

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Etude des mécanismes moléculaires de transduction du signal impliqués dans la réponse à l'isoprostane-8 sur des cellules endothéliales humaines en culture

Burteau, Catherine

*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.



---

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

**Faculté des Sciences**

**ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL  
IMPLIQUES DANS LA REPONSE A L'ISOPROSTANE-8  
SUR DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

**Catherine BURTEAU**

**Juin 2002**

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 mécanismes moléculaires de transduction du signal  
impliqués dans la réponse à l'isoprostane-8  
sur des cellules endothéliales humaines en culture**

BURTEAU Catherine

Résumé

L'isoprostane-8 (ou 8-iso PGF<sub>2</sub>) fait partie de la grande famille des isoprostanes, lipides bioactifs dérivés de l'autooxydation des acides gras polyinsaturés, et en particulier de l'acide arachidonique. Présent au niveau des lésions athéromateuses, l'isoprostane-8 suscite le plus vif intérêt dans le cadre des recherches portant sur l'origine des maladies cardio-vasculaires telles que l'athérosclérose.

Bien que le mode d'action de l'isoprostane-8 reste encore controversé, ce travail tente de confirmer et de mettre en évidence les effets de cette molécule sur un modèle de cellules endothéliales humaines en culture.

Dans cette optique, nous avons étudié les effets de l'isoprostane-8 sur les voies de transduction du signal, du récepteur aux facteurs de transcription. L'activation de ces derniers a été suivie grâce à un dosage colorimétrique en plaque multi-puits. L'implication des MAPK a ensuite été mise en évidence par tests ELISA, par immunocytochimie en microscopie confocale ou par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. L'effet de l'isoprostane-8 a également été étudié sur l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales, et sur l'expression de la molécule chémoattractante MCP-1.

Les résultats obtenus convergent vers l'hypothèse selon laquelle l'isoprostane-8 serait un important agent pro-athérogène, capable d'induire un dysfonctionnement endothélial.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: M. Raes

Et voilà...

Demain matin je rends mon mémoire... et dans deux semaines j'ai fini ma licence !!!

Pas facile de résumer ces 4 ans en quelques lignes... ça l'est encore moins de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à cet épisode de ma vie et à la réalisation de ce mémoire.

Mais puisqu'il le faut, allons-y...

Je commencerai donc par vous, Martine Raes, pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et m'avoir présenté ce sujet de mémoire si passionnant. Merci pour vos conseils avisés, le temps et l'énergie que vous nous avez consacrés.

Je voudrais également remercier l'ensemble de l'équipe « athéro » pour son soutien et l'encadrement dont j'ai bénéficié au cours de ces 5 mois ; tout d'abord merci à toi, Aurélie, qui, pour une première année de thèse, a su nous guider et mener à bien 2 mémoires. Chapeau ! Vraiment ! Merci aussi pour ta disponibilité, ta patience et ta gentillesse. Un tout grand merci également à Martine pour nous avoir fait part de son temps, son expérience, son enthousiasme et sa bonne humeur. Merci également à Sofia pour ses conseils, sa rigueur (...et son sourire le matin dans le train), ainsi qu'à Noëlle qui, malgré quelques problèmes techniques, a su nous fournir d'aussi belles photos au confocal, sans oublier ma jumelle « athéro-girl », Cindy, a qui je fais un clin d'œil tout particulier pour avoir dû me supporter tous les jours au labo !

Merci enfin au reste du labo pour l'ambiance qu'ils y font régner...

Je tiens également à remercier ma famille, maman, papa, Audrey, pour leur soutien tant financier que moral. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui, jamais je n'aurais fait tout ce chemin. Merci du fond du cœur !! (sauf peut-être pour les travaux annuels du mois de juin...)

J'en arrive enfin à mes amis BIO ...

Sans vous les gars, je n'ose pas imaginer ce qu'auraient été ces 4 années !!! je vous remercie tout simplement pour avoir été là, pour partager rires, joies, stress (parfois),... toutes ces guindailles resteront gravées en moi... (d'ailleurs ce n'est pas encore fini !)

Je remercie les « vieilles » connaissances, comme Val (pour l'hébergement, la chopinette du midi au cercle et les bons moments qu'on a passé, même si tu ne m'as pas mise dans tes remerciements), Caro (courage ma Caro !!!), Babeth (pour les fous rires interminables et les confidences) et surtout Xav, pour son aide précieuse lors du scan de mes images, pour la place dans le train le matin (important !!!) et pour être tout simplement un ami exceptionnel, Céline (merci pour les exams de janvier), Aline et Plage (pour le PC), Sophie (pour les TP de bioch), Jérôme (t'es pardonné pour la deuxième candi),... et tous les autres que j'aurais malencontreusement oublié dans mon empressement...

Je remercie aussi les « découvertes » de cette année, comme Ludo (pour les noms sur le bureau et pour nous avoir bien fait marrer au GRH), Christelle, Sébastien, Cindy, Katy, Maud, Marina et les autres copains de « la CAGE » !!!

Je n'oublie pas non plus mes amis de Gembloux (Ben, Thibaut, Coco, ...), pour les ÉNORMES efforts qu'ils ont fait pour me faire oublier mes semaines éreintantes (HUM !), en répondant présents pour le verre du vendredi soir (pour celui du samedi aussi d'ailleurs...). Restez comme vous êtes, je vous adore les minous...

Enfin, je remercie tout particulièrement mon Fan, pour ses conseils, ses encouragements, pour m'avoir fait relativiser en temps voulu et pour m'avoir apporté tant de choses pendant ces 4 ans...

Merci à tous d'avoir été là...

Catherine (ou Catou pour certains !!!)

## Liste des abréviations.

8-iso-PGF2 $\alpha$ / 8-epi-PGF2 $\alpha$	: isoprostane 8-iso PGF2 $\alpha$
ACE	: angiotensine converting enzyme
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADP	: adénosine diphosphate
AP-1	: activated protein-1
Apo	: apoprotéine
ATP	: adénosine triphosphate
BSA	: bovine serum albumine
CAM	: cell adhesion molecule
CETP	: cholesterol-ester transfer protein
CML	: cellules musculaires lisses
cNOS	: constitutive nitric oxide synthase
COX-2	: cyclooxygénase inductible
CPA	: cellules présentatrices d'antigènes
CSF	: colony stimulating factor
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DO	: densité optique
DTT	: dithiothréitol
ECGS	: endothelial cell growth supplement
EDRF	: endothelium-derived relaxing factor
EDTA	: éthylène diamine tétraacétate de sodium
ELAM	: endothelium-leukocyte adhesion molecules
ELISA	: enzyme linked immuno sorbent assay
ERK1/ERK2	: extracellular regulated kinases
ET-1	: endothéline-1
FBS	: foetal bovine serum
FGF-2 ou bFGF	: fibroblast growth factor ou basic fibroblast factor
GSK3	: glycogène synthase kinase 3
HCAEC	: human coronay arterial endothelial cells
Hcy	: homocystéine
Hcy thio	: homocystéine thiolactone
HDL	: high density lipoprotein
HRP	: horseradish peroxydase
HUVEC-C	: human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	: intercellular adhesion molecule-1
IDL	: intermediate density lipoprotein
IgG	: immunoglobuline G
Ig-like	: immunoglobuline-like
IKK	: inhibitor Kappa kinase
IL-1, 6, 8, 12	: interleukine-1, 6, 8, 12
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
I $\kappa$ B	: inhibitor Kappa binding
JNK	: Jun-NH2 terminal protein kinase
LCAT	: lysolécithine cholestérol acyl transférase

LDL	: low density lipoprotein
LPL	: lipoprotein lipase
MAPK	: mitogen-activated protein kinases
MCP-1	: monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	: macrophage colony stimulating factor
MEC	: matrice extracellulaire
mm-LDL	: minimally modified LDL
NF $\kappa$ B	: nuclear factor Kappa binding
NLS	: nuclear localization site
NO	: nitric oxide
ox-LDL	: oxidized low density lipoprotein
PAF	: platelet activating factor
PAI-1	: plasminogen activator inhibitor
PBS	: phosphate buffered saline
PDGF	: platelet derived growth factor
PFA	: paraformaldéhyde
PGI <sub>2</sub>	: prostacycline
PIB	: phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	: protease inhibitor cocktail
PIC	: phosphatase inhibitor cocktail
PKA	: protéine kinase A
PKC	: protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	: phospholipase A <sub>2</sub>
PUFA	: polyunsaturated fatty acids
RE	: réticulum endoplasmique
RPMI	: Roswell park memorial institute
SDS	: dodécylsulfate de sodium
SRF	: serum response factor
TBARS	: thiobarbituric acid-reacting substance
TF	: tissue factor
TGF	: transforming growth factor beta
TMB	: tétraméthylbenzidine
TNF $\alpha$	: tumor necrosis factor alpha
t-PA	: tissular plasminogen activator
TXA <sub>2</sub>	: thromboxane A <sub>2</sub>
VCAM-1	: vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	: very low density lipoprotein
vWF	: Von Willebrand factor

---

# Table des matières.

---

<b>1</b>	<b>Introduction.</b>	<b>1</b>
1.1	L'athérosclérose.	2
1.1.1	Structure générale d'une artère.	2
1.1.2	Les acteurs cellulaires.	2
1.1.2.1	Les monocytes.	2
1.1.2.2	Les cellules musculaires lisses.	3
1.1.2.3	La cellule endothéliale.	4
	Les fonctions de l'endothélium et leurs implications dans le processus d'athérosclérose.	4
	a) Rôle des cellules endothéliales dans les phénomènes thrombotiques.	5
	b) Rôle des cellules endothéliales dans le maintien du tonus vasculaire.	6
	c) Barrière à perméabilité sélective.	8
	d) Néo-angiogenèse.	8
	e) Intervention dans la réponse immunitaire.	9
	f) Rôle dans le recrutement et l'adhérence des leucocytes circulants.	9
	g) Sécrétion de cytokines et facteurs de croissance.	10
	h) Activation de différentes voies de transduction du signal et facteurs de transcription.	12
	Conclusion.	12
1.1.3	Les lésions.	12
1.1.3.1	La strie lipidique.	12
1.1.3.2	La lésion fibro-lipidique.	13
1.1.3.3	La plaque athéromateuse.	13
1.1.4	Les facteurs de risque.	14
1.2	Les lipoprotéines.	16
1.2.1	Composition et structure.	16
1.2.2	Cycle des lipides.	16
1.2.3	Les lipoprotéines natives.	17
1.2.3.1	Les lipoprotéines anti-athérogènes : les HDL.	17
1.2.3.2	Les lipoprotéines pro-athérogènes.	17
	a) Les LDL.	17
	b) Les VLDL.	18
1.2.4	Les lipoprotéines oxydées.	19
1.2.4.1	L'oxydation des LDL.	19
1.2.4.2	Rôle des LDL oxydées dans l'athérosclérose.	20
1.2.4.3	Les lipides bioactifs.	20



1.3	Les isoprostanes et l'isoprostane 8-iso-PGF <sub>2</sub> $\alpha$ .....	21
1.3.1	Le métabolisme des isoprostanes.....	21
1.3.2	Fonctions biologiques de l'isoprostane 8-iso PGF <sub>2</sub> $\alpha$ .....	22
1.3.3	Mécanismes d'action de l'isoprostane 8-iso-PGF <sub>2</sub> $\alpha$ .....	23
1.3.3.1	Les récepteurs membranaires de l'isoprostane 8-iso PGF <sub>2</sub> $\alpha$ .....	23
1.3.3.2	Voies des MAPK.....	24
1.3.3.3	Activation des facteurs de transcription.....	24
	Le facteur de transcription AP-1.....	24
	Le facteur de transcription NF $\kappa$ B.....	25
1.4	Objectifs du mémoire.....	27
<b>2</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>28</b>
2.1	Culture cellulaire.....	29
2.1.1	Les cellules endothéliales HUVEC-C.....	29
2.1.1.1	Culture des HUVEC-C.....	29
	a) Préparation des milieux.....	29
	b) Repiquage des HUVEC-C.....	30
	Matériel.....	30
	c) Congélation des HUVEC-C.....	32
	d) Décongélation des HUVEC-C.....	32
2.1.1.2	Test de cytotoxicité.....	32
2.1.1.3	Mise en évidence du facteur de Von Willebrand par immunocytochimie.....	33
2.1.2	La lignée monocyttaire THP-1.....	35
2.1.2.1	Culture cellulaire des THP-1.....	35
	a) Repiquage des THP-1.....	35
	b) Congélation des THP-1.....	36
	c) Décongélation des THP-1.....	36
2.2	Etude du dysfonctionnement des cellules endothéliales.....	36
2.2.1	Dosage de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par colorimétrie.....	36
2.2.1.1	Fixation des sondes de capture double brin sur plaques 96 puits.....	36
2.2.1.2	Stimulation des cellules.....	37
2.2.1.3	Extraction protéique.....	38
2.2.1.4	Dosage protéique par la méthode de Bradford.....	39
2.2.1.5	Dosage de l'activation de NF $\kappa$ B par colorimétrie.....	40
2.2.2	Mise en évidence de la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau par immunocytochimie.....	41
2.2.3	Dosage colorimétrique de l'activation du facteur de transcription AP-1.....	42
2.2.3.1	Fixation des sondes de capture en plaque 96 puits.....	42
2.2.3.2	Stimulation des cellules.....	43
2.2.3.3	Extraction nucléaire.....	43
2.2.3.4	Dosage protéique par la méthode de Bradford.....	44
2.2.3.5	Dosage colorimétrique.....	45
2.2.3.6	Inhibiteurs.....	46
2.2.4	Mise en évidence de la phosphorylation des MAPK par immunocytochimie.....	47

2.2.5	Dosage du MCP-1 par test ELISA. ....	48
2.2.5.1	Stimulation des cellules. ....	48
2.2.5.2	Récupération du surnageant. ....	49
2.2.5.3	Dosage de la quantité totale de protéines dans les puits par la méthode du folin. ....	49
2.2.5.4	Test ELISA. ....	50
a)	Préparation des réactifs. ....	50
b)	Dosage de MCP-1. ....	51
2.2.6	Mesure de l'adhérence de cellules monocytaires humaines THP-1 sur des cellules endothéliales humaines HUVEC-C. ....	51
<b>3</b>	<b>Résultats et discussion. ....</b>	<b>54</b>
3.1	Choix du modèle cellulaire. ....	55
3.1.1	Les HUVEC-C. ....	55
3.1.2	Mise en évidence du facteur de Von Willebrand. ....	56
3.2	Étude du comportement des cellules endothéliales en présence d'homocystéine. ....	57
3.2.1	Cytotoxicité de l'homocystéine. ....	57
3.2.2	Effets de l'homocystéine sur les cellules endothéliales : Activation du facteur de transcription NFκB. ....	58
3.2.2.1	Dosage colorimétrique de NFκB. ....	59
3.2.2.2	Étude de la translocation de NFκB vers le noyau par immunocytochimie. ....	60
3.2.3	Discussion. ....	60
3.3	Étude du comportement des cellules endothéliales en présence d'isoprostane-8. ....	61
3.3.1	Cytotoxicité de l'isoprostane 8-iso-PGF <sub>2α</sub> . ....	62
3.3.2	Effets de l'isoprostane 8-iso-PGF <sub>2α</sub> sur les cellules endothéliales. ....	63
3.3.2.1	Adhérence des monocytes THP-1 sur les cellules endothéliales HUVEC-C. ....	63
3.3.2.2	Expression de la molécule chemoattractante MCP-1. ....	64
3.3.2.3	Activation de facteurs de transcription. ....	66
a)	Activation de NFκB. ....	66
a)	Activation de AP-1. ....	67
3.3.2.4	Activation des voies de signalisation des MAPK. ....	68
a)	Phosphorylation de la p42/p44 MAPK. ....	68
a)	Phosphorylation de la p38 <sup>MAPK</sup> . ....	69
3.3.2.5	Effet des inhibiteurs des MAPK. ....	70
3.3.2.6	Implication du récepteur à Thromboxane A2. ....	71
<b>4</b>	<b>Conclusions et perspectives. ....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Bibliographie. ....</b>	<b>78</b>

---

# 1 Introduction.

---

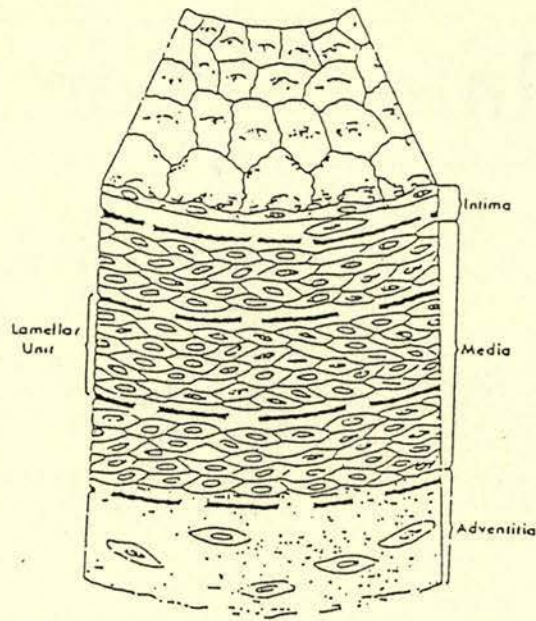


Figure 1.1 : Représentation schématique de la structure d'une artère de type élastique. (d'après Ross et Glomset, 1976)

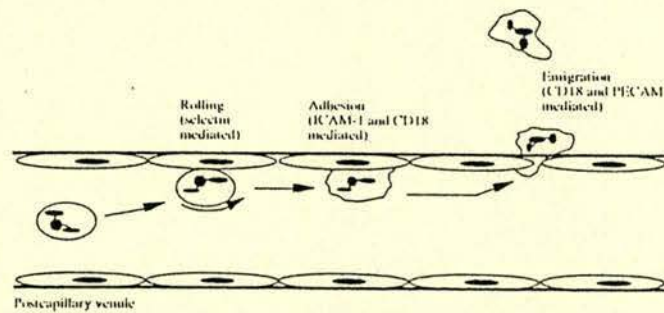


Fig. 1. Schematic representation of the mechanisms by which leucocytes leave the vasculature and enter the extravascular tissue. Leucocytes, moving at high speeds in the mainstream of blood flow, first commence rolling along the endothelial surface, a selectin-dependent process. Agents such as histamine and thrombin cause rapid upregulation of P-selectin to mediate this process. Rolling leucocytes can then undergo firm adhesion via interaction of CD18 present on leucocytes with ICAM-1 on endothelial cells. Chemotactic agents, such as PAF, C5a and LTB<sub>4</sub>, promote this adhesive response and also stimulate adherent leucocytes to migrate out of the vasculature via a PECAM-1-dependent process.

Figure 1.2 : Représentation schématique du mécanisme par lequel les monocytes quittent la circulation pour entrer dans les tissus extravasculaires. (d'après Hickey et Kubes, 1997)

## 1.1 L'athérosclérose.

L'athérosclérose est une pathologie cardiovasculaire affectant les artères de moyen calibre.

Elle peut entraîner de nombreuses complications telles que des infarctus du myocarde, des accidents cérébro-vasculaires ou encore des gangrènes.

Elle constitue ainsi la principale cause de décès dans nos pays occidentaux, cela étant dû notamment à l'hygiène de vie, à la sédentarité et aux régimes alimentaires des sociétés occidentales.

### 1.1.1 Structure générale d'une artère.

Cette pathologie touchant exclusivement les artères, il était tout d'abord nécessaire de rappeler brièvement la structure de ces dernières. (*figure 1.1*)

En partant de la lumière des vaisseaux vers l'extérieur, on rencontre une succession de couches :

- L'intima : elle constitue le premier rempart séparant le sang des tissus périphériques. Elle est formée d'une assise de cellules endothéliales, en contact direct avec le sang et posées sur une lame basale ainsi que sur une couche de tissu conjonctif subendothélial.
- La média : c'est une couche intermédiaire constituée de cellules musculaires lisses et de tissu conjonctif de type élastique. L'importance des fibres élastiques varie d'un type d'artère à l'autre.
- L'adventice : cette couche externe est surtout composée de fibroblastes, de collagène de type I et de quelques fibres élastiques. Elle peut également présenter une certaine vascularisation (*vasa vasorum*) et innervation (*nervi vasorum*) (Dadoune *et al.*, 1990).

### 1.1.2 Les acteurs cellulaires.

#### 1.1.2.1 Les monocytes.

Les monocytes sont des leucocytes circulants tenant un rôle primordial dans le développement des lésions athéromateuses.

En temps normal, ils interviennent dans les réactions inflammatoires courantes en se différenciant en macrophages après avoir passé la barrière endothéliale afin de phagocyter entre autres des agents exogènes (Hickey *et al.*, 1997).

Dès l'apparition des premières lésions, ces monocytes sont recrutés, adhèrent aux cellules endothéliales et amorcent leur diapédèse (Lefter *et al.*, 1999) (*figure 1.2*). Ce phénomène est induit et amplifié par la présence de différents agents

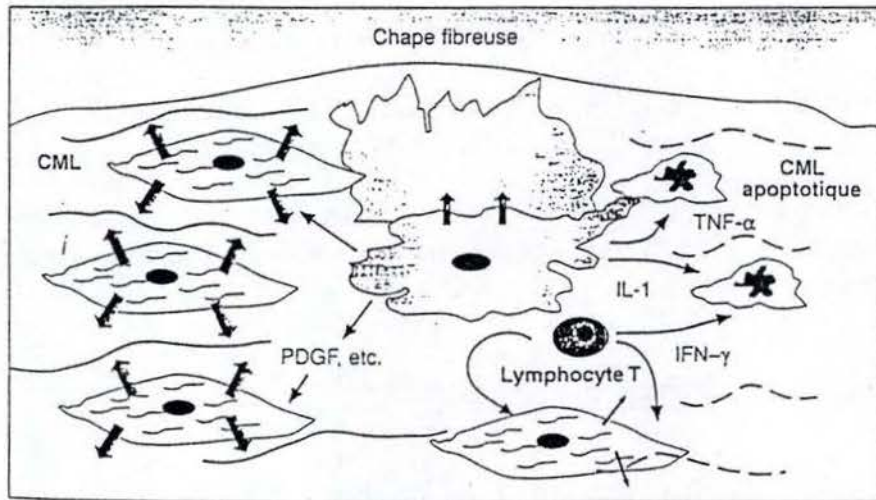


Figure 3. Interactions entre cellules inflammatoires et cellules musculaires lisses dans la chape fibreuse de la plaque d'athérosclérose. Sous l'effet de facteurs de croissance sécrétés par les macrophages, les cellules musculaires lisses (CML) se multiplient et synthétisent des fibres de collagène pour constituer une chape fibreuse qui stabilise la plaque d'athérosclérose. Les macrophages libèrent des protéases matricielles et sécrètent, avec les lymphocytes, des cytokines proinflammatoires qui provoquent l'apoptose des cellules musculaires lisses. Elles diminuent ainsi leur capacité de synthèse des protéines fibreuses, concourant à la fragilisation de la chape fibreuse et à l'instabilité de la plaque.

Figure 1.3 : Intervention des CML dans le développement de la chape fibreuse. (d'après Tedgui et Mallat, 2001)

stimulants, comme le MCP-1 ou les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF $\alpha$ ...).

Les monocytes expriment des molécules d'adhérence telles que les intégrines et les sélectines leucocytaires. Parallèlement, les cellules endothéliales expriment elles aussi des molécules d'adhérence comme ICAM-1, VCAM-1 ou certaines sélectines afin de faciliter la migration des monocytes (Duplaa *et al.*, 1996). Sans entrer dans les détails, on sait qu'un contexte inflammatoire favorise l'expression en membrane et/ou l'activité de plusieurs molécules d'adhérence, et sur les cellules endothéliales, et sur les leucocytes (Gimbrone, 1995) (*voir paragraphe 1.1.2.3 – point f*).

Une fois dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages, qui deviennent des cellules spumeuses en internalisant des LDL oxydées (Low Density Lipoprotein) grâce à leurs récepteurs scavenger (Massy *et al.*, 1996).

Les cellules monocytaires participent également à ce processus en tant que sources de cytokines et facteurs de croissance. Ceux-ci sont à leur tour à la base de la stimulation d'autres types cellulaires.

Enfin, les monocytes peuvent se comporter comme des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes) et participer aux réactions immunitaires en agissant en synergie avec les lymphocytes T, également présents dans les lésions athérosclérotiques précoces.

#### 1.1.2.2 Les cellules musculaires lisses.

Les cellules musculaires lisses (CML) constituent en grande partie la média des artères. Elles sont responsables du maintien du tonus vasculaire via l'action d'agents vaso-constricteurs comme le thromboxane A2 (TXA2) et l'endothéline-1 (ET-1) ou d'agents vaso-dilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) ou la prostacycline (PGI2). Grâce à cette régulation très fine, un équilibre s'installe donc entre ces deux tendances contradictoires. En conditions pro-athérogènes, cet équilibre est rompu et déplacé vers une action globale plutôt vaso-constrictive.

De plus, les CML acquièrent une morphologie différente et changent de fonction : elles passent d'un « phénotype contractile » à un « phénotype synthétique ». Les cellules voient alors leurs filaments contractiles diminuer au profit du développement du réticulum endoplasmique (RE) et du Golgi, favorisant ainsi leur activité sécrétoire (Massy *et al.*, 1996).

En effet, les CML sont extrêmement sensibles aux agents chémoattractants et au PDGF produit par l'endothélium et les cellules inflammatoires. Ceux-ci induisent leur migration vers l'intima et leur prolifération. Elles synthétisent ensuite énormément de matrice extracellulaire (MEC) et sont capables d'exprimer de nombreuses cytokines et facteurs de croissances (Tedgui *et al.*, 2001) (*figure 1.3*). Les CML constituent ainsi la chape fibreuse qui stabilise la lésion (*voir paragraphe 1.1.3*). Une fois dans l'intima, les CML peuvent aussi se différencier en cellules spumeuses (Wolfbauer *et al.*, 1986).

### 1.1.2.3 La cellule endothéliale.

L'endothélium est organisé en une assise de cellules pavimenteuses.

C'est au dysfonctionnement de cet acteur cellulaire, au coeur du processus d'athérogenèse, que ce travail sera consacré.

Avant toute chose, il est donc nécessaire de rappeler les différentes fonctions de cet acteur cellulaire, régulateur clé dans l'interface sang/tissu.

#### *Les fonctions de l'endothélium et leurs implications dans le processus d'athérosclérose.*

Depuis une dizaine d'années, l'évolution des connaissances concernant l'ultrastructure ainsi que les propriétés biologiques et fonctionnelles des cellules endothéliales les a fait passer du statut de simple barrière inerte à celui d'un tissu fonctionnel complexe, dynamique et adaptable aux besoins spécifiques locaux et temporels.

