Kehrel, M. Fobker, B. Levkau, G. Assmann and A. Eckardstein**, *HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport*, Atherosclerosis, 161, 1-16., 2002.
 - **O'Brien K. D. and A. Chait**, *The biology of the artery wall in atherogenesis*, Med Clin North Am, 78, 41-67., 1994.
 - **Pratico D.**, *F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo*, Atherosclerosis, 147, 1-10., 1999.
 - **Quarck R., B. De Geest, D. Stengel, A. Mertens, M. Lox, G. Theilmeier, C. Michiels, M. Raes, H. Bult, D. Collen, P. Van Veldhoven, E. Ninio and P. Holvoet**, *Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor- acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*, Circulation, 103, 2495-500., 2001.
 - **Renard P., I. Ernest, A. Houbion, M. Art, H. Le Calvez, M. Raes and J. Remacle**, *Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB*, Nucleic Acids Res, 29, E21., 2001.
 - **Roberts L. J., 2nd and J. D. Morrow**, *Isoprostanes. Novel markers of endogenous lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury*, Ann N Y Acad Sci, 744, 237-42., 1994.
-

- **Roberts L. J., 2nd and J. D. Morrow**, *The generation and actions of isoprostanes*, *Biochim Biophys Acta*, 1345, 121-35., 1997.
- **Ross R.**, *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*, *N Engl J Med*, 314, 488-500., 1986.
- **Ross R.**, *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*, *Nature*, 362, 801-9., 1993.
- **Ross R.**, *Cell biology of atherosclerosis*, *Annu Rev Physiol*, 57, 791-804, 1995.
- **Ross R. and J. A. Glomset**, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*, *N Engl J Med*, 295, 369-77., 1976.
- **Sasayama S., M. Okada and A. Matsumori**, *Chemokines and cardiovascular diseases*, *Cardiovasc Res*, 45, 267-9., 2000.
- **Satoh M., A. Nakai, Y. Sokawa, K. Hirayoshi and K. Nagata**, *Modulation of the phosphorylation of glucose-regulated protein, GRP78, by transformation and inhibition of glycosylation*, *Exp Cell Res*, 205, 76-83., 1993.
- **Sung F. L., Y. L. Slow, G. Wang, E. G. Lynn and K. O**, *Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells leading to enhanced monocyte chemotaxis*, *Mol Cell Biochem*, 216, 121-8., 2001.
- **Tedgui A. and Z. Mallat**, *Athérosclérose et inflammation*, *Medecine/Sciences*, 17, 162-169, 2001.
- **Terpstra V., E. S. van Amersfoort, A. G. van Velzen, J. Kuiper and T. J. van Berkel**, *Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1860-72., 2000.
- **Tsuchiya S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada**, *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*, *Int J Cancer*, 26, 171-6., 1980.
- **van den Ende A., Y. Y. van der Hoek, J. J. Kastelein, M. L. Koschinsky, C. Labeur and M. Rosseneu**, *Lipoprotein [a]*, *Adv Clin Chem*, 32, 73-134, 1996.
- **Virmani R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb and S. M. Schwartz**, *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1262-75., 2000.
- **Voet and Voet**, *Biochemistry*, 1998.
- **Wang N., L. Verna, S. Hardy, J. Forsayeth, Y. Zhu and M. B. Stemerman**, *Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein- 1 in human endothelial cells*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2078-84., 1999.
- **Wick G., H. Perschinka and G. Millonig**, *Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update*, *Trends Immunol*, 22, 665-9., 2001.

- **Wilcox J. N. and B. F. Blumenthal**, *Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins*, J Nutr, 125, 631S-638S., 1995.
- **Willnow T. E., A. Nykjaer and J. Herz**, *Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins*, Nat Cell Biol, 1, E157-62., 1999.
- **Witztum J. L. and D. Steinberg**, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*, J Clin Invest, 88, 1785-92., 1991.
- **Wyne K. L., K. Pathak, M. C. Seabra and H. H. Hobbs**, *Expression of the VLDL receptor in endothelial cells*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 16, 407-15., 1996.
- **Yeh Y. C., I. P. Hwang and V. C. Yang**, *Identification and expression of scavenger receptor SR-GI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo*, Atherosclerosis, 161, 95-103, 2002.
- **Young S. G. and S. Parthasarathy**, *Why are low-density lipoproteins atherogenic?*, West J Med, 160, 153-64., 1994.
- **Zhu Y., J. H. Lin, H. L. Liao, O. Friedli, Jr., L. Verna, N. W. Marten, D. S. Straus and M. B. Stemerman**, *LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18, 473-80., 1998.