En effet, l'endothélium vasculaire assure non seulement une perméabilité sélective entre le flux sanguin et les tissus, mais il se comporte également comme un tissu vivant réactif, en interaction permanente avec d'autres cellules et facteurs humoraux.

Le développement des cultures cellulaires fut une étape clé dans la connaissance des cellules endothéliales et de leurs fonctions au sein du système vasculaire.

L'endothélium possède ainsi un grand nombre de fonctions spécifiques, modulables, en interaction les unes avec les autres, par l'intermédiaire desquelles il participe activement à la régulation de bon nombre de processus physiologiques.

Il intervient notamment au niveau de l'angiogenèse, de la coagulation, des réactions inflammatoires et immunitaires ainsi que dans la régulation du tonus vasculaire (Fajardo, 1989).

Néanmoins, les cellules endothéliales, en permanence exposées aux signaux environnementaux, sont susceptibles d'être perturbées, voir lésées, par différents facteurs mécaniques ou biochimiques.

Globalement, la stimulation de ces cellules aboutit à leur dérégulation et les amène à un état fonctionnel inadapté. Ayant perdu leurs capacités à ajuster leurs fonctions constitutives, elles participent alors activement au développement de pathologies dont l'athérosclérose.

Voici donc quelques-unes des principales fonctions de l'endothélium, ainsi que leur implication dans l'athérogenèse.



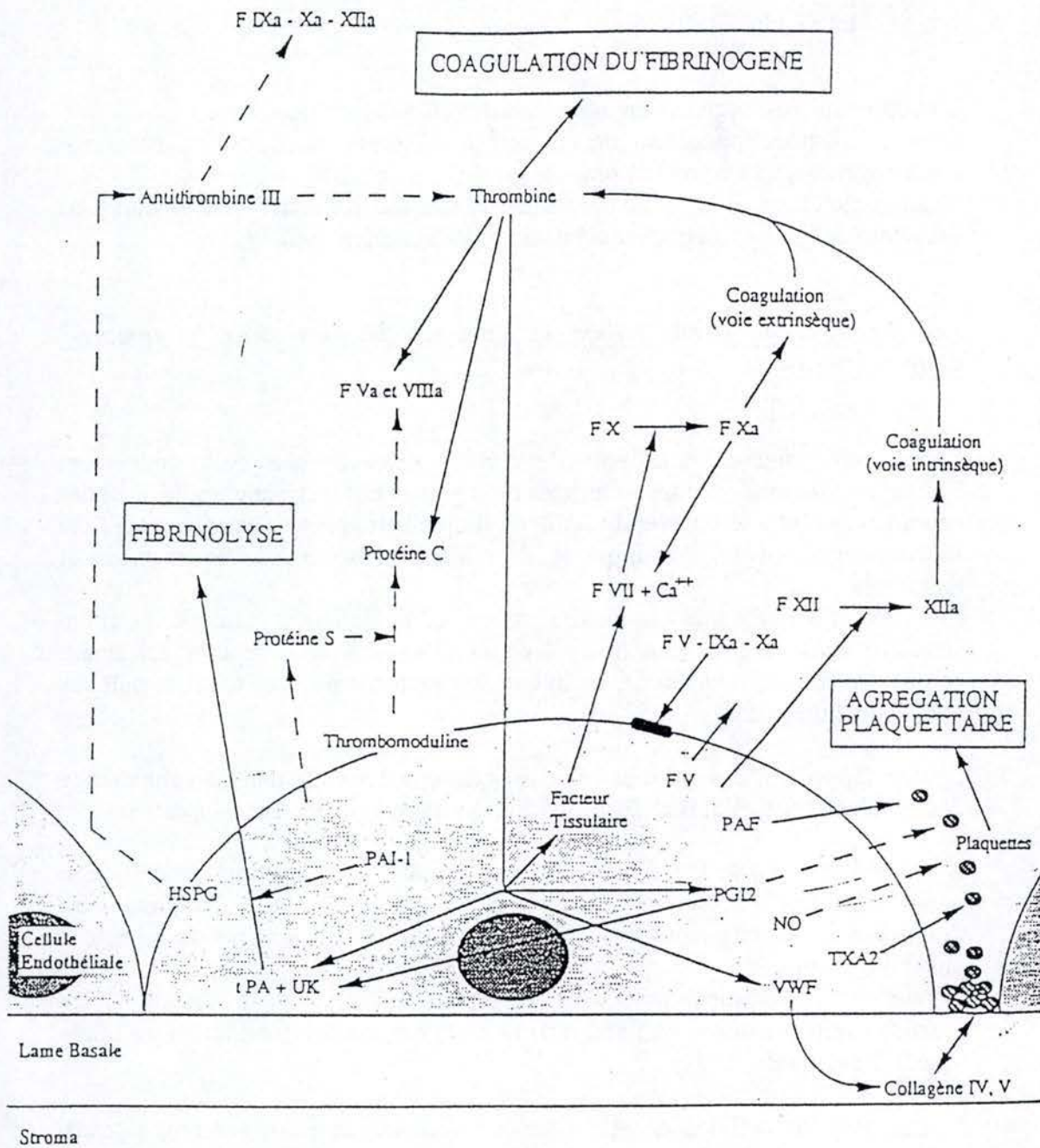


Fig 1. Cellules endothéliales et système hémostatique. Les cellules endothéliales participent à la régulation du système hémostatique par l'intermédiaire de molécules de surface et de produits de sécrétion ayant des effets agonistes (flèches en trait plein) ou antagonistes (flèches en pointillé) en relation avec l'agrégation plaquettaire (molécules proagrégantes : TXA<sub>2</sub>, VWF, PAF ; molécules antiagrégantes : PGI<sub>2</sub>, NO, HSPG, ADPase), la coagulation (activité procoagulante : facteur tissulaire, FV, FX, FX<sub>a</sub>, FXII ; activité anticoagulante : thrombomoduline, protéine S, HSPG) et la fibrinolyse (action fibrinolytique : tPA, UK, PGI<sub>2</sub> ; action antifibrinolytique : PAI-1).  
 Abréviations : HSPG : protéoglycannes de type héparan sulfate ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène ; PAI-1 : inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène ; UK : urokinase ; PAF : facteur d'activation des plaquettes ; PGI<sub>2</sub> : prostacycline ; NO : oxyde nitrique ; TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub> ; VWF : facteur Von Willebrand.

Figure 1.4 : Rôles des cellules endothéliales dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse. (d'après Demuth et al., 1995)

a) Rôle des cellules endothéliales dans les phénomènes thrombotiques.

□ EN CONDITIONS DE REPOS.

Les cellules endothéliales constituent l'un des éléments essentiels de la régulation du système hémostatique puisqu'elles peuvent développer des propriétés anti- et pro-thrombotiques. Un équilibre doit être maintenu entre ces deux tendances afin d'assurer le bon écoulement du sang, sans pour autant conduire à une fluidification trop importante de ce dernier pouvant mener à des problèmes de type hémorragique. (figure 1.4)

Cependant, l'action globale de l'endothélium a pour but le maintien d'un état plutôt anti-thrombotique (pour une revue, voir Demuth *et al.*, 1995), et cela par l'intermédiaire de trois mécanismes principaux :

- L'inhibition des facteurs de coagulation :

C'est la **thrombine**, produite à partir de la prothrombine en présence de calcium, qui est responsable de la coagulation. Son activation est régulée par une série de facteurs rassemblés en deux cascades réactionnelles : la voie intrinsèque, faisant intervenir de nombreux facteurs (XI, XII, IX...) et la voie extrinsèque, ou voie tissulaire (facteur VII). Toutes deux convergent vers l'activation du facteur X qui activera à son tour la thrombine (Crossman *et al.*, 1990) (figure 1.5).

Chez une cellule endothéliale au repos, l'équilibre est déplacé vers une action anti-thrombotique. En effet, la thrombine est tout d'abord inhibée par l'antithrombine III, phénomène favorisé par l'héparane sulfate, protéoglycane exprimée à la surface des cellules endothéliales et qui lie l'antithrombine III. L'héparane sulfate induit aussi l'endocytose et la dégradation de certains facteurs de coagulation (IXa, Xa et XIIa).

Enfin, la thrombomoduline se lie à la thrombine, permettant ainsi la fixation de la protéine C en membrane. Son association avec la protéine S, cofacteur synthétisé par les cellules endothéliales, induit l'inactivation des facteurs V et VIII par protéolyse. (figure 1.6)

- L'activation de la fibrinolyse :

La **fibrine**, constituant principal du caillot, est produite à partir du fibrinogène, sous l'effet de la thrombine.

Afin d'éviter la formation de caillot, la cellule endothéliale va, d'une part, permettre la dégradation de la fibrine et va, d'autre part, empêcher sa production en inhibant la thrombine. La dégradation est due à la plasmine, produite à partir du plasminogène par l'action du t-PA, molécule tissulaire activatrice du plasminogène (Kluft, 1990).

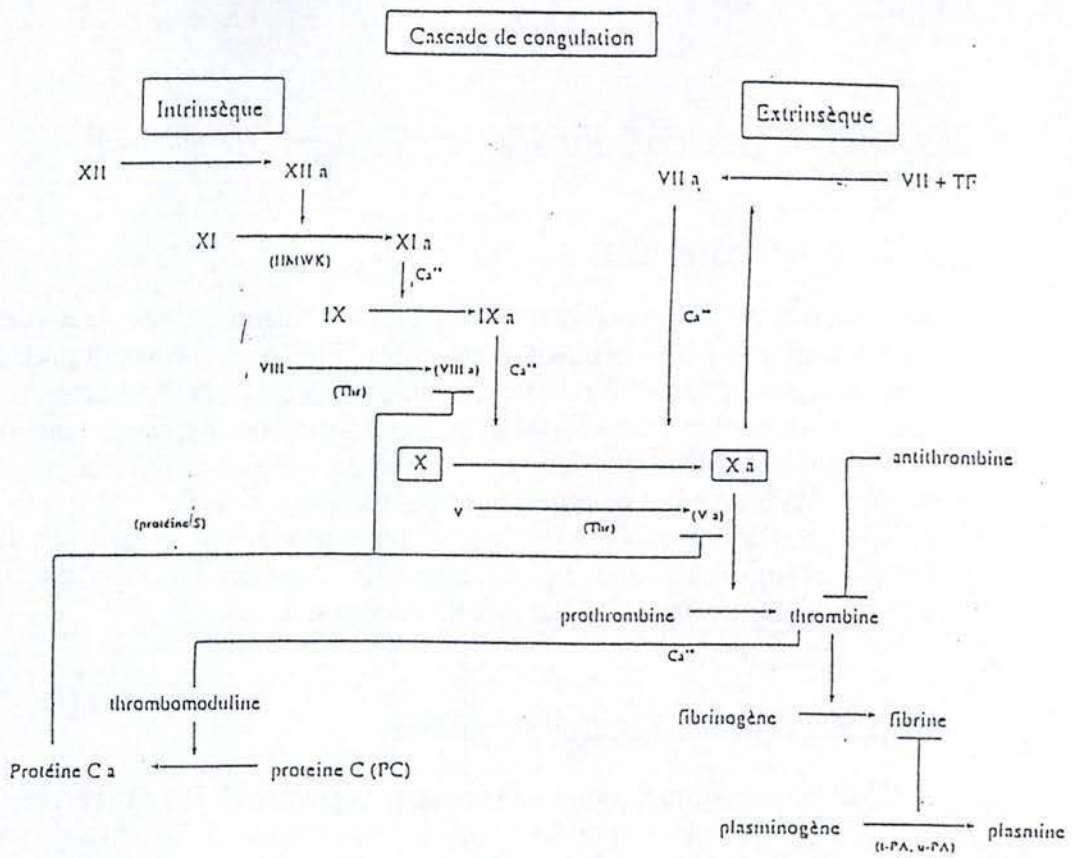


Figure 1.5 : Représentation schématique de la cascade de coagulation, avec les voies d'activation intrinsèque et extrinsèque. (d'après Crossman et Tuddenham, 1990)

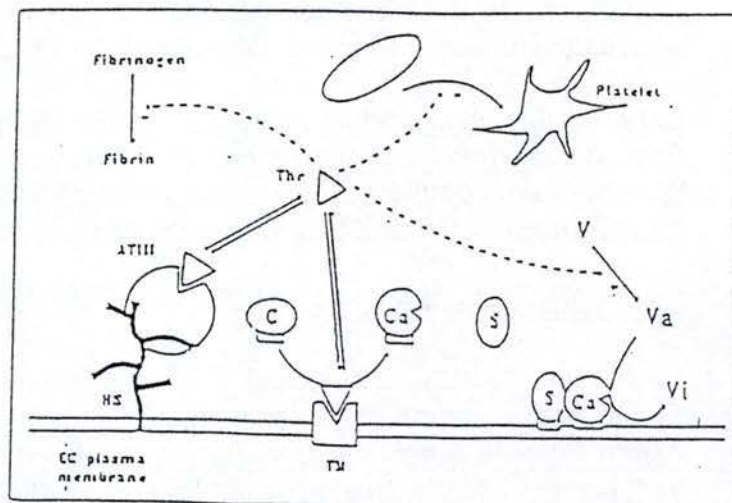


Figure 1.6 : Représentation schématique des mécanismes anticoagulants présents en surface des cellules endothéliales. La protéoglycane héparane sulfate (HS) accélère la neutralisation de la thrombine (THR), en liant l'antithrombine III (ATIII). La thrombine liée à la thrombomoduline (TM) active la protéine C. En présence de la protéine S, la protéine C activée se lie à la surface endothéliale et inactive le facteur V. (d'après Boeynaems et Piroton, 1994)

- L'inactivation des plaquettes :

La cellule endothéliale s'oppose à l'activation et à l'agrégation des plaquettes par :

- sa membrane recouverte d'héparane sulfate, empêchant l'adhésion des plaquettes au repos à l'endothélium intact.
- la sécrétion de prostacycline (PGI<sub>2</sub>), ce qui inhibe l'adhésion des plaquettes à l'endothélium en inactivant ces dernières.
- La sécrétion d'oxyde nitrique (NO) agissant en synergie avec le PGI<sub>2</sub>.
- son activité ADPasiqe, empêchant la présence d'ADP, activateur des plaquettes.

□ EN CONDITIONS PRO-ATHÉROGÈNES.

Stimulées par des facteurs d'ordre mécanique ou encore biochimique, une cellule endothéliale va voir son équilibre déplacé vers une action pro-thrombotique.

Ce phénomène est dû aux altérations que subissent les trois fonctions décrites ci-dessus.

Dans de telles circonstances, les voies de coagulation sont déclenchées par le facteur tissulaire (TF), pour la voie extrinsèque, et par les facteurs V et XII pour la voie intrinsèque, entre autre par perte de l'héparane sulfate et internalisation de la thrombomoduline (*figure 1.7*).

L'endothélium est capable d'inhiber la fibrinolyse en synthétisant l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et, de leur côté, les plaquettes sont activées par le facteur de Von Willebrand, le facteur d'activation des plaquettes (PAF) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) qui exerce l'action inverse de la PGI<sub>2</sub>. Ces trois molécules vasoactives sont produites par la cellule endothéliale activée (*figure 1.7*). Theilmeier *et al.*, en 1999, ont aussi montré que des plaquettes activées favorisent l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales.

b) Rôle des cellules endothéliales dans le maintien du tonus vasculaire.

□ EN CONDITIONS DE REPOS.

En temps normal, la cellule endothéliale se doit de maintenir un équilibre entre les substances à tendance vasodilatatrice et celles favorisant la vasoconstriction. Cet équilibre est bien évidemment soumis à une régulation très fine.

Les cellules exercent pour cela des effets à court terme, ainsi que des effets à plus long terme : dans un premier temps, l'endothélium contrôle l'état de tension des vaisseaux en régulant la contraction des cellules musculaires

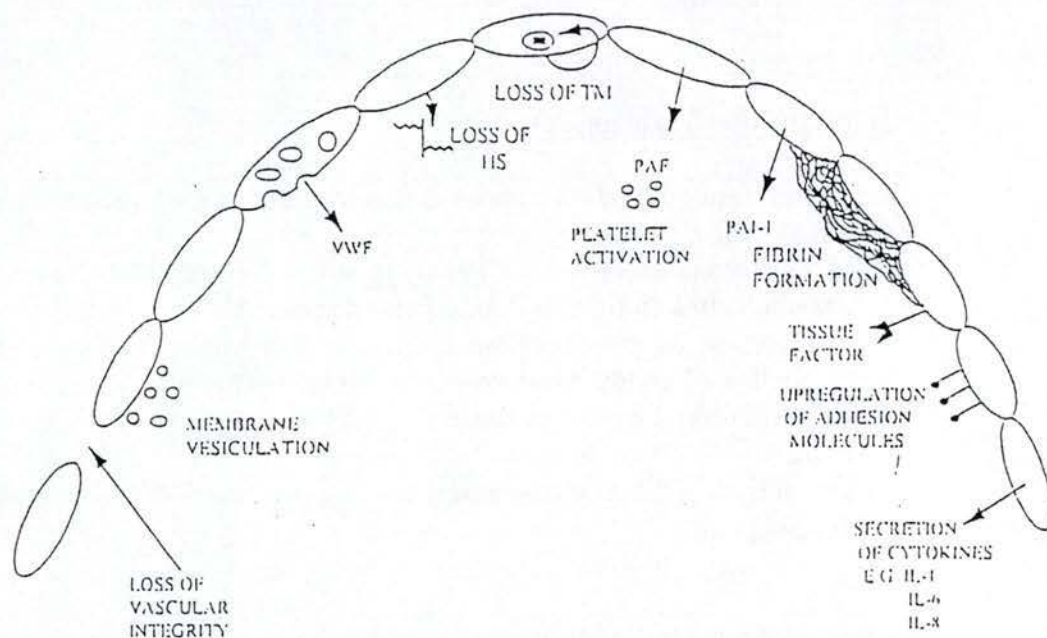


Fig. 14.1. Changes associated with endothelial cell activation. TM: thrombomodulin; HS: heparan sulphate; VWF: von Willebrand factor; PAF: Platelet activating factor; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor type 1.

Figure 1.7 : Changements fonctionnels associés à l'activation des cellules endothéliales.

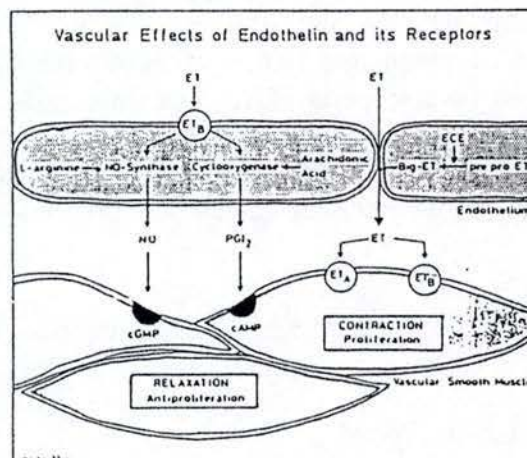


Figure 5. Vascular effects of endothelin and its receptors. Endothelin (ET) can activate endothelial receptors (ET<sub>B</sub> receptors) in the endothelial cell membrane, which are linked to the production of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). Nitric oxide exerts relaxation and possibly antiproliferation effects by activating cGMP, while PGI<sub>2</sub> stimulates the formation of cAMP. Furthermore, endothelin can activate vascular smooth muscle cell receptors (ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors), which mediate profound contraction and proliferation under certain conditions. ECE: endothelin converting enzyme.

Figure 1.8 : Action des cellules endothéliales sur les CML sur le tonus vasculaire par la libération d'agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs.

lisses (CML), par la production de substances vasorelaxantes et d'agents vasoconstricteurs (Demuth *et al.*, 1995) (*figure 1.8*).

Les cellules endothéliales influencent également la structure de la paroi artérielle en produisant des facteurs qui stimulent ou inhibent la croissance de ces CML.

### **Mais quels sont ces agents et quels en sont les actions ?**

- Les deux principaux agents vasodilatateurs sont la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et l'oxyde nitrique (NO) (Busse *et al.*, 1996).

La PGI<sub>2</sub>, dérivée de l'acide arachidonique, est sécrétée par les cellules endothéliales et agit directement sur les CML en augmentant leur taux d'AMP cyclique intracellulaire. La PGI<sub>2</sub> induit ainsi la relaxation des CML, tout en inhibant leur croissance (Henrich, 1991).

Sa production est régulée par de nombreux facteurs comme par exemple, le vieillissement, les radicaux libres, la thrombine, différents facteurs de croissance et cytokines, ou encore les LDL natives ou oxydées (Demuth *et al.*, 1995).

Le NO est lui aussi synthétisé de manière constitutive au niveau des cellules endothéliales, par la NO synthase constitutive (cNOS) et permet le maintien des vaisseaux dans un état plutôt dilaté (Anderson *et al.*, 1995). La nature de cet agent resta longtemps inconnue et il fut dénommé EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor). Il apparut par la suite que ce facteur n'était autre que le NO.

Ces deux substances agissent toutes deux sur les CML, tant au niveau de leur contractibilité, qu'au niveau de leur croissance.

- Le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II sont les principaux agents vasoconstricteurs (Demuth *et al.*, 1995).

Le TXA<sub>2</sub>, également dérivé du métabolisme de l'acide arachidonique, a l'effet inverse de la PGI<sub>2</sub> : il fait en sorte de diminuer le taux d'AMP cyclique des CML et exerce ainsi une action vasoconstrictrice sur ces dernières.

L'endothéline-1, synthétisée par les cellules endothéliales, constitue un vasoconstricteur puissant, mais également un agent mitogène pour les CML et les cellules endothéliales elles-mêmes. Sa production est modulée par les forces hémodynamiques et par différents facteurs humoraux comme le NO, la PGI<sub>2</sub>, certains facteurs de croissance et cytokines, les LDL ou encore l'angiotensine II. Cette dernière est un vasoconstricteur puissant, dérivé de l'angiotensinogène. Celui-ci est tout d'abord transformé en angiotensine I sous l'effet de la rénine, pour finalement être converti, au niveau de la surface endothéliale pulmonaire, en angiotensine II, par l'angiotensine convertant enzyme (ACE).

□ EN CONDITIONS PRO-ATHÉROGÈNES.

En conditions pro-inflammatoires par exemple, l'endothélium est altéré et l'équilibre est rompu, déplacé vers une action globale vasoconstrictrice.

Ceci est dû à des variations plus ou moins importantes au niveau de la synthèse des différents agents vasorelaxants et vasoconstricteurs. En effet, la production d'endothéline-1 est augmentée. La NO synthase inducible est néo-synthétisée et contribue à produire du NO en grosses quantités, de manière irrégulière, alors qu'au repos, la production de NO par la NO synthase est faible mais constitutive.

Du côté des prostaglandines, le rapport PGI<sub>2</sub> / TXA<sub>2</sub> diminue considérablement.

Tout cela a comme conséquence la perturbation du flux sanguin, avec réduction de la lumière du vaisseau sanguin touché, et risque d'hypertension locale.

c) Barrière à perméabilité sélective.

En contact direct avec le sang, l'endothélium est doué d'une perméabilité sélective grâce à laquelle il joue un rôle prépondérant dans les échanges entre plasma et tissus. Cette perméabilité peut être très importante, voire totale, dans certains cas (sinusoïdes hépatiques et sinus veineux de rate) ou au contraire inexistante dans d'autres cas (thymus, cerveau,...), ce qui rend les vaisseaux sanguins très hétérogènes.

En conditions pro-inflammatoires, cette régulation est perturbée et l'intégrité vasculaire est affectée. La perméabilité aux LDL est donc augmentée, permettant ainsi leur entrée dans l'intima, où elles seront oxydées, surtout en cas d'hypercholestérolémie (*figure 1.7*).

d) Néo-angiogenèse.

L'angiogenèse est un processus qui peut être physiologique, comme dans le cas de simple réparation cellulaire, de prolifération de l'endomètre ou encore lors de la formation du placenta, mais qui peut également être le signe d'une situation pathologique.

Elle fait intervenir la migration, la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales sous le contrôle de facteurs de croissance et de composants de la matrice extracellulaire (Fajardo, 1989).

En temps normal, ce phénomène est minime puisque les cellules endothéliales forment une monocouche et sont attachées à la lame basale.

En conditions pathologiques, elles peuvent cependant croître rapidement et proliférer sous l'influence de différents facteurs de croissance.

Cette prolifération est donc bénéfique lorsqu'elle aboutit à l'angiogenèse physiologique, mais peut devenir nuisible dans un contexte d'inflammation

chronique. Elle peut ainsi jouer un rôle dans le développement des lésions athéromateuses ainsi que dans la vascularisation des tumeurs.

e) Intervention dans la réponse immunitaire.

En plus de l'expression constitutive des antigènes du système ABO, les cellules endothéliales expriment de façon inductible les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (expression constitutive et inductible) et II (expression inductible) (Fajardo, 1989).

Les cellules endothéliales, de même que les monocytes et les lymphocytes, également présents dans les lésions athéromateuses, peuvent ainsi jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), ce qui leur permet de participer activement à l'immunité à médiation cellulaire (Horkko *et al.*, 2000).

f) Rôle dans le recrutement et l'adhérence des leucocytes circulants.

Le recrutement et l'adhérence des monocytes à l'endothélium est un des premiers événements menant à la formation d'un athérome. S'ensuit alors la migration de ces monocytes vers l'intima de la paroi vasculaire. (*figure 1.2*) Ces phénomènes font intervenir une gamme très large de protéines membranaires, tant au niveau de la cellule endothéliale que de la cellule leucocytaire (Gimbrone, 1995).

Parmi ces molécules d'adhérence, les plus importantes sont :

- Les **intégrines** : ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Ils sont présentés en membrane leucocytaire et reconnaissent des composants de la MEC, des composants plasmatiques ou encore des récepteurs membranaires faisant partie de la superfamille des récepteurs Ig-like, décrits ci-dessous.
- La **superfamille des récepteurs Ig-like** : cet ensemble, encore appelé famille CAM (Cell Adhesion Molecule), contient plusieurs membres dont les ICAM et les VCAM. VCAM et ICAM sont exprimées par les cellules endothéliales et reconnaissent les intégrines leucocytaires.
- Les **sélectines** : ce sont des lectines qui ont donc pour contre-récepteurs des motifs oligosaccharidiques portés par des protéines ou des lipides. En 1995, Gimbrone *et al.* décrivaient l'existence d'athéro-ELAM (Endothelium-Leukocyte Adhesion Molecules), capables de favoriser l'adhérence des leucocytes mononucléés sur l'endothélium. Il en existe trois : les P-sélectines, les E-sélectines et les L-sélectines. Les deux premières sont d'origine endothéliale tandis que la troisième est exprimée de manière constitutive en membrane leucocytaire.

Ces trois familles de molécules d'adhérence participent à ce processus de migration des monocytes à travers la barrière endothéliale, mais n'interviennent pas toutes au même moment.



Cytokines	Fonctions
IL-1	activation des lymphocytes inflammation locale ou systémique réponse de phase aigüe hématopoïèse
IL-6	activation des lymphocytes réponse de phase aigüe hématopoïèse
CSFs	activation et recrutement des leukocytes hématopoïèse prolifération des cellules endothéliales
molécules chémoattractantes (MCP-1, IL-8)	activation et recrutement des leukocytes
PDGF	prolifération des cellules musculaires lisses

*Figure 1.9* : Cytokines produites par l'endothélium et fonctions associées à ces cytokines.

Voici à présent les trois étapes caractérisant ce phénomène (Cotran *et al.*, 1998) :

- Les monocytes sont tout d'abord ralentis et entreprennent, grâce aux sélectines, les processus de « tethering » (capture) et de « rolling » (ralentissement avec enroulement) sur l'endothélium.
- Petit à petit, ces monocytes voient leur course arrêtée et finissent par adhérer totalement aux cellules endothéliales par la liaison des intégrines leucocytaires aux CAM, présents à la surface des cellules endothéliales activées.
- Vient alors l'étape cruciale de la diapédèse, c'est à dire la transmigration des leucocytes du sang vers l'intérieur de la paroi vasculaire, et plus précisément l'intima. Ce sont de nouveau les intégrines et les CAM qui rendent ce mécanisme possible, aidés par exemple par un chémoattractant puissant produit par l'endothélium activé, tel le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (Rollins *et al.*, 1990).

Une fois à l'intérieur de l'intima, ces monocytes vont pouvoir se différencier en macrophages. Ces derniers expriment des récepteurs scavenger qui permettent l'internalisation de LDL modifiées, se remplissent de lipides et deviennent des cellules dites spumeuses.

#### g) Sécrétion de cytokines et facteurs de croissance.

Un grand nombre de cytokines et facteurs de croissance sont présents au niveau de la plaque d'athérome, suggérant ainsi leur implication dans le développement de la pathologie, mais aussi dans les stades plus tardifs de la maladie (*figure 1.9*).

Les interleukines, les interférons, les facteurs de croissance hématopoïétiques et les autres facteurs de croissance font partie des facteurs impliqués dans l'athérogenèse.

La cellule endothéliale est à la fois cible et source de cytokines et de facteurs de croissance.

Ce sont de véritables signaux de communication entre les différents tissus et organes. Leurs effets peuvent se faire ressentir sur différents acteurs cellulaires, induisant des réponses de nature parfois très différente. Elles n'agissent en général qu'en réseaux entrelacés, pouvant induire l'expression d'autres médiateurs biochimiques qui agiront à leur tour sur d'autres types cellulaires et constituer ainsi une cascade réactionnelle avec, en aval, la ou les réponses désirée(s).

Parmi ce panel d'interactions, existent notamment des phénomènes d'inhibition, de rétroinhibition, d'amplification ou encore de synergie.

Parmi ces molécules, les plus importantes sont :

- Les Interleukines :

Sécrétée par l'endothélium, les CML et les monocytes, IL-1 est, de loin, l'interleukine la plus répandue et la plus étudiée dans le contexte de l'athérosclérose. Effectivement, outre la pléiotropie d'effets dont elle est

responsable en temps normal, IL-1 intervient dans bon nombre de phénomènes liés à l'athérogenèse. Chez les cellules endothéliales, elle induit notamment l'expression de molécules d'adhérence, de facteurs de croissance et la production de prostaglandines ou de NO en grandes quantités, en induisant respectivement la COX-2 (cyclooxygénase inductible) et la iNOS (NO synthase inductible). Elle peut également favoriser l'activité pro-thrombotique de ce même type cellulaire. La voie de transduction qu'elle utilise, passe par l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Read *et al.*, 1994). IL-1 agit aussi sur d'autres types cellulaires, entre autres, en stimulant la prolifération des CML ou en modifiant, chez ces dernières, la production de molécules comme le NO et les prostaglandines.

L'IL-6, l'IL-8 et l'IL-12 voient, elles aussi, leur expression augmentée.

- Le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) :  
Celui-ci est produit par les cellules endothéliales, les CML ainsi que les monocytes. Il favorise la prolifération des CML, tient un rôle important dans l'angiogenèse (Massy *et al.*, 1996), mais intervient surtout dans le recrutement et l'adhérence des monocytes (Baud *et al.*, 2001).
- Le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) :  
L'action de ce facteur reste des plus complexes. En effet, il induit la différenciation de certains types cellulaires, mais n'agit pas comme un facteur de croissance classique. De plus, il présente des effets contradictoires pro- et anti-prolifératifs : bien qu'il inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses lors des lésions les plus précoces, il finira par induire leur croissance dans des stades plus avancés de la pathologie. D'autre part, il induit la production de nombreux composants de la matrice extracellulaire (MEC).
- Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) :  
Sécrété tant par les cellules endothéliales que par les macrophages, ce facteur possède des effets mitogènes et chémoattractants sur les cellules musculaires lisses. Il induit donc leur prolifération, leur différenciation et leur migration de la média vers l'intima, où elles contribueront à former la chape fibreuse, tandis que d'autres CML se transformeront petit à petit en cellules spumeuses gorgées de lipides oxydés.
- Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) :  
Il est sécrété par l'endothélium et présente des effets similaires à ceux du PDGF.
- Les CSF (Colony Stimulating Factor) :  
Ce sont des facteurs de croissance hématopoïétiques. Ils sont exprimés par tous les constituants de la paroi vasculaire et favorisent ainsi la prolifération et la différenciation des leucocytes.

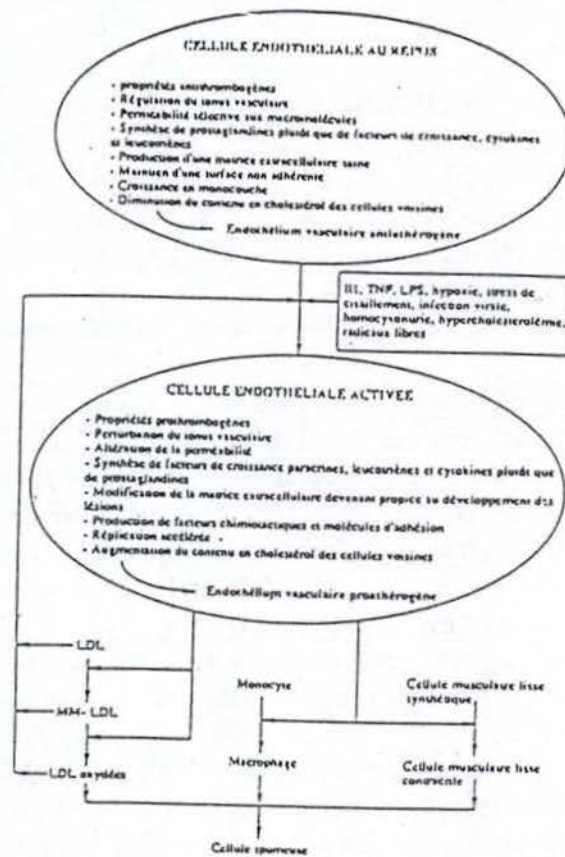


Figure 1.10 : Schéma résumant les principales propriétés des cellules endothéliales et leurs modifications après activation, favorisant l'athérogenèse. (d'après Demuth et al., 1995)

#### h) Activation de différentes voies de transduction du signal et facteurs de transcription.

Face à un agent perturbateur extérieur, la cellule endothéliale induit différents types de réponses, passant, pour la plupart, par la production de nouvelles protéines et donc l'expression de gènes.

L'induction de ces gènes nécessite l'activation de facteurs de transcription, derniers maillons des voies de transduction du signal régulant la cellule.

Les voies de transduction et les facteurs de transcription auxquels nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans le cadre de l'athérosclérose feront l'objet d'une explication plus détaillée au cours du *chapitre 1.3.3*.

#### Conclusion.

Toutes ces fonctions vitales nécessitent donc une régulation fine et interagissent les unes avec les autres afin d'assurer le maintien d'un équilibre global.

Comme nous venons de le voir, des conditions pro-athérogènes telles qu'un contexte inflammatoire, des stress hémodynamiques,... peuvent affecter ces différentes fonctions de l'endothélium, rompre l'équilibre mis en place et favoriser ainsi l'apparition de lésions vasculaires caractéristiques de l'athérosclérose (*figures 1.7 et 1.10*).

Le sous-chapitre suivant sera d'ailleurs consacré à la description des lésions athéromateuses et de leur évolution tout au long de la progression de la maladie.

### 1.1.3 Les lésions.

L'athérosclérose se caractérise par des lésions évolutives. On peut cependant distinguer trois stades principaux (Ross, 1995) (*figure 1.11*).

#### 1.1.3.1 La strie lipidique.

Cette lésion précoce est tout à fait réversible et peut d'ailleurs déjà apparaître chez des individus de très jeune âge.

Tout commence par un dysfonctionnement endothélial. Les cellules endothéliales deviennent alors moins jointives et permettent non seulement l'entrée des LDL dans la paroi artérielle, mais également le recrutement, l'adhérence et la transmigration des leucocytes circulant vers l'intima. C'est cette infiltration pariétale des cellules inflammatoires qui concède à cette maladie un caractère inflammatoire.

Là, ces leucocytes, et en particulier les monocytes différenciés en macrophages, se chargent progressivement en esters de cholestérol pour devenir des cellules

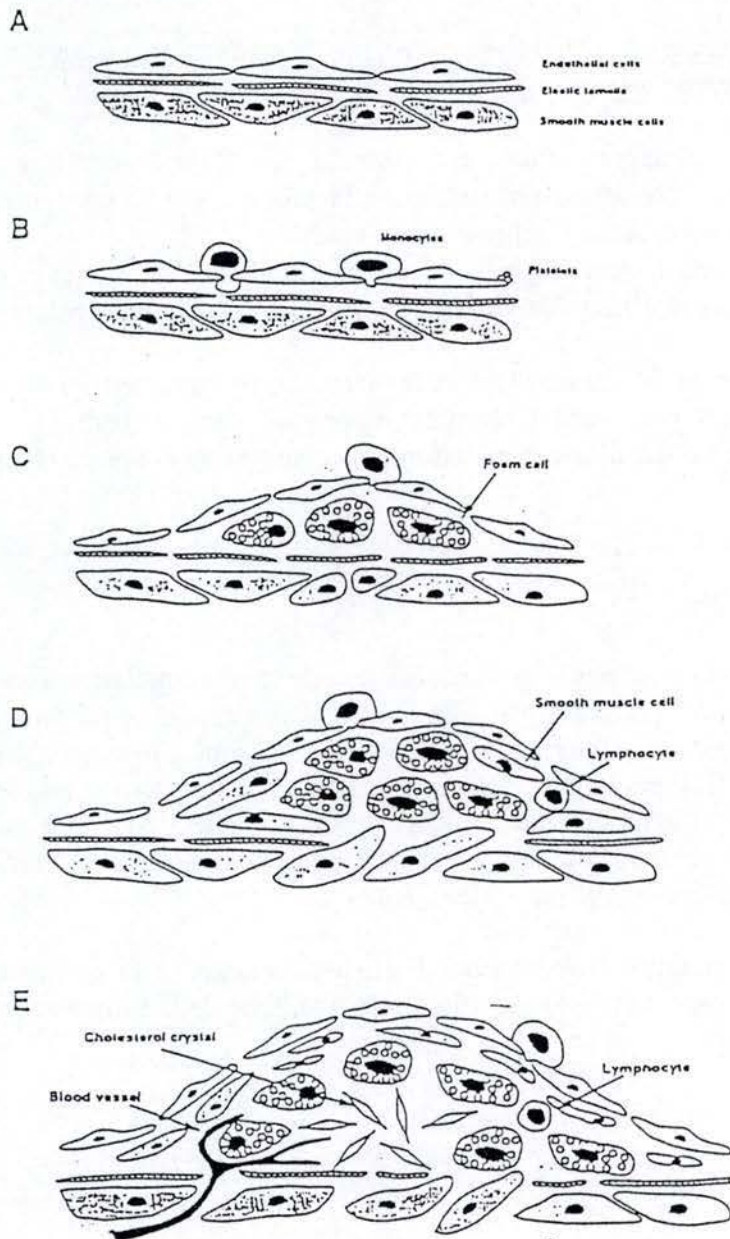


Figure 1.11 : Evolution de la lésion athéromateuse (d'après Cotran et al., 1994) A : vaisseau sain. B : suite à une blessure endothéliale, l'adhérence des leucocytes et des plaquettes est induite. C : formation des cellules spumeuses par accumulation de lipides dans les macrophages. D : migration et prolifération des CML dans l'intima. E : lésion avancée ou plaque athéromateuse, avec le cœur nécrotique et la néo-vascularisation.

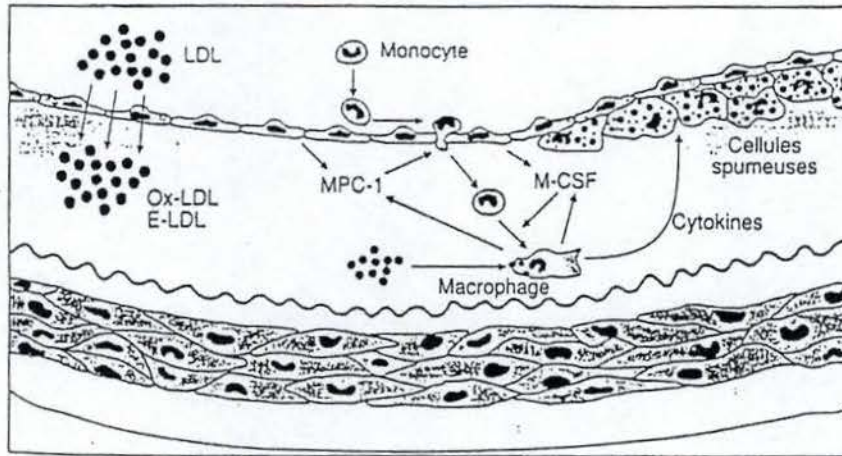


Figure 1.11. Représentation schématique des différentes étapes de la formation de la strie lipidique. 1. Pénétration et accumulation des LDL dans l'intima. 2. Oxydation des LDL (Ox-LDL) et modifications enzymatiques (E-LDL). 3. Recrutement, margination et diapédèse des monocytes-macrophages. 4. Captage des LDL modifiées par les macrophages par l'intermédiaire des récepteurs « éboueurs » (scavenger) et transformation des macrophages en cellules spumeuses.

Figure 1.12 : Représentation schématique des différentes étapes de la formation de la strie lipidique, avec le rôle des LDL, monocytes/macrophages et cellules endothéliales (Tedgui et Mallat, 2001).

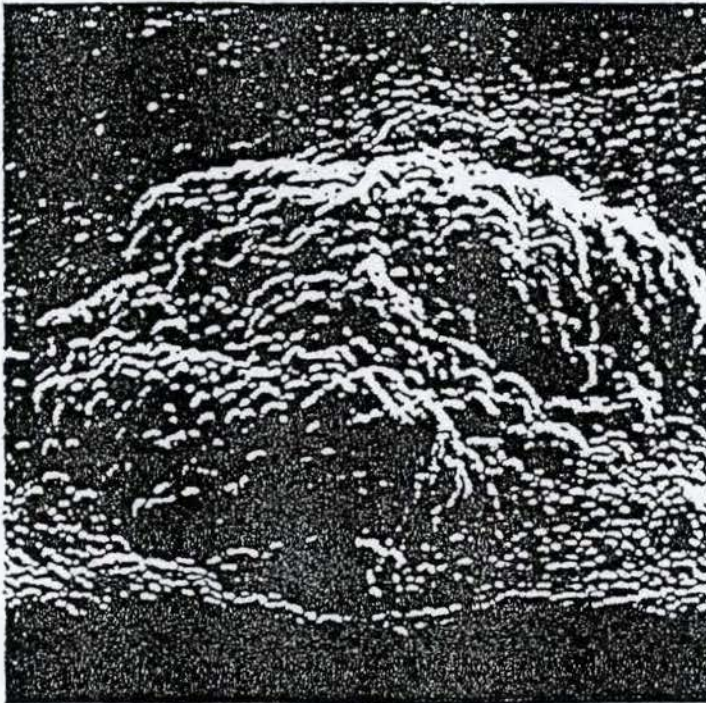
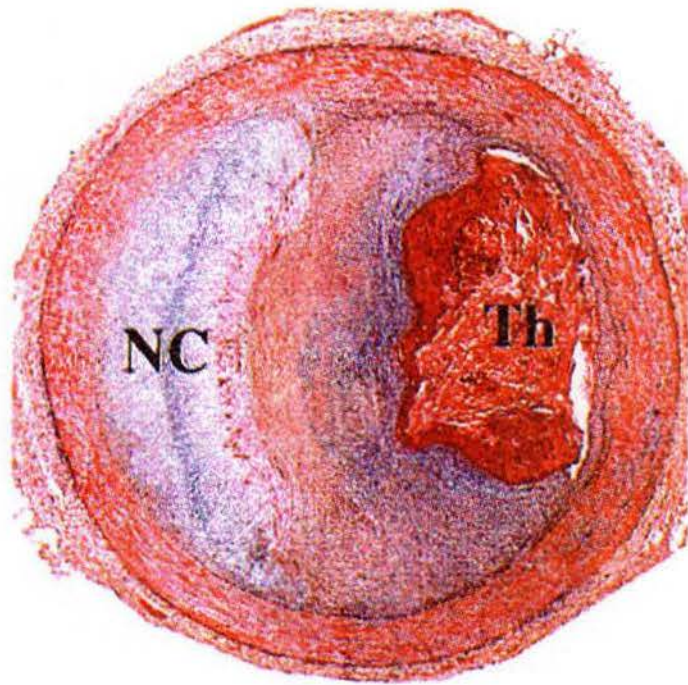


Figure 1.13 : Micrographie en microscopie électronique à balayage mettant en évidence le soulèvement de la paroi artérielle au niveau d'une plaque d'athérome. (d'après Woolf, 1998)



*Figure 1.14* : Micrographie d'une lésion athéromateuse avancée avec un thrombus obstruant totalement la lumière de l'artère. (NC= corps nécrotique; Th= thrombus)



spumeuses (pour une revue détaillée sur le métabolisme des lipoprotéines dans les macrophages, voir Brown *et al.*, 1983) (*figures 1.11 et 1.12*).

L'ensemble de ce processus est induit et amplifié par de nombreux facteurs sécrétés en grande partie par la cellule endothéliale : MCP-1, IL-1, TNF $\alpha$ , M-CSF, PDGF...

Ceux-ci agissent également sur les CML. Elles quittent alors la média pour envahir l'intima.

#### 1.1.3.2 La lésion fibro-lipidique.

Stimulées notamment par le PDGF, les CML prolifèrent, perdent petit à petit leur contractibilité et développent leur activité sécrétrice pour atteindre un phénotype synthétique. Elles forment alors une chape fibreuse coiffant la lésion, sous l'endothélium.

De leur côté, les monocytes continuent leur migration et leur différenciation en macrophages et cellules spumeuses.

Cette accumulation de cellules et la synthèse de plus en plus importante de MEC vont mener à un soulèvement de l'endothélium qui restreint la lumière du vaisseau sanguin (*figure 1.13*).

#### 1.1.3.3 La plaque athéromateuse.

À ce stade avancé de la maladie, l'intima est gorgée de cellules spumeuses et possède une MEC abondante. L'endothélium devient de plus en plus discret, voir inexistant. Les CML constituent une chape fibreuse, plus ou moins résistante, sous laquelle se trouve le noyau lipidique, avec, au centre, un corps nécrotique composé de débris cellulaires, de dépôts lipidiques extracellulaires et de cristaux de cholestérol (Munro *et al.*, 1988) (*figure 1.11 E*). Les lésions de grande taille peuvent même se vasculariser.

Tout ceci a pour conséquence la diminution progressive de la lumière du vaisseau sanguin.

Aux stades extrêmes, la lésion peut se fissurer et provoquer une hémorragie locale. Le caractère à présent pro-thrombotique des cellules endothéliales accélère la coagulation et la formation d'un thrombus susceptible d'obturer partiellement ou complètement l'artère (Wilcox *et al.*, 1995) (*figure 1.14*). Cela amène des conséquences catastrophiques, comme des infarctus du myocarde, des thromboses, des embolies ou encore des phénomènes de compensation tels que des anévrismes dont les ruptures ont en général des conséquences dramatiques. Signalons que les lésions les plus dangereuses sont les lésions instables, caractérisées par une chape fibreuse fragile, ce qui pourrait s'expliquer par un contexte inflammatoire chronique (Tedgui *et al.*, 2001 ; Libby *et al.*, 2002) (*figure 1.3*).

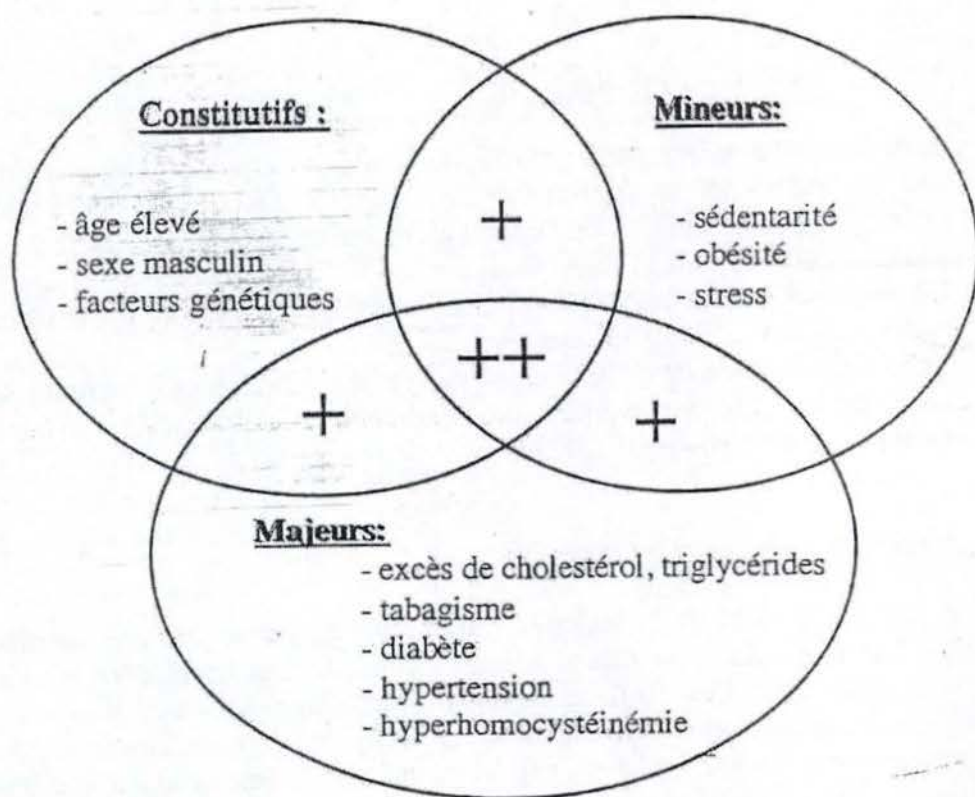


Figure 1.15: Diagramme représentant les différents types de facteurs de risque et leurs interactions (d'après Tacheny, 2001).

#### 1.1.4 Les facteurs de risque.

De nombreux facteurs, de nature mécanique, biochimique ou autre, interagissent et s'additionnent pour favoriser la formation des lésions décrites précédemment (Lusis, 2000) (*figure 1.15*).

Les **facteurs constitutifs** comme l'âge, le sexe (masculin) et certaines anomalies génétiques sont des agents favorisant le développement de la maladie (Stein *et al.*, 2002).

En effet, d'une manière générale, le nombre des années augmente les risques encourus. L'état d'avancement de la pathologie est également fonction du sexe : avant la ménopause, une femme sera moins exposée aux risques qu'un homme. À partir d'un certain âge, par contre, cette tendance est inversée.

Au niveau génétique, certaines mutations peuvent notamment affecter le métabolisme des lipides et induire ainsi l'apparition de lésions précoces. Dans le cadre de cette pathologie, l'importance des antécédents familiaux n'est plus à prouver.

Il existe également des **facteurs majeurs** liés ou non à des facteurs génétiques dont voici quelques exemples :

- Le tabagisme :

De nombreux travaux ont récemment démontré que le tabac est un facteur de risque majeur, qui perturbe l'intégrité des cellules endothéliales en affectant entre autres la fibrinolyse.

- Le diabète :

On sait depuis longtemps que l'hyperglycémie peut avoir des effets néfastes sur l'endothélium. C'est la raison pour laquelle les diabétiques seront plus facilement atteints d'athérosclérose et seront très souvent confrontés à des problèmes de coagulation ou de gangrène.

Selon Griffin *et al.*, (2001), une hypothèse pourrait expliquer ce phénomène : l'hyperglycémie induit l'expression du CD36 en membrane des monocytes. Cette molécule constitue un récepteur scavenger et permet donc l'internalisation des LDL oxydés et donc la formation de cellules spumeuses.

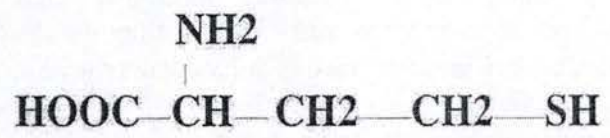
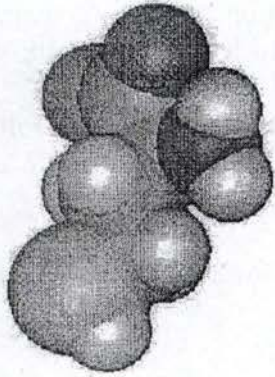
L'hyperglycémie altère également les lipoprotéines, dont nous parlerons au *paragraphe 1.2*.

- L'hypertension :

Au contact du sang circulant, l'endothélium, soumis à la double contrainte des forces de cisaillement et de la tension pariétale, contrôle la vasomotricité et le profil non-thrombotique du vaisseau. Cet équilibre est rompu en cas d'hypertension vasculaire.

- L'hyperhomocystéinémie :

L'homocystéine est un acide aminé possédant un groupement thiol mais ne participant pas à la synthèse protéique (*figure 1.16*). Elle se situe à mi-chemin entre deux voies métaboliques : elle peut en effet être reméthylée en méthionine ou suivre la voie de transsulfuration en cystathionine (*figure 1.17 A*). Une hyperhomocystéinémie peut provenir d'une carence d'origine génétique au niveau d'enzymes impliquées dans le métabolisme de la méthionine, ainsi que d'une carence



*Figure 1.16* : Structure et conformation de l'homocystéine (d'après Tacheny, 2001).

A

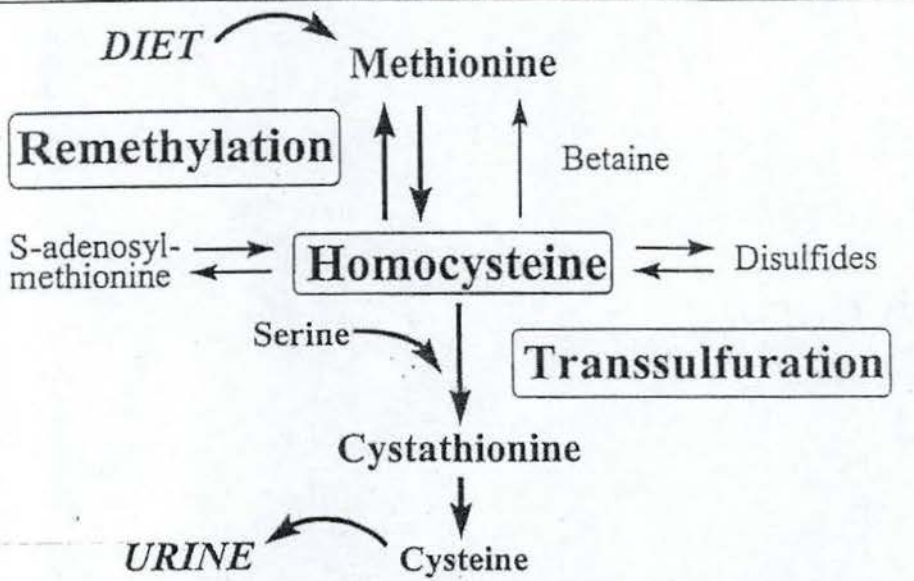


Fig. 1. Homocysteine metabolism. The two main paths for reducing homocysteine are remethylation (upper part) and transsulfuration (lower part).

B

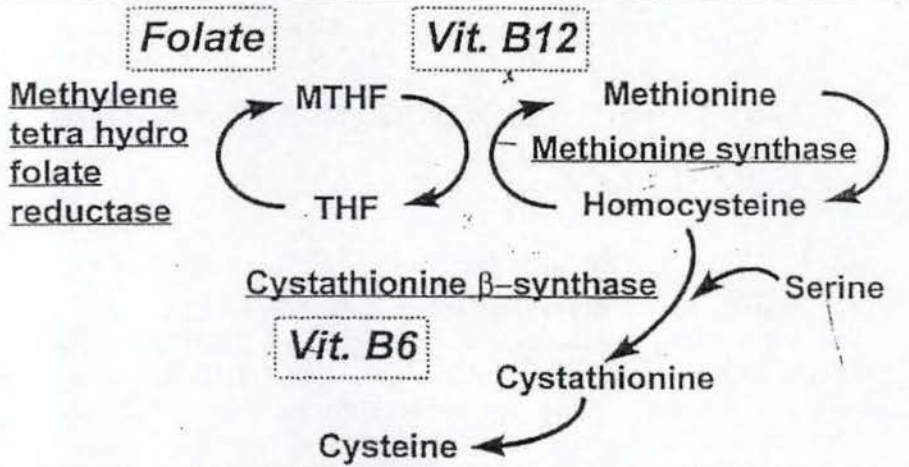


Fig. 6. Key enzymes and cofactors involved in homocysteine metabolism. Infrequent causes of hyperhomocysteinemia are genetic defects of the enzymes involved in the remethylation and transsulfuration of homocysteine: methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, and cystathionine  $\beta$ -synthase. Frequent and reversible causes of hyperhomocysteinemia are nutritional deficiencies of the essential cofactors: folate, vitamin B<sub>12</sub>, and vitamin B<sub>6</sub>. MTHF = methyltetrahydrofolate; THF = tetrahydrofolate; Vit. = vitamin.

Figure 1.17 : Métabolisme de l'homocystéine, avec les voies de reméthylation et transsulfuration (A) et les vitamines principalement impliquées (B) (d'après Andreotti et al., 2000).

## Death during follow-up

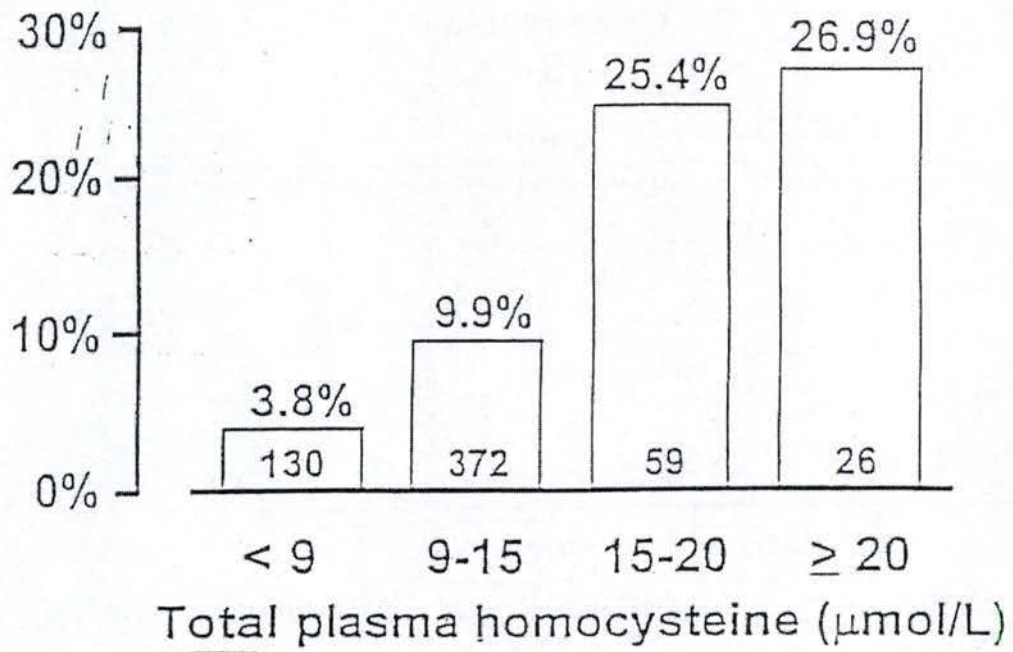


Figure 1.18 : Taux de mortalité observés dans une population de 587 patients souffrant de maladies ischémiques cardiaques et suivis durant 4 à 6 ans, en fonction des concentrations plasmatiques en homocystéine totale. Le nombre indiqué dans la colonne signale le nombre de patients correspondant à la concentration en homocystéine plasmatique mesurée chez ces patients (d'après Andreotti et al., 2000).

en acide folique ou en vitamine B12 ou B6, tous trois cofacteurs de ces enzymes (Alpert, 1999) (*figure 1.17 B*).

Ces dernières années, de nombreuses études ont suggéré le caractère pro-athérogène de l'homocystéine. En 1969 déjà, McCully mettait en évidence une corrélation entre un taux élevé d'homocystéine plasmatique et le développement de lésions athérosclérotiques précoces telles que des fibroses de l'intima ou des disruptions de la limitante élastique.

Les études épidémiologiques confirment d'ailleurs ces observations, comme par exemple les travaux d'Andreotti *et al.* (2000) (*figure 1.18*).

L'homocystéine agirait sur l'endothélium à plusieurs niveaux :

1. Elle exerce des effets cytotoxiques sur les cellules : son autooxydation induit la formation de radicaux libres, provoquant ainsi un stress oxydatif favorable à l'apparition de lésions.
2. Elle perturbe la vasotonicité en inactivant le NO produit par les cellules endothéliales.
3. Elle affecte également la coagulation et l'agrégation des plaquettes, tout en perturbant la régulation de la fibrinolyse.
4. L'adhérence des monocytes sur l'endothélium est pour sa part augmentée en présence d'excès d'homocystéine. Celle-ci induit en effet l'expression de molécules d'adhérence de type CAM (Hofmann *et al.*, 2001).
5. Enfin, elle serait également capable d'induire l'activation de certains facteurs de transcription, comme NFκB (Mercie *et al.*, 2000) et donc l'expression de gènes cible sous sa dépendance.

L'homocystéine est présente dans le plasma sous différentes formes. L'une d'elles est l'homocystéine thiolactone. Celle-ci est formée suite à la liaison de l'homocystéine à une molécule d'ATP et à sa cyclisation.

- Les lipoprotéines :

Les lipoprotéines sont des complexes plasmatiques composés de lipides, dont le cholestérol, et de protéines. Certaines lipoprotéines, et en particulier les LDL (low density lipoprotein), encore dénommées « mauvais cholestérol », sont largement impliquées dans le phénomène d'athérogenèse.

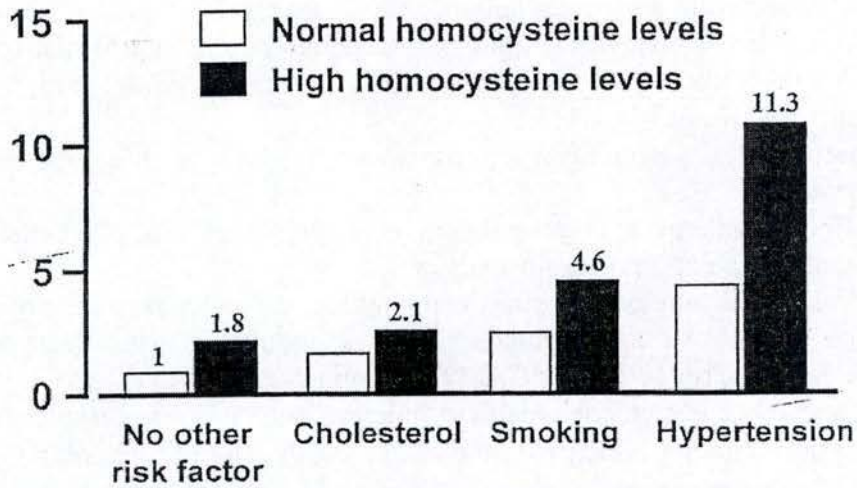
Le chapitre suivant y sera d'ailleurs consacré.

Le stress, la sédentarité ou encore l'obésité sont, quant à eux, des exemples de **facteurs mineurs**, capables de favoriser l'apparition des lésions athéromateuses.

Il est bien évident que ces facteurs ne sont que secondaires et ne peuvent aider au développement de la maladie qu'en présence de facteurs de risques plus agressifs.

Les risques de développer de l'athérosclérose augmentent d'autant plus lorsque plusieurs facteurs de risque s'additionnent chez une même personne. La *figure 1.19* montre par exemple les interactions entre une concentration élevée en homocystéine et d'autres facteurs de risque bien connus pour les maladies cardio-vasculaires.

**Odds Ratio  
for disease**



*Fig. 5. Interaction between high homocysteine levels and traditional cardiovascular risk factors. The data are based on 750 patients with coronary, cerebral, or peripheral artery disease diagnosed  $\leq 60$  years and 800 healthy controls. In the presence of isolated hyperhomocysteinemia, the odds of disease was 1.8. It increased additively, to 2.1, when hyperhomocysteinemia was associated with hypercholesterolemia, and multiplicatively to 4.6 and 11.3 when combined with smoking or hypertension. (Adapted from Graham et al. [8], with permission.)*

Figure 1.19 : Risques encourus par des patients atteints ou non d'hyperhomocystéinémie, en présence ou non d'autres facteurs de risque. Les données proviennent de 750 patients atteints de maladies cardiovasculaires et de 800 personnes saines (d'après Andreotti et al., 2000).



## 1.2 Les lipoprotéines.

### 1.2.1 Composition et structure.

La nature hydrophobe des lipides rend leur transport dans le sang difficile. Afin de faciliter celui-ci, ils s'associent avec des protéines pour former des complexes macromoléculaires solubles : **les lipoprotéines.**

Ces complexes renferment un noyau central composé de phospholipides, de triacylglycérides ou encore de cholestérol estérifié ou non. Ce noyau est entouré de protéines associées, appelées **apoprotéines**. Celles-ci assurent non seulement la structuration et le transport de la lipoprotéine, mais servent également de ligand spécifique pour des récepteurs cellulaires ou de cofacteurs enzymatiques.

Les lipoprotéines diffèrent entre elles en fonction de critères physico-chimiques tels que la taille ou la densité, mais également en fonction de leur composition en lipides et en protéines (Kuhn *et al.*, 1999). Il existe donc plusieurs types de lipoprotéines, classées selon leur densité :

- les chylomicrons
- les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*)
- les IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*)
- les LDL (*Low Density Lipoprotein*)
- les HDL (*High Density Lipoprotein*)

### 1.2.2 Cycle des lipides.

Les chylomicrons sont tout d'abord produits au niveau de l'intestin grêle, et plus précisément au pôle baso-latéral des entérocytes. Ils passent alors dans le sang et dans la lymphe qui enrichie en triglycérides, devient le chyle, dont la fonction est de redistribuer les graisses d'origine exogène vers le foie.

Après une digestion des triglycérides par la *lipoprotein lipase* (LPL), les chylomicrons résiduels sont reconnus et internalisés par les hépatocytes, principalement via le récepteur à ApoE.

Le foie produit alors des VLDL qui, après digestion des triglycérides par la même LPL et la lipase hépatique, se transforment en IDL. Ces dernières réagissent avec les HDL pour former les LDL, grâce à la *cholesterol-ester transfer protein* (CETP), qui transfère les esters de cholestérol des HDL aux LDL en formation.

Ces LDL sont très riches en cholestérol estérifié et possèdent une apoprotéine nommée ApoB-100. Leur rôle est de redistribuer les lipides dans les tissus périphériques. Une partie des LDL retourne également vers le foie, grâce à des récepteurs membranaires : les récepteurs à ApoB-100.

Le surplus de cholestérol dans les tissus périphériques est pris en charge par les HDL. Celles-ci sont produites au niveau de l'intestin et du foie et sont associées à de

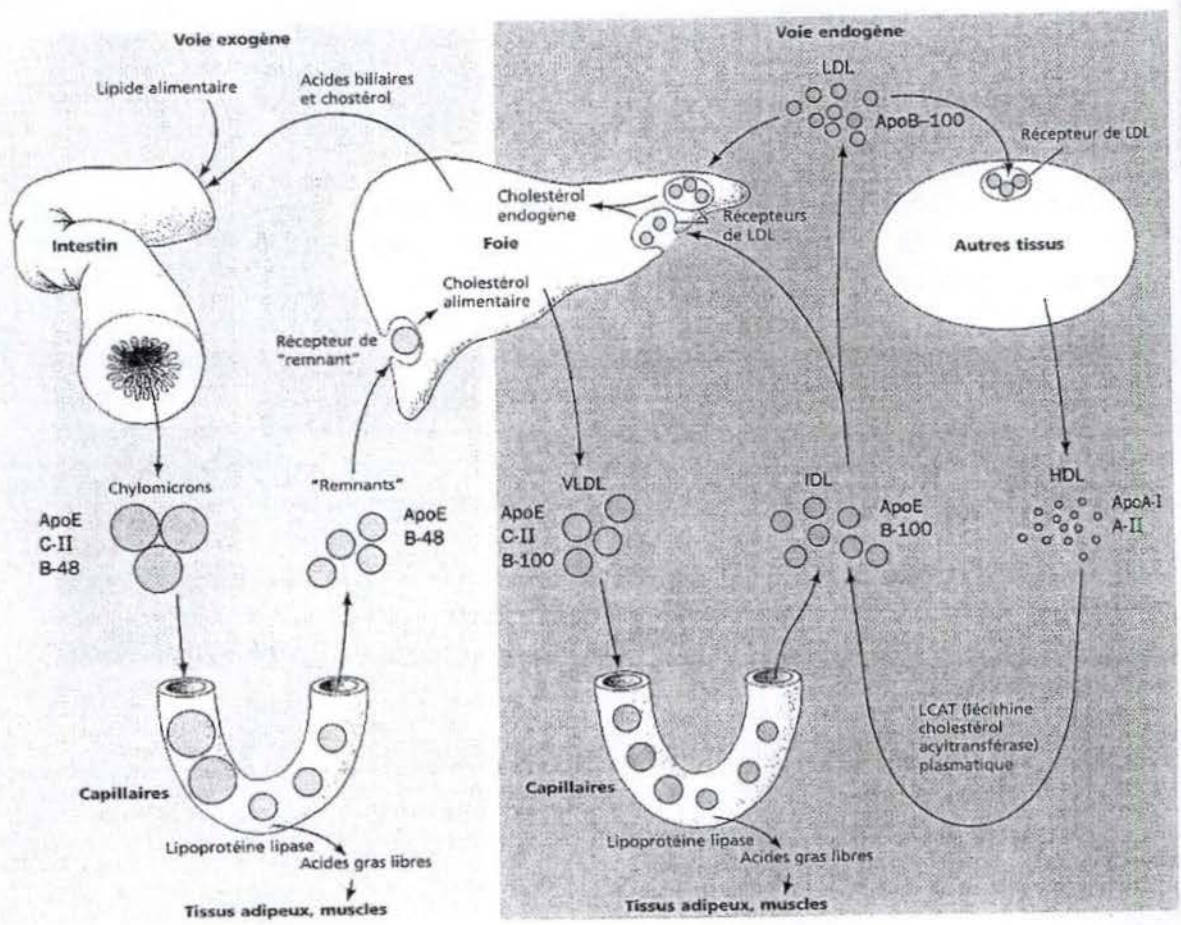


Figure 1.20 : Modèle pour le cycle des lipides et des lipoprotéines chez l'Homme (d'après Voet et Voet, 1998).

nombreuses apoprotéines dont les principales sont ApoA-I, ApoA-II et certaines isoformes d'ApoC.

Leur rôle est de pomper le cholestérol des tissus périphériques en l'extrayant des membranes cellulaires et de l'estérifier grâce à la *lysolécithine cholesterol acyl transferase* (LCAT), enzyme activée par l'ApoA-I. Les esters de cholestérol cédés aux LDL, sont alors transportés vers le foie où le cholestérol peut être dégradé sous forme de sels biliaires. C'est ce qu'on appelle le transport inverse du cholestérol (*figure 1.20*). Les HDL peuvent aussi être directement captés par les tissus.

### 1.2.3 Les lipoprotéines natives.

Les lipoprotéines citées précédemment sont appelées « lipoprotéines natives ». Elles suivent en effet le cycle normal des lipides expliqué ci-dessus.

Elles remplissent cependant des fonctions différentes, leur conférant un caractère pro- ou anti-athérogène.

#### 1.2.3.1 Les lipoprotéines anti-athérogènes : les HDL.

Les études épidémiologiques montrent clairement un lien de causalité entre un taux élevé de HDL plasmatiques et une faible propension aux maladies cardiovasculaires.

Les HDL présentent une action protectrice directe contre l'athérosclérose (Berliner *et al.*, 1995). En effet, outre leur fonction dans le transport du cholestérol estérifié vers le foie, site de dégradation de ce cholestérol, les HDL inhibent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et ont un rôle anti-oxidant grâce à certaines enzymes qui leur sont associées, comme la *PAF acétyl hydrolase*. Nous verrons par la suite toute l'importance de cet effet anti-oxidant.

De plus, une anomalie au niveau des gènes codant pour les ApoA, apoprotéines structurant les HDL, a pour conséquence la diminution du taux plasmatique de HDL, et se caractérise par l'apparition d'athérosclérose précoce.

#### 1.2.3.2 Les lipoprotéines pro-athérogènes.

##### a) Les LDL.

Les LDL constituent ce que l'on appelle communément le mauvais cholestérol. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont prouvé l'existence d'un lien entre des taux plasmatiques élevés en LDL et le risque de développer des maladies cardiovasculaires.

Les LDL sont chargées de la redistribution des graisses, et plus précisément du cholestérol, dans l'ensemble de l'organisme. En cas de dérégulation du cycle des lipides, cette distribution peut être altérée et le taux de cholestérol devenir excessif.

Ce dysfonctionnement peut avoir des causes diverses :

Il est souvent dû à une anomalie génétique touchant les récepteurs à ApoB100 au niveau des hépatocytes, encore appelés récepteurs à LDL natives (Brown *et al.*, 1986). Ceux-ci voient leur expression inhibée par un codon stop prématuré ou simplement perturbée. Des mutations peuvent engendrer des problèmes conformationnels, empêchant soit la fixation de la protéine en membrane, soit la reconnaissance de son ligand, soit l'internalisation du complexe Récepteur-LDL. On parle d'hypercholestérolémie familiale. Les homozygotes présentent des concentrations plasmatiques en LDL entre 500 et 1000 mg/dl, soit 3 à 6 fois plus que chez les personnes non atteintes.

Des mutations peuvent également affecter les apoprotéines des LDL, altérant par la même occasion leur affinité pour les récepteurs à LDL natives, et empêchant donc l'internalisation de ces dernières.

Les LDL, ainsi que leur contenu en cholestérol, s'accumulent alors dans le plasma. Cela va tout d'abord favoriser une dérégulation du contrôle du transport des LDL à travers l'endothélium artériel. Ces LDL vont ensuite s'accumuler dans l'intima des vaisseaux et y subir une oxydation qui sera à l'origine des premières étapes de la formation des lésions, celles-ci apparaissant de manière précoce chez ces personnes (Witztum *et al.*, 1991).

#### b) Les VLDL.

Précurseurs des LDL, les VLDL sont aussi considérées comme pro-athérogènes. Elles sont porteuses des apoprotéines B-100, E et C. Tout comme les LDL, les VLDL s'accumulent dans le plasma suite à une anomalie au niveau de leurs apoprotéines ou des récepteurs correspondant sur les hépatocytes. On appelle cette maladie « dysbetalipoprotéïnémie » (Steinberg *et al.*, Witzum, 1990). Elles participent alors, avec les HDL, à la formation de nouvelles LDL. Elles participent également à l'induction de l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (Alderson *et al.*, 1986 ; Territo *et al.*, 1989), en induisant entre autres l'expression et la sécrétion de MCP-1 par les cellules endothéliales (Wang *et al.*, 1997).

Des excès de LDL dans le plasma entraînent donc une accumulation de ces LDL et donc de cholestérol dans l'intima. Là, elles seront rapidement modifiées, la plupart du temps par oxydation. Cette oxydation accentuera encore le caractère athérogène des LDL.

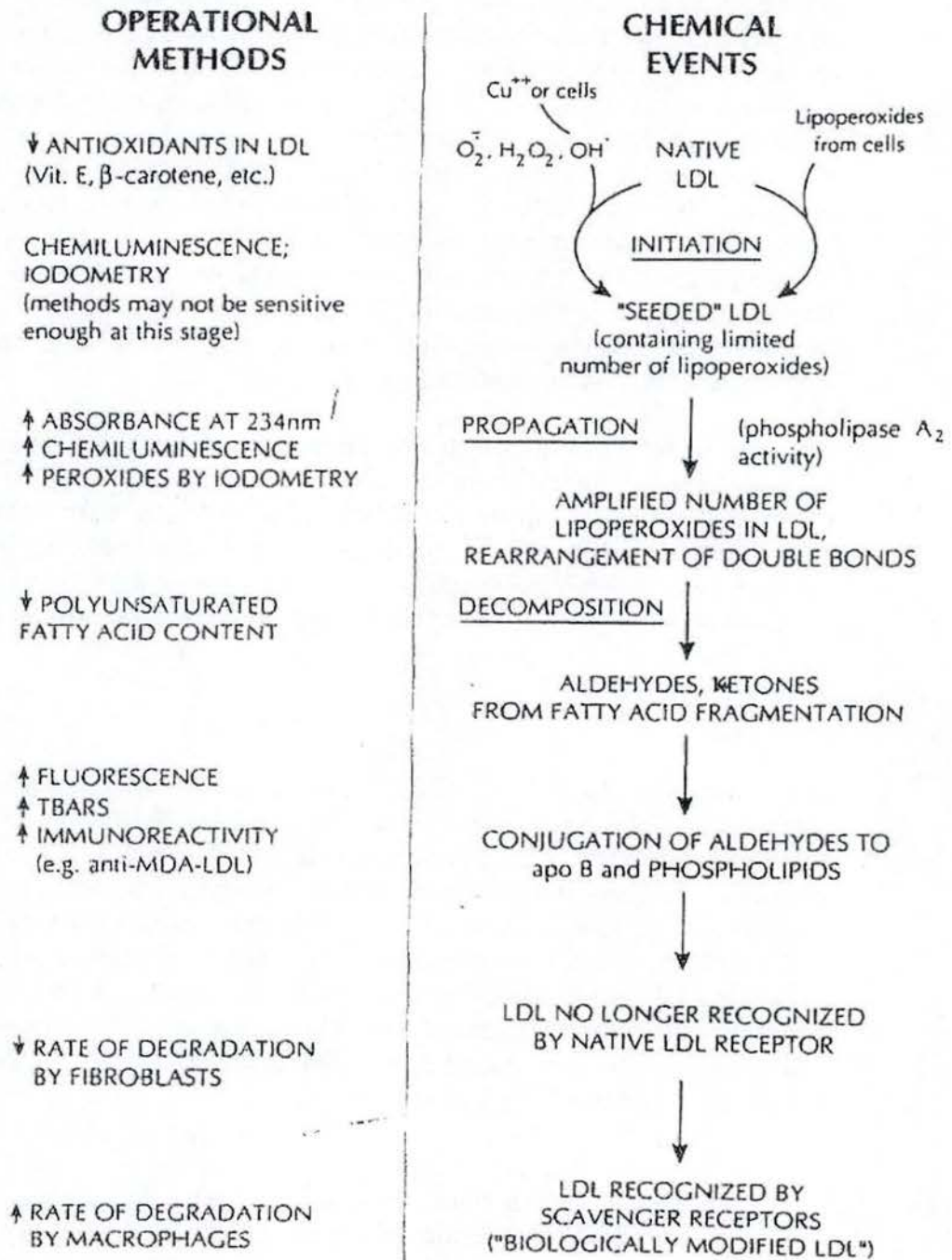


Figure 1.21 : Schéma montrant les événements moléculaires majeurs qui ont lieu durant l'oxydation des LDL avec les différentes phases de cette oxydation. La réaction d'oxydation commence par l'altération des acides gras insaturés et finit par générer des molécules très réactives. Ces molécules peuvent à leur tour altérer des acides gras insaturés, mais aussi l'ApoB-100 en la fragmentant et en la modifiant de manière covalente. Au cours de l'oxydation, plusieurs techniques permettent de détecter et mesurer la production de ces molécules. (d'après Witztum et Steinberg, 1991).

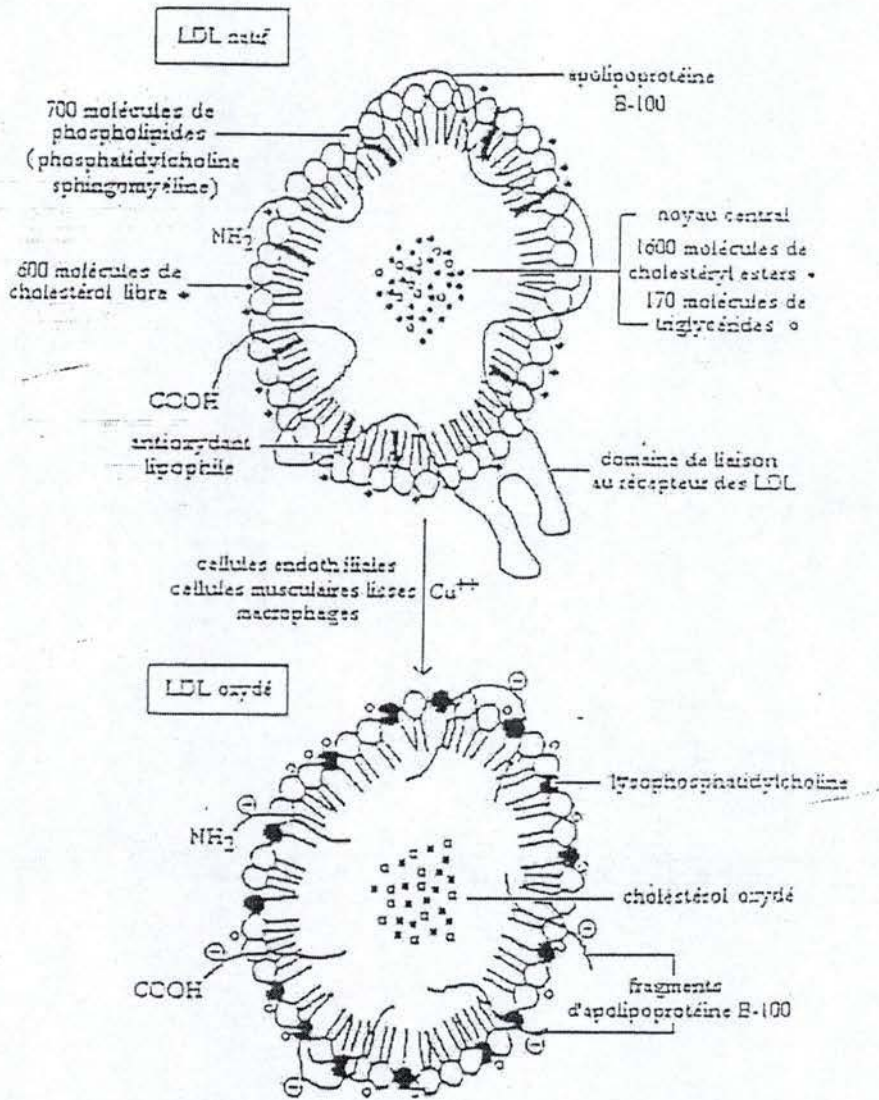


Figure 1.22: Conversion d'une LDL native en une LDL fortement oxydée. On constatera la fragmentation de l'ApoB-100 et les modifications lipidiques (d'après Cox et Cohen, 1996).

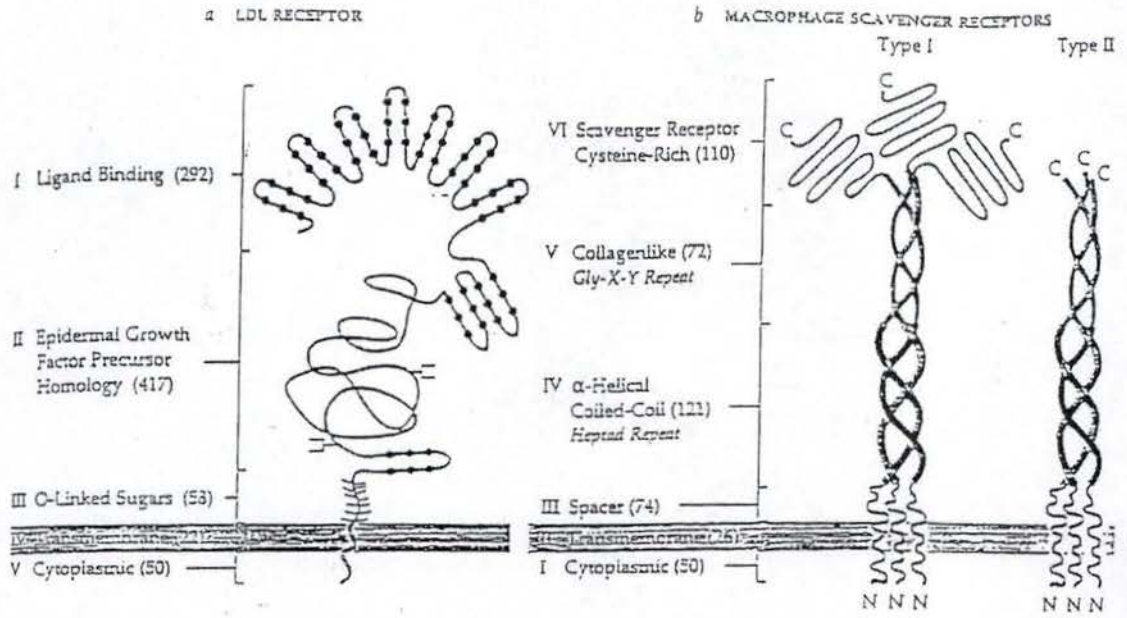


Figure 1.23 : Comparaison entre les récepteurs aux LDL natives (a) et deux types de récepteurs « scavengers » (b) (d'après Krieger, 1995).

#### 1.2.4 Les lipoprotéines oxydées.

On sait à présent que les LDL oxydées (ox-LDL) participent activement à l'apparition des lésions athéromateuses et sont responsables de la création d'un environnement oxydant propice au développement de la maladie.

##### 1.2.4.1 L'oxydation des LDL.

En cas d'hyperlipidémie, les LDL se retrouvent en taux élevé dans le sang. Grâce à leur petite taille, elles pénètrent à travers la paroi vasculaire, soit par transcytose, soit en traversant l'assise de cellules endothéliales, phénomène amplifié suite à une blessure endothéliale. Ces LDL y sont retenues par le collagène et d'autres éléments de la matrice extracellulaire sous-endothéliale. C'est là, dans l'intima que se déroule l'oxydation des LDL. En effet, contrairement au sang, ce lieu contient peu d'antioxydants et est donc propice à l'oxydation.

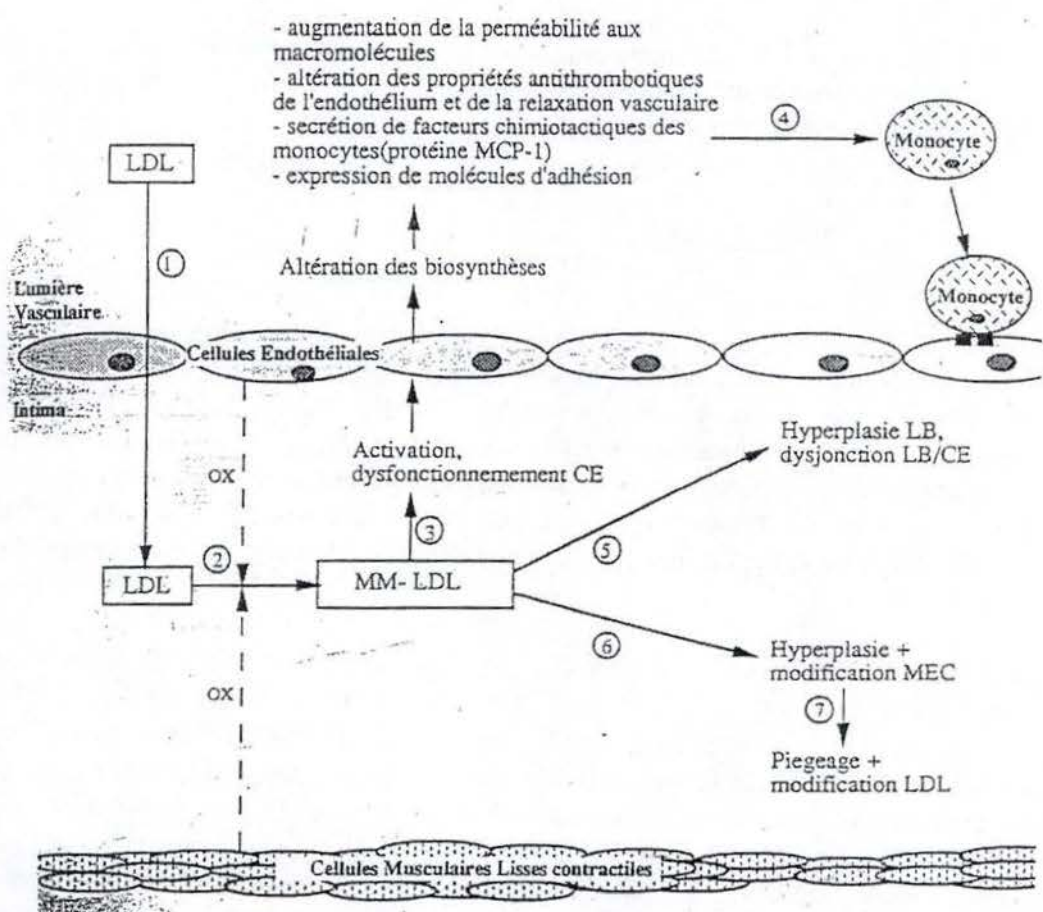
*In vitro*, cette oxydation a déjà été bien caractérisée. Sa cinétique se déroule en trois phases (Holvoet *et al.*, 1994) (pour une revue, voir Esterbauer, 1995) (*figure 1.21*) : la première consiste en la consommation progressive des antioxydants tels que la vitamine E ou les  $\beta$ -carotènes, présents dans le milieu et au sein même des lipoprotéines. C'est la phase de latence. Une fois ces antioxydants épuisés, la peroxydation des acides gras insaturés (acide arachidonique, acide linoléique,...) qui aboutit à la formation d'aldéhydes très réactionnels, est initiée. Ensuite vient une phase de propagation où ces hydroperoxydes vont amorcer l'oxydation de nouvelles lipoprotéines. On assiste donc à une amplification du phénomène. Les aldéhydes formés réagissent alors avec les groupements aminés de l'ApoB-100. Cette phase de décomposition consiste donc en la dégradation de la partie protéique de la LDL.

L'oxydation de ces LDL va tout d'abord mener à la formation de **mm-LDL** (*minimally modified LDL*). Alors que seuls les lipides de ces mm-LDL sont modifiés, les apoprotéines restent pour leur part peu altérées, permettant à l'ensemble de la lipoprotéine d'être toujours reconnue par les récepteurs à ApoB100.

Ces mm-LDL continuent à être oxydées pour devenir des **ox-LDL** (Esterbauer, 1995) (*figure 1.22*), dans lesquels les apoprotéines sont altérées et ne sont plus reconnues que par les récepteurs à ApoB-100 (Jialal *et al.*, 1996), mais par les récepteurs scavengers (*figure 1.23*). Ceux-ci sont entre autres portés par les macrophages et ne présentent aucune similitude structurale avec les récepteurs à ApoB-100 (pour une revue, voir Terpstra *et al.*, 2000).

Mais l'oxydation des LDL est un processus complexe, difficile à définir biochimiquement (Chisolm *et al.*, 2000). Parler de LDL, de mm-LDL et de ox-LDL est en fait simpliste, car l'oxydation de ces lipoprotéines est très progressive.





Rôle des MM-LDL dans la formation de l'état pré-lésionnel de la plaque d'athérome. Les LDL pénètrent dans l'intima artérielle par un phénomène de transcytose (1) puis sont oxydés (2), en particulier sous l'action des radicaux libres oxygénés produits par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Les MM-LDL ainsi formés dysrégulent les propriétés fonctionnelles des cellules endothéliales (3), ce qui permet le recrutement des monocytes circulants (4) par l'intermédiaire de la protéine MCP-1 et de molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales. Par ailleurs, les MM-LDL altèrent la structure de la lame basale (5) et induisent des modifications de la matrice extracellulaire perturbant la synthèse de certains de ses constituants par les cellules endothéliales (6). Cette matrice extracellulaire remodelée piège les LDL et facilite leur modification (7).

LDL : lipoprotéines de basse densité ; MM-LDL : *minimally modified LDL* ; CE : cellules endothéliales ; LB : lame basale ; MEC : matrice extracellulaire ; OX : oxydation ; MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*.

Figure 1.24 : Effets des mm-LDL au sein de l'intima des artères (d'après Demuth et al., 1995).

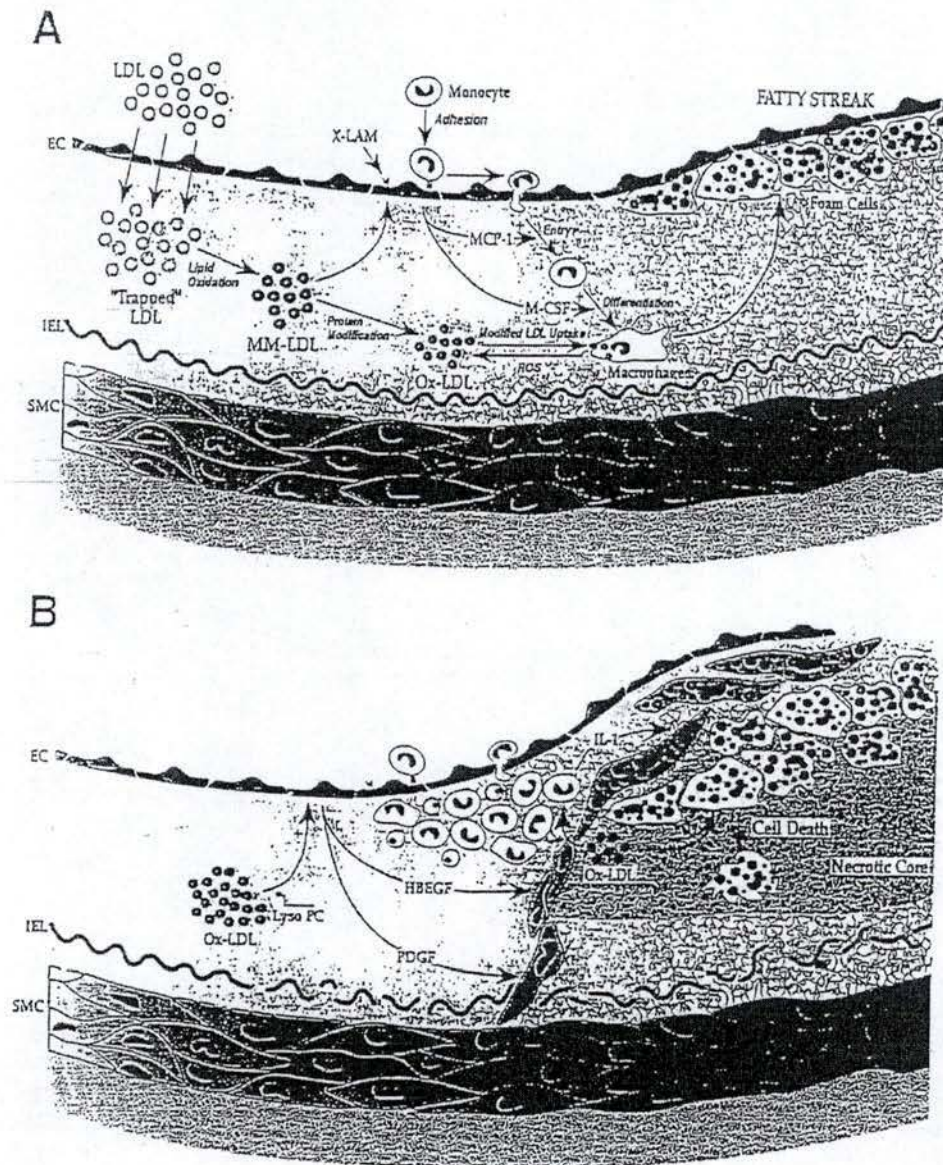


Figure 1.25 : Représentation schématique de la séquence d'événements menant à l'athérome et rôle des lipoprotéines oxydées dans ce processus. **A** : Formation de la strie lipidique : les LDL sont légèrement oxydées au niveau de l'intima et vont induire une expression accrue par les cellules endothéliales de molécules telles que MCP-1 ou M-CSF. Il s'en suit l'entrée, la prolifération et l'activation des leucocytes au sein de l'intima. Les LDL fortement oxydées vont quant à elles participer à la formation des cellules spumeuses. **B** : Formation de la plaque fibreuse : les LDL-ox et d'autres produits oxydés bioactifs vont non seulement amplifier l'activation et la prolifération des différents types cellulaires impliqués, mais aussi avoir des effets cytotoxiques menant à la formation de corps nécrotiques (d'après Berliner et Heinecke, 1996).

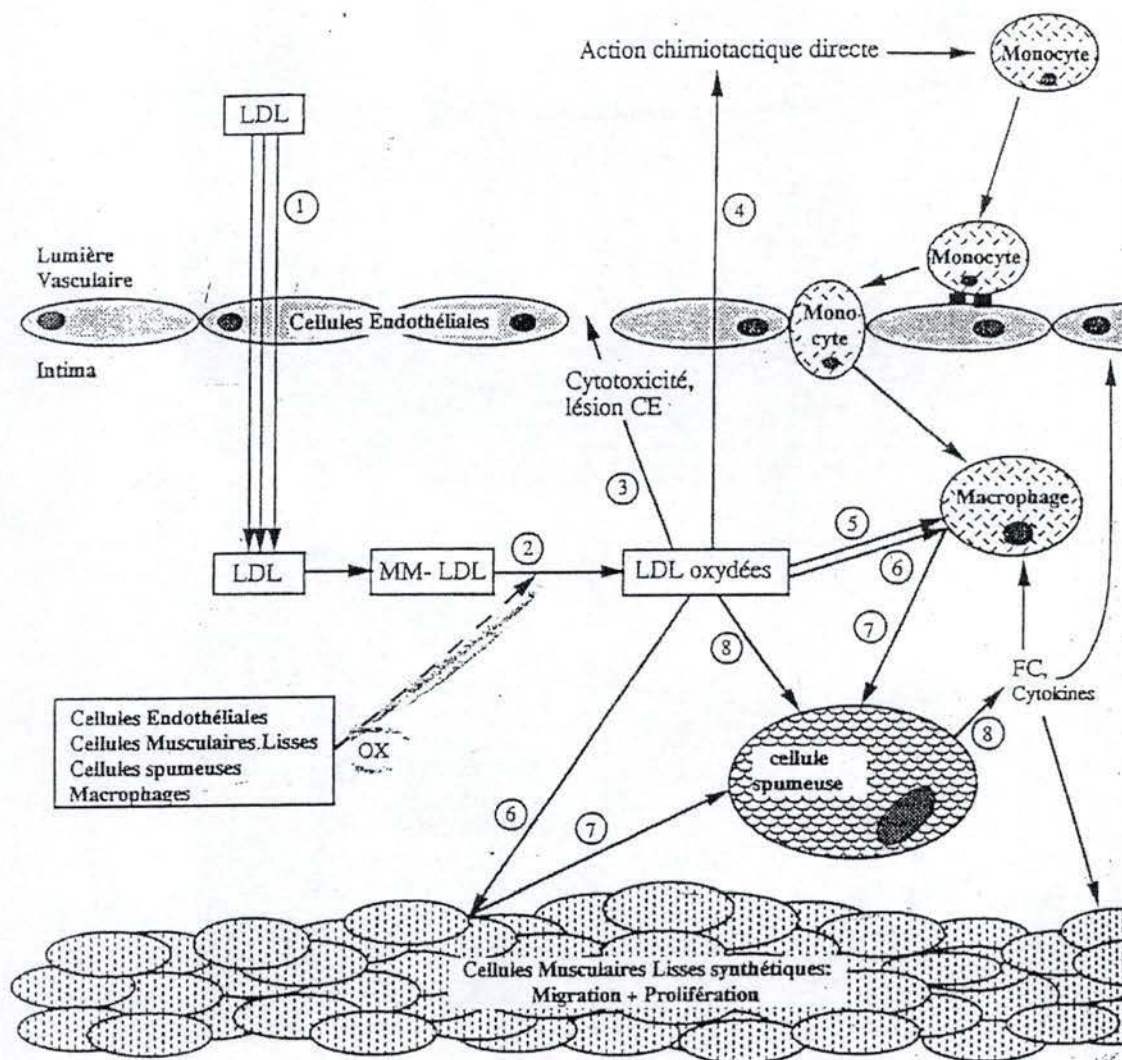


Fig 5. Rôle des LDL oxydées dans la formation de l'état lésionnel de la plaque d'athérome. Dans l'état lésionnel, en raison de l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium aux macromolécules, les LDL pénètrent intensément dans l'intima artérielle par un phénomène de transcytose (1). Elles sont ensuite modifiées en MM-LDL puis en LDL oxydées (2) par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les cellules spumeuses. Les LDL oxydées ainsi créées sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales (3), entretiennent le recrutement des monocytes circulants (4) et immobilisent les macrophages résidents (5). Ces macrophages et les cellules musculaires lisses captent les LDL oxydées par l'intermédiaire de leurs récepteurs scavenger (6) et se transforment en cellules spumeuses (7) à l'origine des stries lipidiques. Sous l'action des LDL oxydées les cellules spumeuses sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines favorisant la progression des lésions (8).

Abréviations : LDL : lipoprotéines de basse densité ; MM-LDL : *minimally modified LDL* ; CE : cellules endothéliales ; OX : oxydation ; FC : facteurs de croissance.

Figure 1.26 : Rôle des LDL et de leur oxydation dans la mise en place de la lésion athéromateuse (d'après Demuth et al., 1995).

#### 1.2.4.2 Rôle des LDL oxydées dans l'athérosclérose.

Les mm-LDL, tout comme les ox-LDL, sont largement impliquées dans le développement de la maladie. Ces deux formes sont d'ailleurs toutes deux présentes dans les lésions athéromateuses. *In vitro*, les mm-LDL ont la capacité d'activer les cellules endothéliales, tandis que les ox-LDL contribuent plutôt à la formation des cellules spumeuses et auraient un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales et les CML (Berliner *et al.*, 1995 ; Berliner *et al.*, 1996).

Le rôle de ces deux formes modifiées des LDL peut donc être résumé selon le schéma suivant :

Suite à une blessure endothéliale et/ou dans un cas d'hypercholestérolémie, les LDL pénètrent et s'accumulent dans la paroi vasculaire où elles subissent une oxydation progressive. Les premiers produits de cette oxydation, les mm-LDL, vont tout d'abord activer les cellules endothéliales. Celles-ci vont alors voir leurs fonctions s'altérer et présenter un phénotype propice à créer un contexte pro-athérogène, décrit au *chapitre 1.1.2.3*. Ce dysfonctionnement est notamment caractérisé par l'expression de molécules d'adhérence comme par exemple VCAM-1 ou de chemoattractants tels que MCP-1 (Cushing *et al.*, 1990 ; Berliner *et al.*, 1995) (*figures 1.24 et 1.25 A*).

Les mm-LDL se transforment alors progressivement en ox-LDL. Ces dernières présentent une série d'effets pro-athérogènes, différents de ceux induits par les mm-LDL et participent donc activement au développement des lésions (*figures 1.25 et 1.26*). Elles ont d'ailleurs été localisées au niveau de ces lésions via des anticorps spécifiques (Chisolm *et al.*, 2000). Les ox-LDL ont par exemple un effet chemoattractant direct sur les monocytes et les CML. Elles exercent également une action cytotoxique sur les CML, menant à la formation du corps nécrotique. Enfin, elles sont reconnues par les récepteurs scavengers portés par les monocytes. Ceux-ci les internalisent alors pour se différencier en cellules spumeuses (Berliner *et al.*, 1995 ; Berliner *et al.*, 1996). Certaines cellules spumeuses dérivent des CML.

#### 1.2.4.3 Les lipides bioactifs.

Les LDL oxydées ne constituent pas une entité homogène. Elles peuvent contenir des produits provenant tant de la peroxydation ou de la fragmentation des lipides, que de la modification ou de la dégradation de l'ApoB100 (*figure 1.21*).

On peut citer, parmi ces réactions, l'autooxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) suite à l'attaque de radicaux libres (Hall, 1996). On assiste, tout au long de cette oxydation, à une série de réactions en cascades, menant à la formation de composés extrêmement instables présentant une tendance à se dégrader rapidement en une série de produits intermédiaires très réactifs.

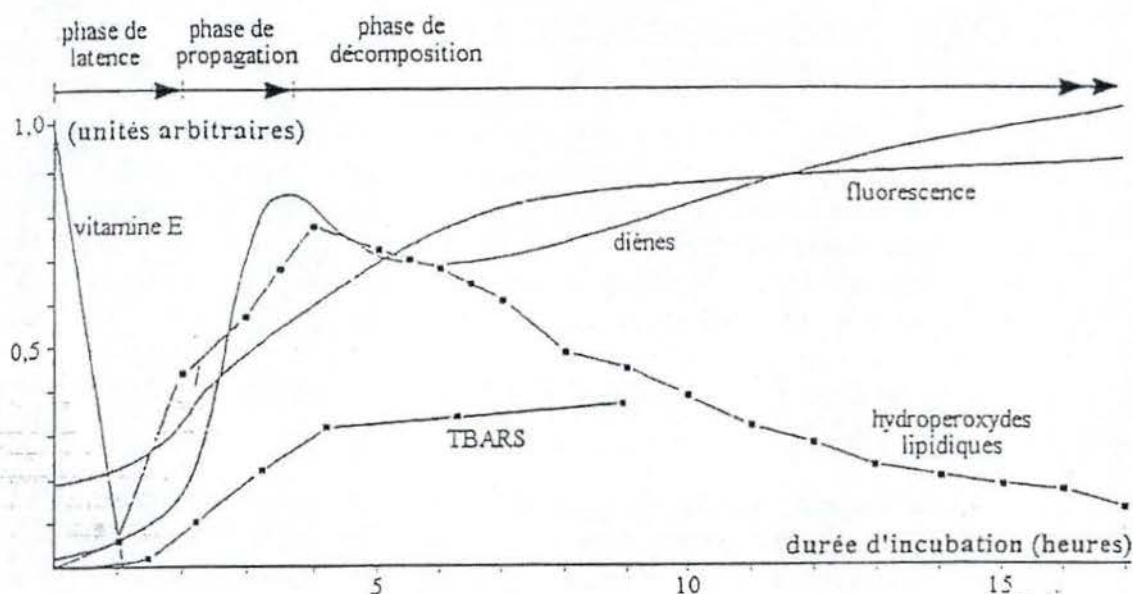


Figure 1.27 : Cinétique de l'oxydation des LDL par l'ion cuivrique où l'on suit la perte en vitamine E, et la production d'hydroperoxydes lipidiques, de diènes conjugués et de TBARS (d'après Esterbauer, 1992).

Table 1. List of Bioactive Oxidized Phospholipids

Oxidized phospholipid	Biological effects
Ox-PAPC	Induction of endothelial cells to bind monocytes [14]; monocyte chemotaxis [4,11]; inhibition of LPS-induced E-Selectin expression, CS-1 expression [55]. Blocked uptake of Ox-LDL by macrophages [56]. Recognized by monoclonal antibodies [14].
POVPC	Induction of endothelial cells to bind monocytes [14]; induce smooth muscle cell proliferation [57]; monocyte chemotaxis (unpublished results), CS-1 expression, inhibition of LPS-induced E-Selectin expression, induction of chloride current in CFTR-expressing oocytes [55]; monocyte binding blocked by WEB 2086 [54]. Blocked uptake of Ox-LDL by macrophages [56]. Recognized by monoclonal antibodies [14].
POVPC-BSA adducts	Blocked uptake of Ox-LDL by macrophages [56,58]. Prevents phagocytosis of apoptotic cells by elicited macrophages [59].
PONPC	Recognized by monoclonal antibodies: modify peptides and proteins [60].
PGPC	Induction of endothelial cells to bind monocytes [14]; monocyte chemotaxis (unpublished results), E-Selectin expression, neutrophil binding, induction of chloride current in frog oocytes [55].
PEIPC	Induction of endothelial cells to bind monocytes [14,35]; monocyte chemotaxis (unpublished results); monocyte binding blocked by WEB 2086 [54].
PAF	Platelet aggregation, anti-hypertensive, endotoxin shock, neutrophil activation, PAF receptor activation [61-63].
PAF-like ether lipids	Platelet aggregation [64], leukocyte activation [65], stimulate $Ca^{2+}$ transients [64] and $\gamma$ -interferon secretion from human monocytes [66], induce $^3H$ -thymidine incorporation into SMC [57]. Cytotoxic: induces cell lysis [67].
Lyso-PC	Monocyte chemotaxis [68], suppression of endothelium-dependent vasorelaxation [69], induction of VCAM-1 and ICAM-1 expression by EC [70]. Induction of VEGF by monocytic cells [71].
LPA	Platelet aggregation [24]; induction of endothelial cell permeability [72]; monocyte chemotaxis [73]; activate endothelial cells to bind monocytes, neutrophils, HLS0 [74]. Induces VCAM-1 and E-Selectin expression [74].

Figure 1.28 : Liste de phospholipides bioactifs présents dans les ox-LDL, avec leurs propriétés (d'après Subanagounder et al., 1999).

Les plus importants sont les aldéhydes, détectés sous la forme de *thiobarbituric acid-reacting substances* (TBARS), les diènes conjugués, les oxystérols et les isoprostanes. L'ensemble de ces produits peuvent constituer de bons marqueurs du niveau d'oxydation des lipoprotéines (Meagher *et al.*, 2000) (*figure 1.27*).

Mais des analyses plus fines faisant appel à la spectrométrie de masse, ont permis de préciser la nature des acides gras et phospholipides que l'on trouve au sein des ox-LDL et d'en identifier un certain nombre qui se sont révélés bioactifs sur les monocytes, les cellules endothéliales, les CML et l'agrégation des plaquettes (Subbanagounder *et al.*, 2000) (*figure 1.28*).

Parmi ces lipides oxydés, on a également décrit les isoprostanes, formes oxydées d'éicosanoïdes. Ces molécules pourraient présenter des effets cytotoxiques sur les cellules endothéliales et affecter ces dernières, créant ainsi des conditions pro-athérogènes.

### 1.3 Les isoprostanes et l'isoprostane 8-iso-PGF2 $\alpha$ .

#### 1.3.1 Le métabolisme des isoprostanes.

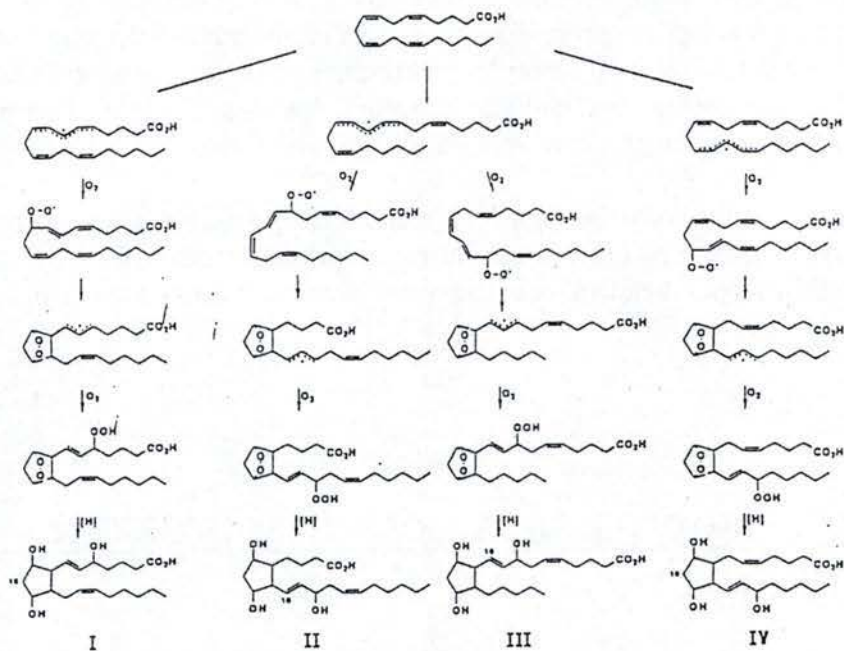
La génération des isoprostanes à partir de l'autooxydation des PUFA, et en particulier de l'acide arachidonique, fut démontrée pour la première fois *in vitro* par Pryor et Porter il y a environ 25 ans. En 1990, Morrow *et al.* prouvèrent à leur tour l'existence et la production *in vivo* de ces produits chez l'Homme (Pour une revue, voir Morrow *et al.*, 1996).

Les isoprostanes sont des isomères dits *prostaglandin-like*. En effet, tout comme les prostaglandines, les isoprostanes sont produits à partir des phospholipides membranaires. La formation de ces deux types de lipides divergent cependant l'un de l'autre.

L'acide arachidonique, acide gras contenu dans les phospholipides membranaires, est libéré grâce à une phospholipase A2 (PLA2). Il est ensuite cyclisé en prostaglandines sous l'action des cyclooxygénases.

Les isoprostanes sont quant à eux produits *in situ*, c'est à dire à partir d'acide arachidonique ou d'autres types d'acides gras encore estérifiés et donc toujours associés aux phospholipides des membranes. Ils peuvent alors s'y accumuler jusqu'à leur libération dans la circulation sanguine sous l'action des PLA2 (pour une revue, voir Pratico, 1999).

La peroxydation de l'acide arachidonique en présence d'oxygène mène tout d'abord à la production de bicycloendoperoxydes intermédiaires. Ces molécules sont alors réduites en F<sub>2</sub>-isoprostanes. Selon la position du radical peroxy sur l'acide



Mechanism of formation of the F<sub>2</sub>-IsoPs. This pathway leads the formation of four regioisomers (I-IV).

Figure 1.29 : Mécanisme de formation des F<sub>2</sub>-isoprostanes (d'après Roberts et Morrow, 1997).

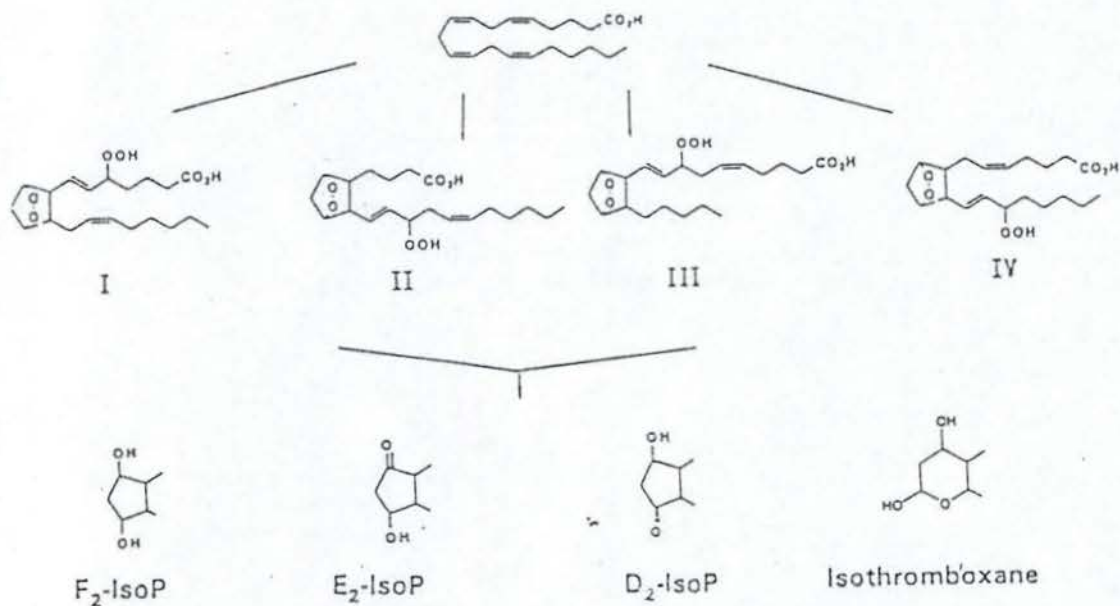


Fig. 2. Potential fates of the bicycloendoperoxide intermediates of the isoprostanes (I-IV) derived from the peroxidation of arachidonic acid. The endoperoxides can either undergo reduction to  $\text{F}_2\text{-IsoPs}$  or rearrangement to  $\text{E}_2/\text{D}_2\text{-IsoPs}$  and isothromboxanes.

Figure 1.30 : Formation des différents types d'isoprostanes à partir de l'acide arachidonique (d'après Roberts II et Morrow, 1997).



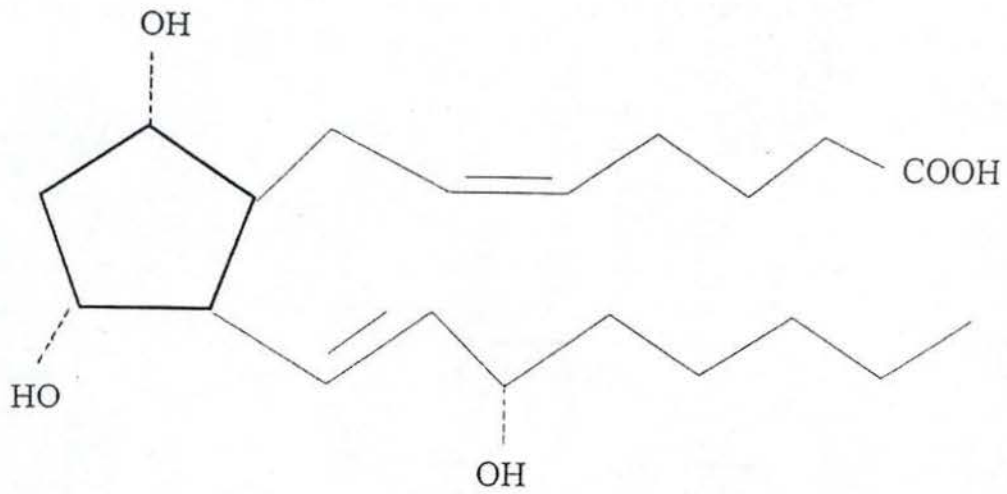


Figure 1.31 : Structure de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

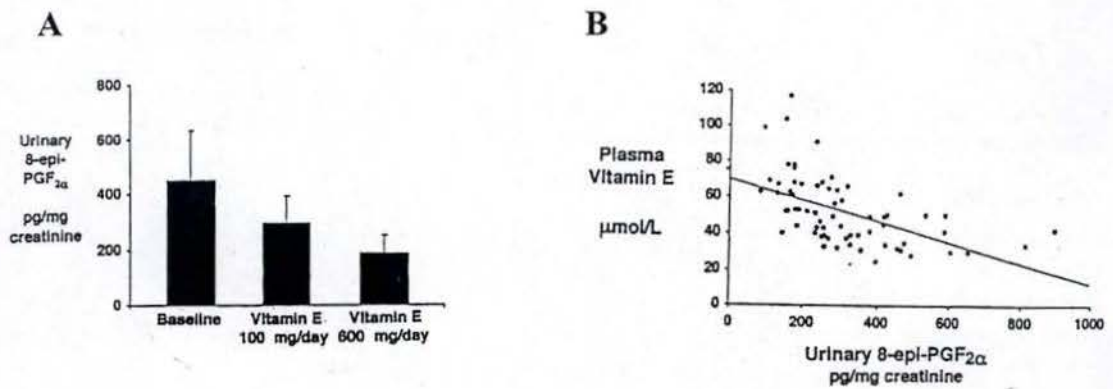


Figure 1.32 : A : Effet de la supplémentation en vitamine E (antioxydant) sur l'excrétion du 8-epi-PGF<sub>2α</sub> dans les urines (d'après Davi et al., 1997). B : Corrélation entre le taux d'isoprostane-8 dans les urines et la concentration plasmatique en vitamine E (d'après Davi et al., 1997).

arachidonique, quatre régio-isomères sont formés : les F<sub>2</sub>-isoprostanes de classe I à IV (*figure 1.29*). Mais les endoperoxydes intermédiaires peuvent également se réarranger pour donner des E<sub>2</sub>-isoprostanes, des D<sub>2</sub>-isoprostanes et des isothromboxanes (*figure 1.30*).

Les isoprostanes plus étudiés sont les F<sub>2</sub>-isoprostanes.

Parmi ceux-ci, un isomère fait l'objet de recherches plus poussées dans le cadre de l'athérosclérose. Il s'agit de l'**isoprostane 8-iso PGF<sub>2α</sub>** (8-iso-PGF<sub>2α</sub> ou 8-epi-PGF<sub>2α</sub>), que l'on soupçonne de plus en plus comme étant un agent pro-athérogène potentiel et dont la structure est donnée à la *figure 1.31*.

Il circule dans le plasma et est excrété dans les urines, ce qui en permet une détection très aisée et fait de lui un très bon marqueur de la peroxydation des lipides et donc du stress oxydatif *in vivo* (Davi *et al.*, 1997).

Son excrétion par les urines diminue d'ailleurs suite à une supplémentation en antioxydants tels que la vitamine E (Sarabi *et al.*, 1999) (*figure 1.32*) et augmente considérablement chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (Davi *et al.*, 1997) (*figure 1.33*) ou chez des fumeurs (Morrow *et al.*, 1995) (*figure 1.34*).

Dans ces deux cas, la quantité d'isoprostane-8 varie également en fonction de l'âge et du sexe. De plus, on le rencontre en grande quantité dans les lésions athérosclérotiques. Cette présence suscite donc le plus vif intérêt au sujet de cette molécule dans le cadre des recherches portant sur l'athérosclérose.

### 1.3.2 Fonctions biologiques de l'isoprostane 8-iso PGF<sub>2α</sub>

Peu de choses sont encore connues à propos de son mode d'action. Voici cependant quelques actions biologiques qu'exercent le 8-iso PGF<sub>2α</sub> sur les différents types cellulaires présents au niveau des lésions vasculaires :

Déecté dans les lésions athéromateuses (Gniwotta *et al.*, 1997), l'isoprostane-8 constitue tout d'abord un vasoconstricteur puissant. Il exerce cet effet sur les artères en induisant, d'une part, la diminution de la production de NO au niveau des cellules endothéliales (Minuz *et al.*, 1998) et d'autre part la libération d'endothéline-1 par ces mêmes cellules (Fukunaga *et al.*, 1995). Il possède également une action mitogène sur les CML.

Il provoque l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (*figure 1.35*), et cela indépendamment de l'expression de VCAM-1 et des sélectines endothéliales, molécules d'adhérences généralement exprimées suite à l'activation du facteur de transcription NFκB (Leitinger *et al.*, 2001).

Il est également responsable de l'activation et de l'agrégation des plaquettes (Minuz *et al.*, 1998 ; Leitinger *et al.*, 1997).

Si les effets pro-athérogènes de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sont maintenant généralement admis, son mode d'action reste plus controversé.

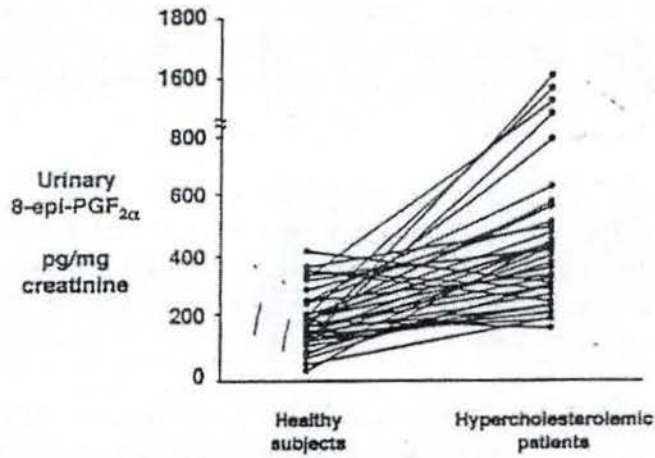


FIG 1. Urinary excretion of 8-epi-PG  $F_{2\alpha}$  in patients with hypercholesterolemia and in healthy subjects. The dots representing hypercholesterolemic patients are connected to a dot representing a healthy subject matched to the patient for age and sex. Each dot represents the average of two consecutive measurements.

Figure 1.33 : Conséquence de l'hypercholestérolémie sur l'excrétion d'isoprostane-8 dans les urines chez des patients hypercholestérolémiques et chez des sujets sains (d'après G. Davi et al., 1997).

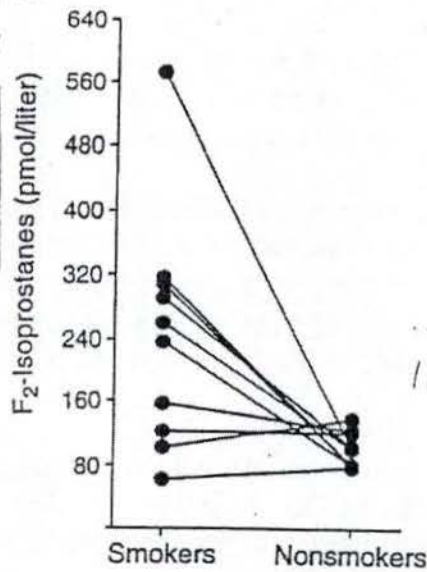


Figure 1.34 : Comparaison des taux plasmatiques en isoprostane-8 chez des fumeurs et des non fumeurs (d'après Morrow et al., 1995).

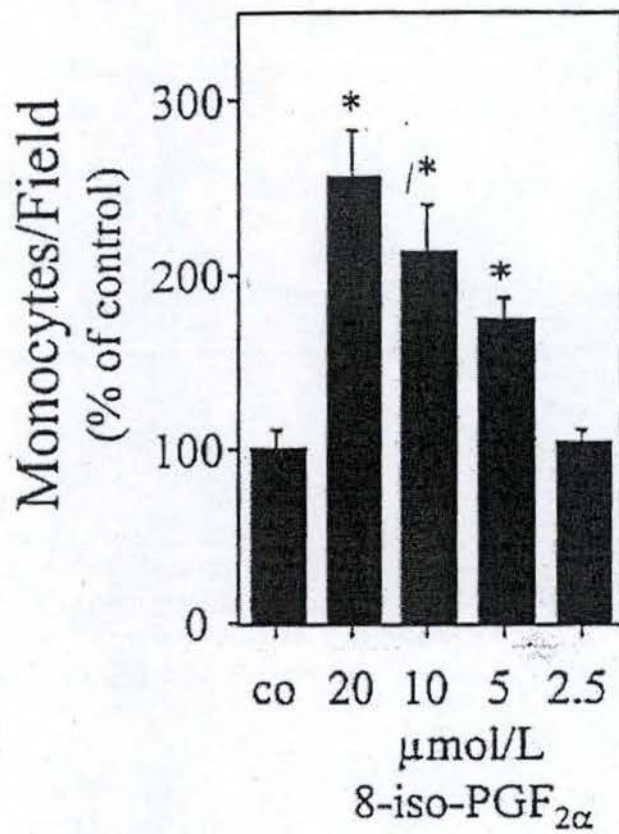


Figure 1.35 : Effets dose-dépendants de l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (d'après Leitinger et al., 2001).

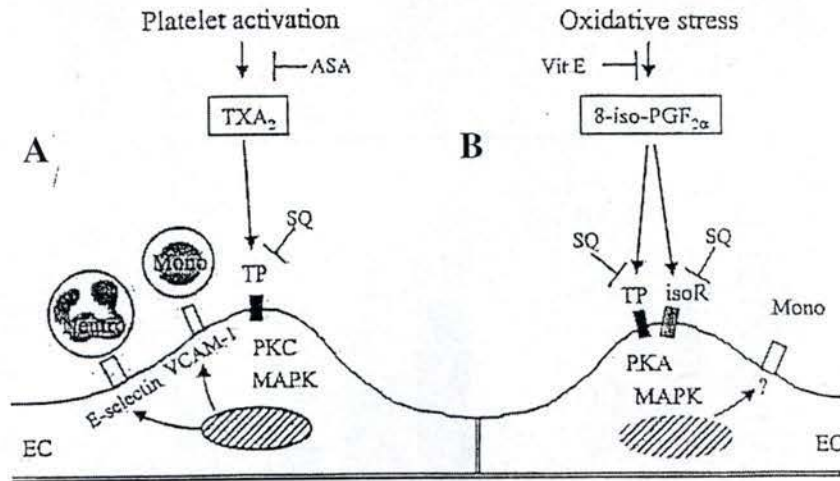


Figure 1.36 : Représentation schématique des différents mécanismes d'activation des cellules endothéliales, par la thromboxane A<sub>2</sub> (A) et l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (B). TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>; SQ (SQ29548) : antagoniste du récepteur au thromboxane; TP : récepteur au thromboxane; isoR : récepteur spécifique à l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (d'après Leitinger et al., 2001).

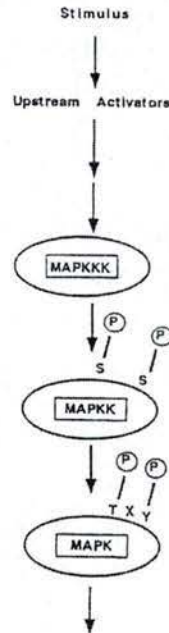


Fig. 1. MAP Kinases are generally activated by a conserved type of signaling pathway. MAP Kinases are activated by phosphorylation on threonine and tyrosine residues by dual specificity MAP Kinase Kinases. MAP Kinase Kinases comprise a conserved group that are activated by phosphorylation on conserved serine and/or threonine residues, by MAP Kinase Kinase Kinases. This latter group of kinases are regulated by other protein kinases and GTP binding proteins in response to a stimulus.

Figure 1.37: Représentation schématique des mécanismes partagés par les différentes cascades de phosphorylation des MAPK (d'après Minden et Karin, 1997).

### 1.3.3 Mécanismes d'action de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

Si l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> exerce réellement un quelconque effet sur ces différents types cellulaires, il est fort probable qu'il exerce son effet par la reconnaissance d'un récepteur membranaire, par une ou plusieurs voies de transduction du signal et par l'activation de certains facteurs de transcription. Nous allons donc faire le point sur ce qui est connu à ce sujet.

#### 1.3.3.1 Les récepteurs membranaires de l'isoprostane 8-iso PGF<sub>2α</sub>.

On a d'abord pensé que l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> se liait, du moins sur les CML, au récepteur au thromboxane. En effet, le SQ29548, antagoniste bien connu de ce récepteur, inhibe les effets vasoconstricteurs de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Mais il s'est avéré que pour déplacer cet antagoniste du récepteur au thromboxane, il fallait des concentrations en isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> de loin supérieures à celles requises pour obtenir l'effet vasoconstricteur.

Des études de *binding* avec de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> marqué suggèrent également l'existence de sites de liaison à basse affinité ainsi que des sites à haute affinité. De nombreux auteurs pensent que les sites à basse affinité pourraient être les récepteurs au thromboxane, tandis que ceux à haute affinité seraient des récepteurs spécifiques aux isoprostanes, mais qui restent encore à identifier (pour une revue, voir Roberts *et al.*, 1997).

Plus récemment, Leitinger *et al.* (2001) ont testé les effets de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur des cellules endothéliales en culture. Ils ont à nouveau démontré que le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> activait la cellule endothéliale via le récepteur au thromboxane : le TP. En effet, un agoniste de ce récepteur, U46619, induit, tout comme le 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales et les effets de ces deux molécules sont bloqués par l'antagoniste SQ29548.

Cependant, le U46619 et le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> n'ont pas tout à fait les mêmes effets sur les cellules endothéliales. Par exemple, le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> n'induit que l'adhérence des monocytes par des mécanismes encore non définis, alors que le U46619 induit également l'adhérence des neutrophiles via l'expression de VCAM-1 et de la E-sélectine. D'autre part, l'adhérence des monocytes passe par l'activation de la PKC et de la p38<sup>MAPK</sup> dans le cas de l'agoniste U46619, mais par la PKA, la p38 et la p42/p44 pour 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

Ces résultats peuvent s'expliquer par deux mécanismes alternatifs : l'action du l'8-iso-PGF<sub>2α</sub> pourrait passer, soit par un récepteur spécifique du 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, semblable mais distinct du récepteur au thromboxane, soit par une isoforme de ce récepteur TP, pour lequel les protéines G activées seraient différentes. La *figure 1.36* récapitule les données expérimentales obtenues par Leitinger *et al.* (2001) sur des cellules endothéliales. Ces auteurs ont travaillé sur des cellules endothéliales HUVEC et HAEC. Comme on peut le constater, de nombreuses questions restent encore sans réponse en ce qui concerne les voies moléculaires d'activation par le 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

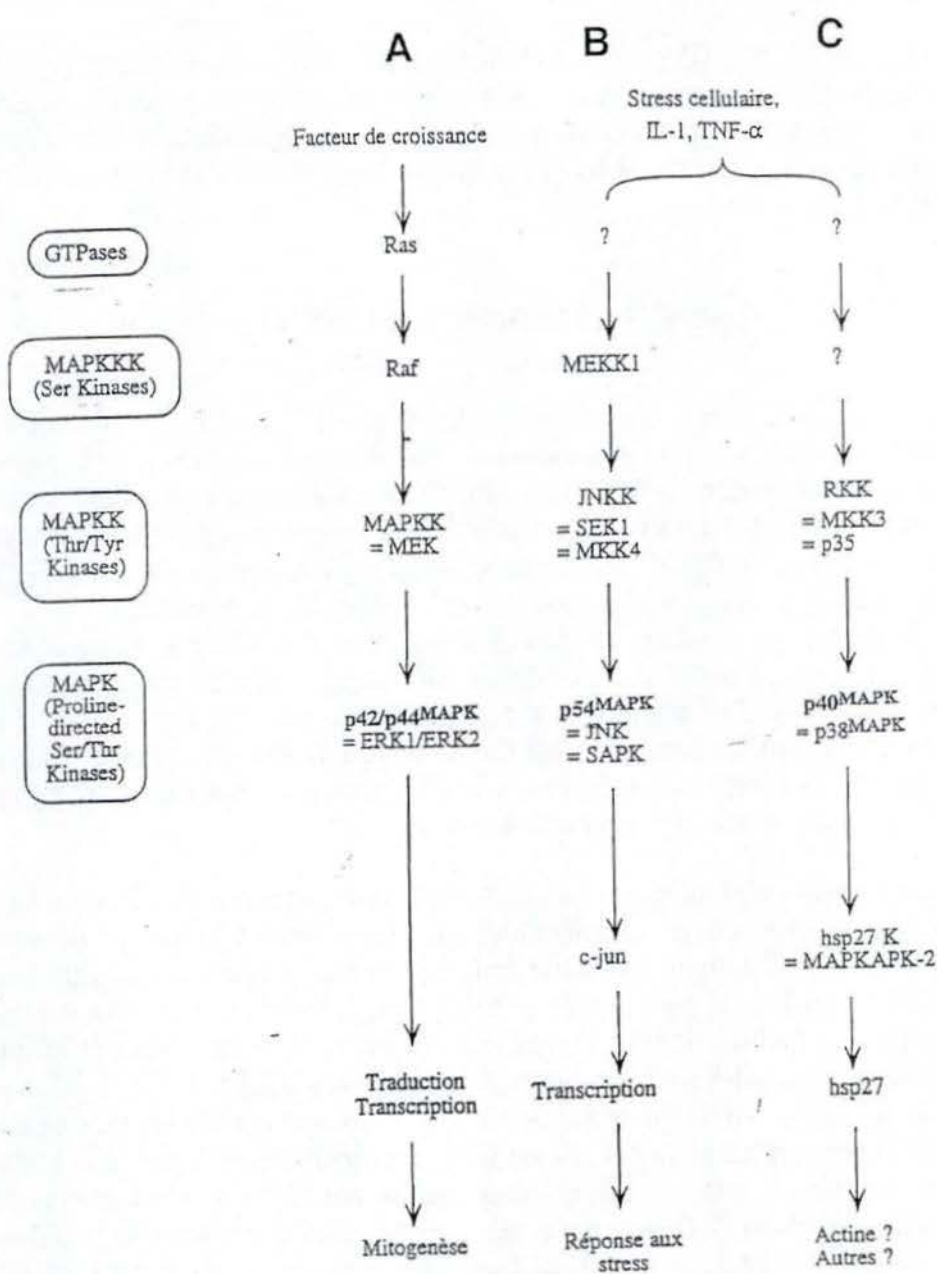


Figure 1.38 : Cascades d'activation des trois types de MAPK. A : Voie de ERK1/ERK2. B : Voie de JNK. C : Voie de la p38 MAPK (Renard et al., 1997).

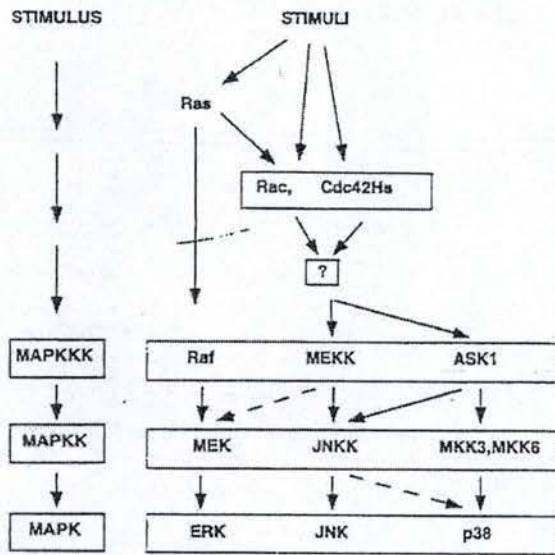


Fig. 3. ERKs are activated by a variety of stimuli including the phorbol ester TPA, and growth factors such as EGF, NGF, and PDGF. JNK is also activated by growth factors, as well as by other stimuli including  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, osmotic stress, UV irradiation, and various stimuli that activate heterotrimeric G protein coupled receptors. p38, which was identified as a kinase that is activated by lipopolysaccharide (LPS), is activated by many of the stimuli that activate JNK. JNK is activated by both Ha-Ras dependent pathways in response to growth factors such as EGF, and by Ha-Ras independent pathways in response to the cytokines  $\text{TNF}\alpha$  and IL-1. While some stimuli operate through Rac or Cdc42Hs, other may operate by Rac/Cdc42Hs independent mechanisms. Finally, a number of other signaling enzymes have been identified, which can activate the ERK, JNK and p38 pathways. Some of these signaling enzymes are described in the text, but are not illustrated here.

Figure 1.39 : Interactions entre les trois voies des MAPK majeures (d'après Minden et Karin, 1997).



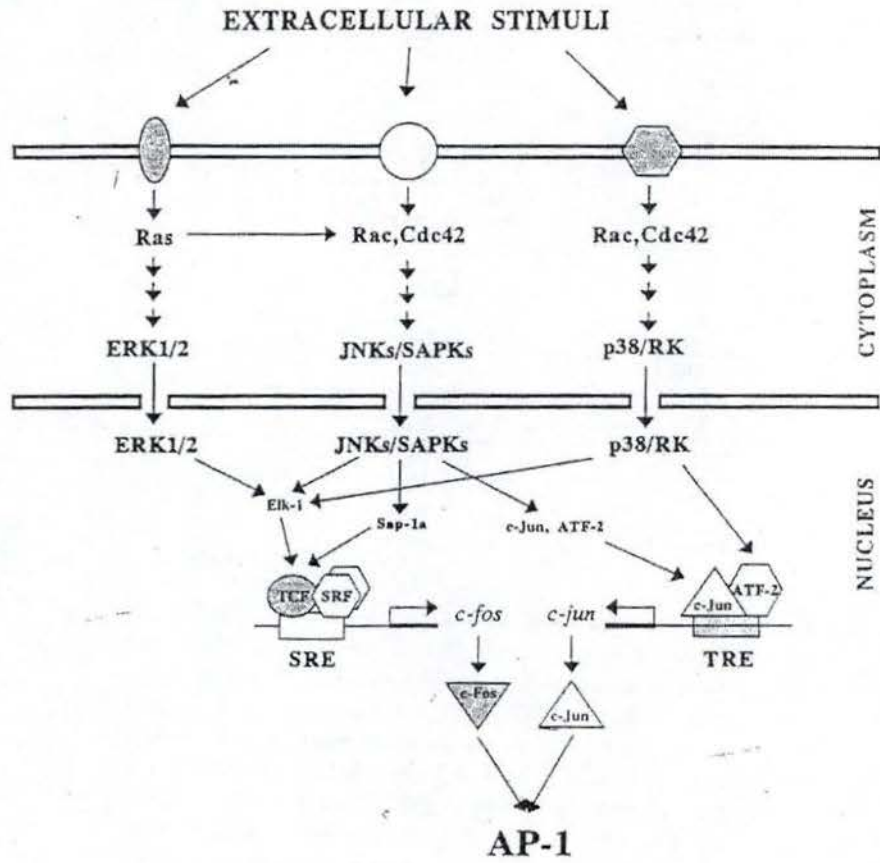


Figure 1.40 : Représentation de la voie de transduction du signal aboutissant à l'activation du facteur de transcription AP-1, via l'activation des MAPK et la synthèse des monomères c-jun et c-fos (d'après Gómez del Arco et al., 1997).

### 1.3.3.2 Voies des MAPK.

On décrit actuellement trois cascades principales distinctes, mais parallèles de « mitogen-activated protein kinases », caractérisées toutes les trois par une séquence de trois kinases qui se succèdent : les MAPKKK, les MAPKK et les MAPK qui, en aval, phosphorylent des facteurs transcriptionnels (*figure 1.37*). Les voies se distinguent entre elles notamment par la nature des stimuli qui les déclenchent :

- La première voie est celle des MAPK p42/p44 également appelées ERK1/ERK2 (Extracellular Regulated Kinases), enclenchée principalement par des facteurs de croissance tels que le PDGF, l'insuline ou encore des facteurs mitogènes. Ces p42/p44<sup>MAPK</sup> activent des facteurs transcriptionnels induisant entre autres l'expression de gènes impliqués dans la mitogenèse. (*figure 1.38 A*)
- La seconde voie décrite, celle de la p54<sup>MAPK</sup> (ou JNK, Jun-NH2 terminal protein kinase), est activée par exemple par les rayons UV et par de nombreux autres stress. (*figure 1.38 B*)
- Enfin, la troisième, celle de la p38<sup>MAPK</sup>, répond particulièrement bien aux stimulations par l'IL-1 et le TNF $\alpha$ . Cette voie joue un rôle essentiel dans la régulation des processus inflammatoires, dans la différenciation, la croissance et la mort cellulaire. (*figure 1.38 C*)

Ces trois voies ne sont pas indépendantes les unes des autres. En effet, on observe des « cross-talk », c'est à dire des interactions entre ces différentes voies de signalisation (Minden *et al.*, 1997). (*figure 1.39*)

### 1.3.3.3 Activation des facteurs de transcription.

#### **Le facteur de transcription AP-1.**

C'est en aval de cette voie de transduction du signal que se trouve le facteur de transcription AP-1 (Karin *et al.*, 1997).

Ce dernier est sous forme d'un homo ou d'un hétérodimère de protéines appartenant à deux familles : les protéines Fos et Jun, avec par exemple l'hétérodimère c-fos - c-jun (Karin *et al.*, 1997).

Dans une cellule au repos, AP-1 est phosphorylé de manière constitutive par la GSK3 (Glycogène Synthase Kinase 3), et cela au niveau de ses domaines de liaison à l'ADN, ce qui l'empêche de s'y fixer.

Par contre, lorsque la cellule est stimulée, GSK3 est inhibée et la PKC active une phosphatase qui enlève ces groupements phosphate. Pour devenir actif, AP-1 doit encore être phosphorylé au niveau de deux sérines sur le domaine de transactivation de chaque sous-unité. Cette phosphorylation est réalisée par une MAP Kinase (*figure 1.40*).

En temps normal, c-Jun et c-Fos ont un temps de demi-vie très court et sont rapidement dégradés par le protéasome. Il faut donc induire leur expression :

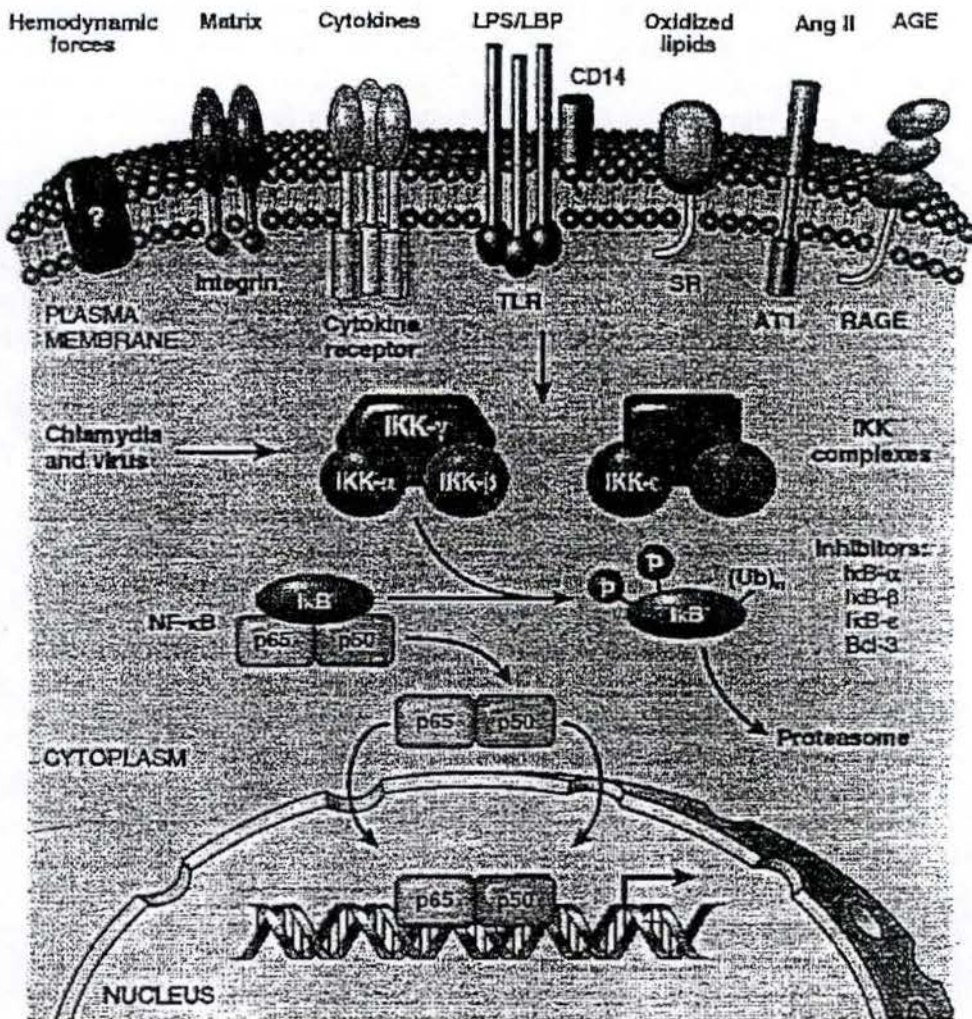


Figure 1.41 : Représentation de la voie de transduction du signal aboutissant à l'activation du facteur de transcription NFκB (d'après Collins et Cybulsky, 2001).

- La transcription du gène codant pour c-Fos nécessite la présence de la protéine SRF (Serum Response Factor) qui recrute Elk-1, phosphorylée par les MAPK en présence de sérum et de facteurs de croissance. Cette production de c-Fos a lieu en une dizaine de minutes seulement.
- Pour induire l'expression de c-Jun, la participation de AP-1 est requise. Ce dernier est présent de manière constitutive dans le noyau, en faible quantité, certes, mais son activation va permettre la production de nouveaux monomères. On assiste donc à une boucle de rétroaction positive.

Comme les résultats de Zhu *et al.* (1998) l'ont montré, on assiste donc à une induction biphasique de AP-1 : le premier pic correspond à l'activation des dimères préexistants, tandis que le second pic correspond à la production de nouvelles sous-unités.

Enfin, l'activation du facteur de transcription est induite par des facteurs de croissance et autres facteurs mitogéniques, mais également en présence de LDL oxydées. Effectivement, les travaux de Ares *et al.* (1995) ont prouvé que la lysophosphatidylcholine, produit de l'oxydation des LDL, stimulait AP-1 de manière dose-dépendante.

AP-1 contrôle ainsi la croissance et la différenciation des cellules endothéliales et des CML et induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans le processus d'athérosclérose, comme, par exemple, ICAM-1, VCAM-1 (Wang *et al.*, 1999) ou encore MCP-1 (Korenaga *et al.*, 1997). AP-1 provoque également, chez ces mêmes cellules, la production de nouveaux facteurs de croissance, menant donc à un phénomène d'amplification.

### Le facteur de transcription NFκB.

De nouveau, ce facteur de transcription est un dimère composé de sous-unités différentes : les plus courantes sont p50 et p65. Les deux sous-unités font office de site de liaison à l'ADN, mais seule p65 possède un domaine de transactivation.

En temps normal, NFκB est retenu dans le cytoplasme par son inhibiteur IκB, qui se fixe au facteur au niveau de son site NLS, empêchant ainsi sa migration vers le noyau. Dans une cellule stimulée, le complexe de kinases IKK est activé et peut ainsi phosphoryler IκB, qui est, par conséquent, polyubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Cela permet la libération de NFκB et sa translocation vers le noyau, où il pourra enfin jouer son rôle de facteur de transcription (Collins, 1993) (*figure 1.41*).

En accord avec les travaux de Brand *et al.* en 1996, NFκB est un facteur de transcription qu'on peut qualifier de polyvalent dans le sens où il peut induire et être induit par toute une série de facteurs :

En effet, il est activé par les cytokines pro-inflammatoires et en particulier IL-1 et TNFα, mais également par les rayons UV, des vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II (Collins *et al.*, 2001), les LPS, les radicaux libres ou encore des lipoprotéines athérogènes comme les ox-LDL ou les βVLDL (Dichtl *et al.*, 1999).

Une fois dans le noyau, il induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'athérosclérose, codant notamment pour IL-1, TNFα, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, TF (Facteur Tissulaire) ou encore VCAM-1. (*figure 1.42*)

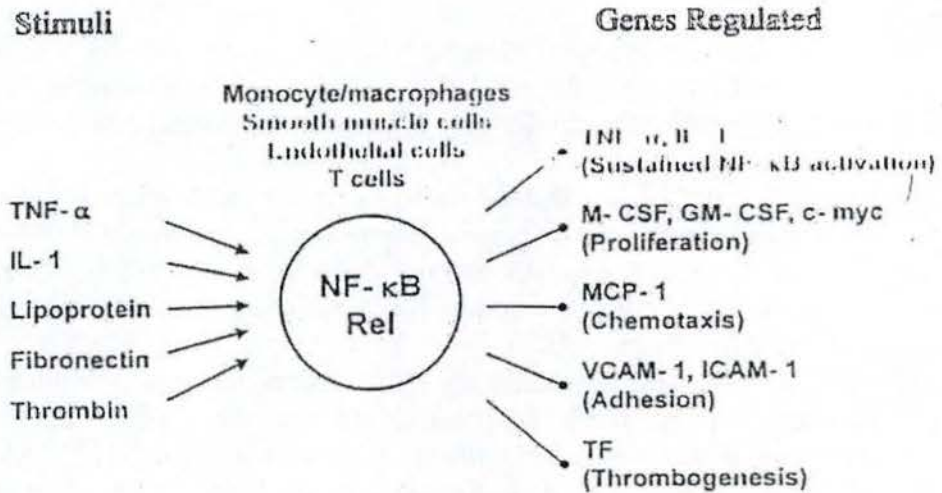


Figure 1.42 : Schéma illustrant l'implication de l'activation du facteur de transcription NFκB dans le processus pathologique de l'athérosclérose. A gauche, une série de stimuli activateurs de ce facteur de transcription sur de nombreux types cellulaires. A droite, les gènes régulés par ce facteur de transcription et susceptibles de jouer un rôle dans l'athérogenèse (d'après Brand et al., 1996).

On note ici encore l'existence d'un feed-back positif : IL-1 et le TNF $\alpha$  activent NF $\kappa$ B, qui induit alors l'expression de ces mêmes cytokines, qui, par une action paracrine, provoquent à leur tour l'activation de ce même facteur chez les cellules voisines.

Cette activité fut décelée non seulement chez les cellules endothéliales, mais également chez les monocytes ou macrophages et chez les CML, trois types cellulaires jouant un rôle clé dans l'athérogenèse (Brand *et al.*, 1996).

## 1.4 Objectifs du mémoire.

C'est sur la cellule endothéliale, impliquée, comme nous l'avons vu, dans de nombreux processus physiopathologiques, que portera ce mémoire. L'étude de cet acteur cellulaire sera bien sûr réalisée avec pour toile de fond l'athérosclérose, maladie cardiovasculaire qui constitue la thématique principale du programme PAI auquel est associé l'URBC.

L'isoprostane-8 constituera la molécule d'intérêt de ce travail. Cette molécule a d'abord été identifiée comme marqueur de stress oxydatif et de peroxydation lipidique *in vivo*. Elle augmente également au niveau des LDL oxydées ainsi qu'au niveau des lésions vasculaires, du plasma et des urines de patients hypercholestérolémiques.

En outre, elle semble exercer plusieurs activités biologiques, telles que la vasoconstriction, l'agrégation des plaquettes,... qui la rangent parmi les agents pro-athérogènes. Plus récemment, Leitinger *et al.* (2001) ont montré qu'elle favorisait l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales, ce qui confirme ses propriétés pro-athérogènes. Mais l'étude des effets de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur les cellules endothéliales ne fait que commencer et les mécanismes d'action de cette molécule sont loin d'être bien établis.

En URBC, nous essayons de comprendre sur un modèle de cellules endothéliales humaines, dérivées de cordon ombilical (HUVEC-C, disponibles à l'ATCC), à la fois les effets de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur l'expression des cellules endothéliales (mémoire de Cindy Gustin) et les voies de signalisation, du récepteur aux facteurs de transcription.

C'est à ce deuxième volet que sera consacré ce mémoire.

Nous avons donc voulu vérifier si l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> était bien capable d'activer les cellules endothéliales et ce en analysant plus particulièrement leur capacité d'immobiliser les monocytes à leur surface et leur capacité à produire du MCP-1, molécule chémoattractante pour les monocytes.

L'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> se révélant bien capable d'activer le modèle de cellules endothéliales utilisé, nous avons essayé de décortiquer les voies de signalisation empruntées par cette molécule, en partant des facteurs de transcription (NFκB et AP-1), aux kinases en amont, et plus particulièrement certaines MAPK. Celles-ci ont été étudiées par tests ELISA et par immunocytochimie combinée à la microscopie confocale. Enfin, nous avons eu recours à des inhibiteurs spécifiques de kinases et à un antagoniste des récepteurs au thromboxane, pour voir dans quelle mesure les réponses induites par l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> pouvaient être affectées par ces molécules.

---

## 2 Matériels et méthodes.

---



## 2.1 Culture cellulaire

### 2.1.1 Les cellules endothéliales HUVEC-C

#### 2.1.1.1 Culture des HUVEC-C.

Les HUVEC-C (Human Umbilical Vein Endothelial Cell ) sont des cellules endothéliales dérivées de cordons ombilicaux humains provenant de l'ATCC (CRL-1730, American Type Culture Collection ). Elles se différencient des HUVEC en primo-culture par leur culture plus aisée. En effet, les HUVEC-C présentent un potentiel prolifératif prolongé et peuvent être cultivées durant 60 à 70 générations.

C'est donc sur cette lignée cellulaire que nous travaillerons tout au long de ce mémoire.

#### a) Préparation des milieux.

Aucune lignée cellulaire ne se cultive de la même manière. En effet, de nombreux paramètres entrent en jeu : leur vitesse de croissance, leurs besoins nutritionnels,...

Voici donc les milieux utilisés pour la culture des HUVEC-C ainsi que leur préparation.

#### Matériel.

- Milieu F12K (Gibco BRL, Grande-Bretagne)
- Antibiotiques (Penicilline 50 U/ml ; Streptomycine 50 µg/ml) (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgique)
- Fongizone 0,25 µg/ml (Gibco, Grande-Bretagne)
- HEPES (Janssen Chimica, Belgique)
- NaOH 2 N (Merck, Allemagne)
- FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco BRL, Grande-Bretagne)
- Heparine (H31-49, Sigma, USA)
- ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) (facteurs de croissance d'hypophyse bovine, E-0760, Sigma, USA)
- Filtre (Sarstedt, Allemagne)

## Méthode.

- Milieu « F12K stock »

Ce milieu est utilisé pour les rinçages ainsi que pour la préparation des solutions de stimulation.

Il se compose de F12K auquel on ajoute les antibiotiques (Penicilline 50 U/ml + Streptomycine 50 µg/ml) et du fongizone (25 µg/ml), le tout étant tamponné à l'Hepes (10 mM) à partir d'un stock d'Hepes 1 M, filtré et stocké à 4°C sous forme d'aliqots de 5 ml.

- Milieu « F12K stock + 10 % sérum »

Celui-ci est principalement utilisé pour inhiber la trypsine lors des repiquages mais également pour la préparation de milieux de stimulation contenant du sérum.

Sa préparation est simple : on ajoute 10 % de sérum FBS au milieu stock décrit précédemment.

- Milieu « F12K complet »

Ce dernier est utilisé pour la culture. En plus du milieu stock et des 10 % de sérum, il contient 2 mg/ml d'ECGS, facteurs de croissance dérivés d'extraits d'hypophyse bovine, ainsi que 0,1 mg/ml d'héparine dont le rôle serait de présenter ces facteurs de croissance aux récepteurs cellulaires situés en membrane.

**(Pour une question de simplicité, nous utiliserons cette même terminologie tout au long de la rédaction des matériels et méthodes.)**

### *b) Repiquage des HUVEC-C.*

## Matériel.

- Cellules HUVEC-C (CRL-1730 ; ATCC, USA)
- Boîtes de culture en polystyrène : T75 / T25 / plaques multi-puits. (Costar USA)
- Couvercle-objet 1 cm de diamètre (Assistant, Allemagne)
- Gélatine 0,2 % (Merck, Allemagne)
- PBS stérile: NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Solution stérile de trypsine / EDTA : trypsine 0,05 % ; EDTA 0,53 mM (Gibco BRL, Grande-Bretagne)
- Milieu F12K stock + 10 % sérum
- Milieu F12K complet
- DMSO (Acros Chimica, Belgique)
- Éthanol absolu (Merck, Allemagne)
- Ampoules de congélation (Nunc, Danemark)

- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Grande-Bretagne)
- Tubes de 50 ml (Sarstedt, Allemagne)
- Cellule de Neubauer (Vel, Belgique)
- Solution de Bleu de trypan 0,4 % (Sigma, USA) : préparée dans 0,81 % de NaCl et 0,06 % de phosphate de potassium
- Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)

#### Méthode.

Les HUVEC-C sont cultivées en T75 jusqu'à confluence, ce qui représente une densité d'environ 200.000 cellules par cm<sup>2</sup>. Trois à quatre jours leur suffisent pour arriver à ce stade. Là, elles arrêtent de se diviser et un repiquage devient nécessaire afin d'éviter le décrochement des cellules.

Après avoir préalablement préchauffé les différents milieux à 37°C, la première étape consiste à décanter les boîtes de culture, les rincer 1X au PBS, et y ajouter 1,5 ml de trypsine / EDTA afin de décrocher les cellules de leur substrat.

La suspension cellulaire est alors récoltée et complétée avec du F12K stock + 10 % sérum pour atteindre un volume final de 10 ml, la fonction de ce sérum étant d'inhiber l'action de la trypsine grâce aux inhibiteurs de protéases qu'il contient.

Le tout est centrifugé 10 minutes à 1000 rpm.

Pendant ce temps, on peut éventuellement compter le nombre de cellules par ml que contenait la boîte de culture d'origine, en prélevant pour cela quelques gouttes de la suspension cellulaire, qu'on dilue 2X dans du bleu de trypan, ce qui nous permettra de visualiser les cellules mortes afin de ne pas tenir compte de ces dernières lors du comptage. 10 µl de cette solution sont ensuite déposés dans chacun des deux espaces de la cellule de Neubauer afin de compter le nombre de cellules (X) contenues dans les 8 carrés prévus à cet effet. Le nombre de cellules par ml (Y) peut alors être simplement calculé par l'équation suivante :

$$Y = \frac{X}{8} \times 2 \times 10\,000$$

Ce comptage sera une aide très précieuse si on veut repiquer un nombre bien précis de cellules.

Lorsque la centrifugation est terminée, le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans du milieu F12K complet. Ce dernier est dilué de manière adéquate pour obtenir une suspension d'une densité cellulaire voulue. Dans notre cas, pour que les cellules atteignent la confluence plus ou moins 3 jours après le repiquage, la suspension cellulaire de départ est diluée 3 fois (soit environ 67.000 cellules/cm<sup>2</sup>).

On peut dès lors la déposer dans les nouvelles boîtes de culture préalablement incubées minimum 30 minutes, à 37°C, avec de la gélatine 0,2 % (0,2 g de gélatine par 100 ml de PBS dissous à la chaleur et filtré) à raison de 2 ml par T75, 1 ml par T25 ou encore 0,3 ml pour les 24 puits.

c) Congélation des HUVEC-C.

Lorsque les cellules ont atteint la confluence, elles sont rincées, trypsinisées et recueillies dans 9 ml de F12K stock + 10 % sérum. Comme lors du repiquage, les cellules sont alors centrifugées 10 minutes à 1000 rpm. Le culot sera, cette fois, resuspendu dans 1 ml de milieu F12K + 20 % sérum + 10 % DMSO.

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 sera placé à -196°C dans de l'azote liquide.

Cette technique permet une congélation progressive et évite la formation de cristaux à l'intérieur des cellules.

d) Décongélation des HUVEC-C.

Les cellules sont stockées dans des cryotubes plongés dans 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. En effet, la décongélation ne doit pas durer plus d'une minute.

Les cellules sont ensuite déposées dans une T75 contenant 15 ml de milieu F12K + 10 % sérum. Le lendemain, on veillera à changer le milieu afin d'éliminer le DMSO pouvant être toxique pour les cellules.

2.1.1.2 Test de cytotoxicité.

Ce test est à réaliser avant toute autre expérience, le but étant de mesurer les éventuels effets cytotoxiques que pourraient avoir sur nos cellules les molécules qui feront par la suite l'objet d'expériences plus poussées.

La méthode utilisée est celle du bromure d'éthidium et acridine orange. L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore le noyau en vert. Par contre, le bromure d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, mais colore en orange le noyau des cellules mortes.

Matériel.

- Plaque 24 puits en polystyrène (Costar, USA)
- Milieu F12K complet
- Gélatine 0,2 % (Merck, Allemagne)
- Milieu F12K stock
- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Solution de coloration diluée 100X (conservée 1 mois à 4°C) :
  - 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma, USA)
  - 15 mg d'acridine orange (Sigma, USA)dissous dans 1ml d'éthanol 95 % et 49 ml d'eau distillée.
- Microscope à fluorescence inversé (Dialux 22, Leitz)

### Méthode.

La veille, les HUVEC-C sont repiquées en plaque 24 puits à raison de 50.000 cellules par puits. C'est sur ces cellules que va être mise en évidence la toxicité ou l'absence d'effet cytotoxique des produits à tester.

Ceux-ci sont dilués dans du F12K stock, aux concentrations que nous utiliserons pour stimuler nos cellules lors des expériences à venir. 1 ml de ces solutions est ensuite déposé dans chaque puits. Ces derniers sont laissés à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> durant un temps d'incubation déterminé, à la fin duquel on lave 2X chaque puits au PBS, on dépose une ou deux gouttes de bromure d'éthidium + acrydine orange et observe immédiatement l'état des cellules au microscope à fluorescence inversé : les cellules colorées en vert sont vivantes, celles en orange sont mortes.

En évaluant le taux de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes, nous pouvons en déduire le niveau de toxicité de la molécule testée et donc définir les concentrations auxquelles cette dernière pourra être utilisée par la suite sans risquer de nuire aux cellules.

Nous compléterons les résultats obtenus lors de cette technique par une observation de nos cellules en contraste de phase et par un dosage protéique de type Bradford (méthode au point 2.2.1.4).

#### 2.1.1.3 Mise en évidence du facteur de Von Willebrand par immunocytochimie.

Le but de cette expérience est de vérifier que les HUVEC-C, lignée cellulaire avec laquelle nous travaillons, présentent bien les caractéristiques des cellules endothéliales.

Le facteur de Von Willebrand est synthétisé et stocké par ces dernières au niveau des corps de Weibel-Pallade, corpuscules propres aux cellules endothéliales : ce facteur s'associe au facteur VIII de la voie de coagulation, c'est d'ailleurs pour cette raison que, par abus de langage, la méthode est souvent appelée « marquage du facteur VIII ».

### Matériel.

- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Paraformaldéhyde (PFA) (Merck, Allemagne)
- Triton 1 % (Sigma, USA)
- BSA (Albumine Bovine, A-4503, Sigma, Aldrich-Allemagne)
- Boîte de Pétri de 15 cm de diamètre
- Papier absorbant
- Parafilm
- Anticorps polyclonal de lapin (IgG) anti-facteur de Von Willebrand humain (Dako, Danemark)
- Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à une sonde fluorescente ALEXA verte (488 nm)

- Tubes eppendorf
- TO PRO 3 (Molecular Probes) dilué 80X dans du PBS + 2 mg/ml de RNases (ICN, USA)
- Moviol (Sigma, USA)
- Lames en verre (Menzel-Glozer, Allemagne)
- Microscope confocal TCS SP équipé d'un laser Argon/Krypton (488, 568, 647 nm) (Leica, Allemagne)

### Méthode.

La veille, les HUVEC-C sont repiquées en plaque 24 puits, sur couvre-objet stériles, à raison de 25.000 cellules par puits.

Une fois stimulées, elles sont mises 10 minutes en présence de PFA 4 % (dans du PBS) **froid**, à raison de 1 ml/puits, dans le but de fixer les cellules.

Les cellules sont alors rincées 3X au PBS et incubées 5 minutes dans 1 ml de Triton 1 % afin de les perméabiliser. 3 rinçages de 10 minutes sont une fois de plus nécessaires, mais cette fois avec du PBS/BSA 2 %. Le rôle de la BSA sera d'empêcher toute interaction non spécifique de l'anticorps.

Le montage de la chambre humide est ensuite réalisé :

Une boîte de Pétri de 15 à 20 cm de diamètre est recouverte d'une couche de papier buvard humidifié avec de l'eau distillée. Sont ensuite placés des morceaux de parafilm sur lesquels seront déposées des gouttes de 50 µl d'anticorps, correspondant chacune à un couvre-objet, et à bonne distance l'une de l'autre.

En résumé sont déposées :

- 1 goutte d'anticorps primaire dilué 50X dans du PBS/BSA 2 % pour chaque échantillon ainsi que pour le contrôle négatif pour lequel on omet l'anticorps secondaire. (CTL- Ac 2).
- 1 goutte de PBS/BSA 2 % destinée au contrôle négatif pour lequel on omet l'anticorps primaire (CTL- Ac 1)

On retourne ensuite nos couvre-objets sur chaque goutte en faisant très attention à bien les poser sur la face où adhèrent les cellules.

Après 1 heure d'incubation à température ambiante et boîte fermée pour garder l'humidité, les couvre-objets sont remis dans leurs puits respectifs, et sont rincés 3X 10 minutes avec du PBS/BSA 2 %.

Vient ensuite le tour des anticorps secondaires :

En gardant le même montage, mais en changeant les morceaux de parafilm, on vient déposer :

- 1 goutte de 50 µl d'anticorps secondaire dilué 500X dans du PBS/BSA 2 % pour les échantillons et le CTL- Ac 1.
- 1 goutte de 50 µl de PBS/BSA 2 % pour le CTL- Ac 2.

Les couvre-objets sont une fois de plus retournés sur les gouttes et incubés 1 heure **à l'abri de la lumière.**

Replacés à nouveau dans les puits, les couvre-objets sont rincés 2X 5 minutes au PBS/BSA 2 %, puis 2X 5 minutes au PBS seul.

Après avoir changé une dernière fois de parafilm, on y dépose 1 goutte de TO PRO 3 dilué 80X dans une solution de RNase. Les couvre-objets sont disposés de

manière habituelle et laissés 35 minutes à l'abri de la lumière. Cette étape a pour but de marquer les noyaux en bleu, grâce au TO PRO, tout en dégradant l'ARN par l'action des RNAses afin que seul l'ADN, c'est à dire le noyau, soit marqué par le TO PRO.

Enfin, on dépose une goutte de moviol chauffé à 65°C sur une lame pour venir y déposer les couvre-objet.

Il faudra attendre quelques heures, voire une nuit, pour observer les lames au microscope. La fluorescence émise rendra compte de la présence du facteur de Von Willebrand caractéristique des cellules endothéliales.

## 2.1.2 La lignée monocyttaire THP-1.

Les THP-1 proviennent d'une lignée monocyttaire humaine issue d'un jeune individu atteint d'une forme sévère de leucémie monocyttaire. Elles nous ont été fournies par le Professeur Cl. Remacle (UCL), mais sont également disponibles à l'ATCC.

### 2.1.2.1 Culture cellulaire des THP-1.

Ces cellules se trouvent en suspension dans le milieu et se divisent en formant des grappes, ce qui rend leur culture différente de celle des HUVEC-C. Leur culture nécessite environ deux repiquages par semaine.

#### Matériel.

- Boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75) en polystyrène (Costar, USA)
- Milieu RPMI (Gibco, Grande-Bretagne)
- FBS : Serum de veau foetal (Gibco BRL, Grande-Bretagne)
- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Grande-Bretagne)
- Tubes de 50 ml (Sarstedt, Allemagne)
- Chambre de Neubauer (Vel, Belgique)
- Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)

#### Méthode.

##### a) Repiquage des THP-1.

Les THP-1 en suspension dans la T75 sont transvasés dans des tubes de 10 ml qui seront centrifugés 7 minutes à 1000 rpm pendant qu'on compte le nombre de THP-1 par ml. Les culots sont alors resuspendus dans du RPMI + 10 % sérum et la nouvelle suspension cellulaire est redistribuée dans de nouvelles T75 à raison de 3 millions de cellules par boîte. On complète ces boîtes avec du

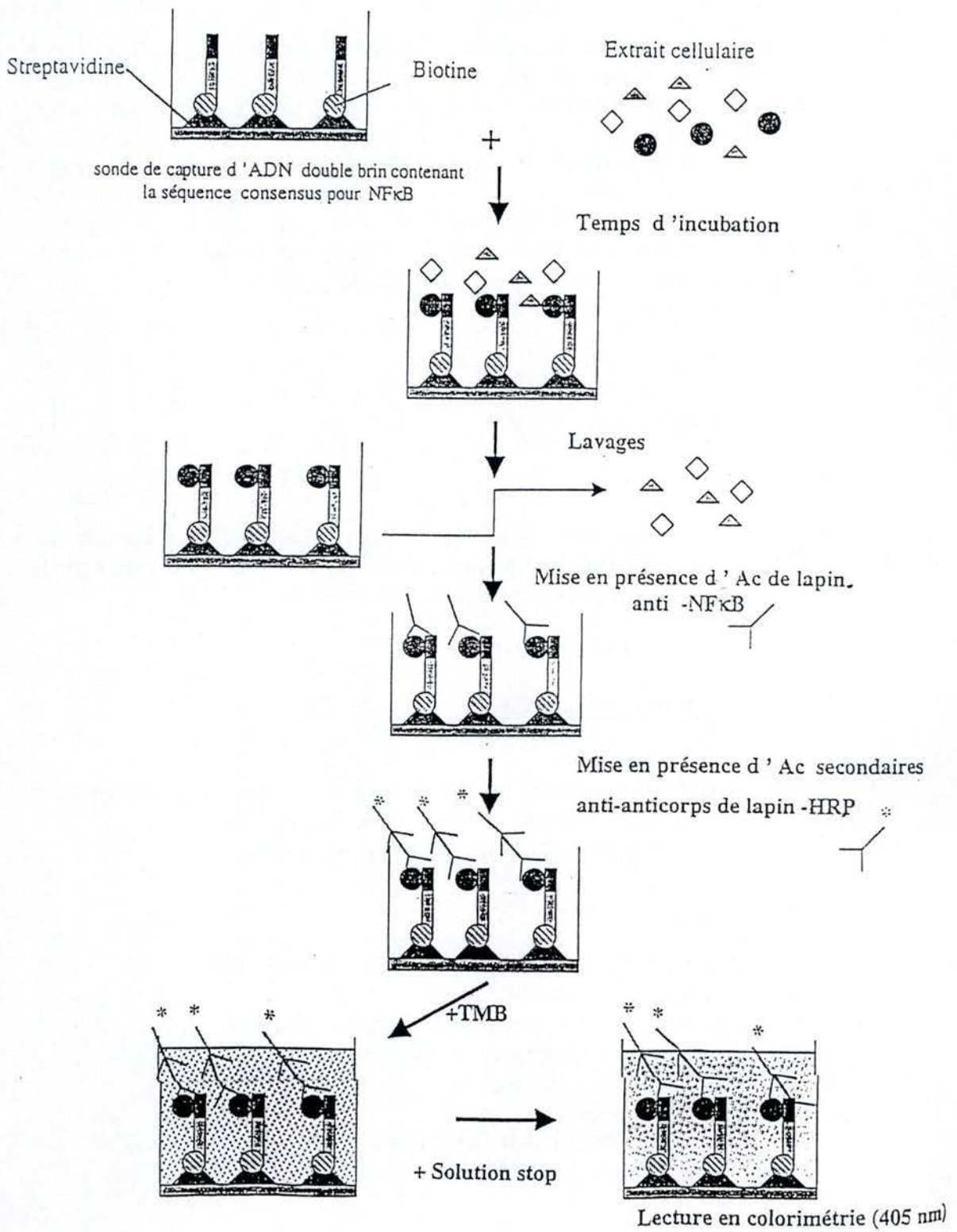


Figure 2.1 : Schéma illustrant le principe du dosage colorimétrique du facteur de transcription NFκB.



RPMI + 10 % sérum pour finalement obtenir un volume total de 15 ml par boîte.

b) Congélation des THP-1

Les cellules sont récoltées dans un tube de 10 ml afin d'être centrifugées 7 minutes à 1000 rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans 1ml de milieu constitué de 92 % de sérum et de 8 % de DMSO. Comme pour les HUVEC-C, le contenu d'une T75 est déposé dans un cryotube, lui-même placé dans le système de refroidissement pour une nuit à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Le lendemain, le cryotube est stocké dans l'azote liquide.

c) Décongélation des THP-1.

Le principe est identique à celui des HUVEC-C, mis à part le milieu de la T75 qui change : les cellules sont diluées dans 15 ml de RPMI + 20 % de sérum préchauffé.

Une fois que ces cellules ont repris un rythme de division normal, le milieu de culture est substitué par du RPMI + 10 % sérum.

## 2.2 Etude du dysfonctionnement des cellules endothéliales.

### 2.2.1 Dosage de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par colorimétrie.

Le but de cette expérience est de doser l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B chez des cellules stimulées ou non avec les molécules d'intérêt. (*figure 2.1*)

#### 2.2.1.1 Fixation des sondes de capture double brin sur plaques 96 puits.

Cette étape permet de fixer au fond des puits les sondes de capture, c'est à dire des oligonucléotides contenant la séquence consensus qui sera reconnue par la suite par le facteur de transcription d'intérêt, à savoir NF $\kappa$ B.

Les sondes de capture sont biotinylées, ce qui permet de les lier à la streptavidine, avec laquelle sont préconditionnés les puits.

### Matériel.

- Puits préconditionnés avec de la streptavidine (Roche, Allemagne)
- Sondes de capture biotinylées de 127 bp : solution stock 204 µg/ml (Eurogentec)
- PBS (NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4)
- PBS bis (NaCl 50 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4)
- Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- Eau distillée

### Méthode.

Dans chaque puits, il faut tout d'abord placer 50 µl d'une solution contenant 2 picomoles de sondes de capture biotinylées diluées dans du PBS. Pour obtenir cette concentration, nous devons tenir compte du nombre de paires de bases constituant la sonde, du poids moléculaire moyen d'un nucléotide, qui est de 330 g/mole, ainsi que de la concentration de la solution stock.

Après 1 heure d'incubation en chambre chaude (37°C), on effectue 2 lavages avec 100 µl de PBS bis + tween 20 (0,1 %), suivis d'un dernier lavage dans 200 µl d'eau distillée.

Enfin, les puits sont décantés et séchés en chambre chaude avant de stocker les plaques à 4°C.

Les plaques se conservent 1 an à cette même température.

#### 2.2.1.2 Stimulation des cellules.

### Matériel.

- Boîtes de cultures T25 contenant des HUVEC-C à confluence
- Milieu de culture : F12K stock
- Tubes de 10 ml
- Molécules activatrices :
  - l'homocystéine (Hcy) (H-4628, Sigma Aldrich, Grande-Bretagne) :  
Son poids moléculaire est de 135,2 g/mole. Elle est dissoute dans du milieu F12K stock et stockée à -20°C à une concentration de 100 mM. Lors de son utilisation, elle est diluée dans du F12K stock.
  - l'homocystéine Thiolactone (Hcy thio) (HO376, Sigma Aldrich, Grande-Bretagne) :  
Son poids moléculaire est de 154 g/mole. Elle est dissoute fraîchement dans du F12K stock et diluée dans ce même milieu lors des stimulations.

- L'isoprostane 8-iso PGF2 $\alpha$  (8-iso PGF2 $\alpha$  ou isoprostane-8) (16315, Cayman Chemical, USA) :  
Son poids moléculaire est de 354,5. Il est dissout dans l'éthanol 100 % et est stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  à une concentration de 10 mM. Lors des stimulations, il est dilué dans du milieu F12K stock avec ou sans 10 % de sérum, selon les expériences.

#### Méthode.

On prépare tout d'abord stérilement les solutions de stimulation.

Les cellules sont décantées et rincées 1X au F12K stock, pour enfin être stimulées via l'ajout de 2 ml de solution d'activation .

Elles sont alors incubées le temps voulu dans une étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  et 5 % de  $\text{CO}_2$ .

#### 2.2.1.3 Extraction protéique.

#### Matériel.

- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Tubes eppendorf
- Centrifugeuse à  $4^{\circ}\text{C}$  (Labofuge, 44R, Heraeus, Allemagne)
- Racloir
- Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Complete, Boehringer, Allemagne)
- Dithiotreitol 1 M (D-8024, Sigma, USA)
- Tampon de lyse stock :
  - Hepes 20 mM pH 7,5 (Janssens Chemica, Belgique)
  - NaCl 350 mM (Merck, Allemagne)
  - $\text{MgCl}_2$  1 mM (Merck, Allemagne)
  - EDTA 0,5 mM pH 7,5 (Merck, Allemagne)
  - EGTA 0,1 mM pH 7,5 (E-4378, Sigma, USA)
  - Glycerol 20 % (Merck, Allemagne)
  - Nonidet P40 1 % (ON-6537, Sigma, USA)

#### Méthode.

Dès la sortie de l'étuve, on met les cellules (en T25) sur glace. Une fois les boîtes décantées et rincées 2X avec 2 ml de PBS froid, les cellules sont raclées 2X dans 750  $\mu\text{l}$  de PBS froid et transvasées dans un eppendorf.

Après les avoir centrifugées 10 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et à 1000 rpm, on décante les tubes, toujours gardés sur glace. Les culots sont ensuite resuspendus dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse (1ml de tampon de lyse stock + 40  $\mu\text{l}$  PIC + 5  $\mu\text{l}$  DTT 1 M) et incubés 10 minutes sur glace.

Les échantillons sont alors centrifugés 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et à 13.000 rpm pour éliminer les débris cellulaires.

Après avoir récupéré les surnageants, on en prélève 2X 4  $\mu$ l pour le dosage protéique de type Bradford, le reste étant stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour le dosage colorimétrique proprement dit.

#### 2.2.1.4 Dosage protéique par la méthode de Bradford .

Ce dosage va, par la suite, nous permettre de calculer les dilutions à réaliser pour remettre tous les échantillons à la même concentration en vue du dosage de NF $\kappa$ B.

##### Matériel.

- Colorant : réactif des protéines = bleu de Coomassie dilué 5X dans l'eau distillée et filtré (Bio Rad protein assay, Bio-Rad, USA)
- Tampon de lyse :
  - Hepes 20 mM pH 7,5 (Janssens Chemica, Belgique)
  - NaCl 350 mM (Merck, Allemagne)
  - MgCl<sub>2</sub> 1 mM (Merck, Allemagne)
  - EDTA 0,5 mM pH 7,5 (Merck, Allemagne)
  - EGTA 0,1 mM pH 7,5 (E-4378, Sigma, USA)
  - Glycerol 20 % (Merck, Allemagne)
  - Nonidet P40 1 % (ON-6537, Sigma, USA)
- Etalon BSA : 1,39  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Albumine Bovine ; A45-03, Sigma, USA)
- Eau distillée
- Tubes de 5 ml
- Cuvette en quartz
- Acétone
- Spectrophotomètre (Stasar III, Gilford, USA)

##### Méthode.

On prépare 2 tubes de 5 ml par échantillon en plus de 2 tubes pour le blanc (tampon de lyse), 2 tubes pour l'étalon (BSA) et 2 tubes pour le blanc étalon (eau distillée).

1 ml de colorant est déposé dans chaque tube, auquel sont ajoutés de 30 secondes en 30 secondes, soit :

- 3,6  $\mu\text{l}$  d'étalon
- 3,6  $\mu\text{l}$  d'eau distillée pour le blanc étalon
- 2  $\mu\text{l}$  pour les échantillons
- 2  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse pour le blanc

Après 5 minutes, l'absorbance est lue à 595 nm, toujours de 30 secondes en 30 secondes, dans une cuvette en quartz qu'on rince 1X à l'acétone puis 1X à l'eau distillée entre chaque lecture.

La concentration en protéines se calcule de la façon suivante :

$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{(\text{D.O.échantillon} - \text{D.O.Tp lyse})}{(\text{D.O.étalon} - \text{D.O.eau})} \times \text{concentration étalon (mg/ml)}$
--

### 2.2.1.5 Dosage de l'activation de NFκB par colorimétrie.

#### Matériel.

- Strips de 8 puits contenant de l'ADN de capture (Roche, Allemagne)
- Tampon de lyse
- Tubes eppendorf
- Tampon BB stock (binding buffer) :
  - Hepes : 10 mM, pH 7,4 (Janssens 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
  - 390 µl d'eau autoclavée
  - 200 µl de BSA 5 % (A-3059, Sigma, USA)
  - 10 µl de DNAss stock 0,05 mg/ml (ICN, USA)
  - 2 µl de DTT 1 M (D-8024, Sigma, USA)
- Eau autoclavée
- PBS bis: NaCl 50 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- Caséine (Sigma, USA)
- Anticorps primaire polyclonal de lapin (IgG) anti-p65 humain (Santa Cruz, USA)
- Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) (Roche, Allemagne)
- TMB (Tetra-Méthyl Benzidine) (Bio Source, Belgique)
- Solution stop (H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) (Bio Source, Belgique)
- Lecteur de plaques multipuits (Ultramark, Bio-Rad, USA)

#### Méthode.

Avant même de mesurer l'activité de NFκB, on commence par mettre tous les échantillons de protéines à la même concentration.

La concentration désirée est de 25 µg/µl par puits et cela pour un volume final de 20 µl/puits. Les différents extraits seront donc dilués dans du tampon de lyse pour atteindre cette concentration.

20 µl de nos solutions sont déposés dans les puits où sont également ajoutés 30 µl de tampon BBC. Chaque échantillon est mesuré en triple.

Après une incubation d'1 heure à température ambiante sous agitation faible, 3 lavages de 2 minutes sont réalisés avec 200 µl par puits de PBS bis + tween 0,1 %.

L'étape suivante est la fixation de l'anticorps primaire :

L'anti-p65, dilué 1000X dans du PBS bis + caséine 1 %, est déposé à raison de 100 µl par puits et le tout est incubé 1 heure à température ambiante. Ensuite, les puits sont à nouveau rincés 3X 2 minutes avec 200 µl de PBS bis + tween 0,1 %.

Vient alors le moment de fixer l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase : ce dernier est également dilué 1000X dans du PBS bis + caséine 1 %. On en dépose 100 µl/puits et on incube 1 heure à température ambiante.

La suite de la manipulation doit maintenant se faire dans l'obscurité.

Après avoir effectué 4 lavages successifs de 2 minutes avec du PBS bis + Tween 0,1 %, 100 µl de TMB (chromogène) sont déposés dans chaque puits. La réaction enzymatique se déroule pendant 10 minutes à l'abri de la lumière.

L'expérience se termine par l'ajout de 100 µl de solution stop qui arrête la réaction colorimétrique entre le chromogène et la peroxydase.

L'absorbance est lue à 405 nm.

### 2.2.2 Mise en évidence de la translocation de NFκB dans le noyau par immunocytochimie.

Le but de cette expérience est de **visualiser** la translocation du facteur de transcription NFκB du cytoplasme de la cellule vers le noyau, où il pourra induire l'expression de certains gènes cibles en venant se fixer à la séquence consensus présente au niveau des promoteurs de ces gènes.

En effet, en condition de repos, NFκB est retenu dans le cytoplasme par IκB, protéine associée au facteur de transcription au niveau de sa séquence NLS, ce qui empêche ce dernier de migrer vers le noyau. Lorsque, pour une raison ou pour une autre, la cellule est activée, IκB est phosphorylé, polyubiquitinylé, et dégradé par le protéasome, ce qui libère NFκB qui dès lors peut migrer vers le noyau, où il pourra enfin jouer son rôle de facteur de transcription.

Ce test a été réalisé par une technique d'immunocytochimie combinée à la microscopie confocale.

#### Matériel.

- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Paraformaldéhyde (PFA) (Merck, Allemagne)
- Triton 1 % (Sigma, USA)
- BSA (Albumine Bovine, A-4503, Sigma, Aldrich-Allemagne)
- Boîte de Pétri de 15 cm de diamètre
- Papier absorbant
- Parafilm
- Anticorps polyclonal de lapin (IgG) anti-p65 humain (Santa Cruz, USA)

- Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à une sonde fluorescente ALEXA verte (488 nm)
- Tubes eppendorf
- TO PRO 3 (Molecular Probes) dilué 80X dans du PBS + 2 mg/ml de RNases (ICN, USA)
- Moviol (Sigma, USA)
- Lames en verre (Menzel-Glozer, Allemagne)
- Microscope confocal TCS SP équipé d'un laser Argon/Krypton (488, 568, 647 nm) (Leica, Allemagne)

### Méthode.

Les cellules sont avant toute chose repiquées en plaque 24 puits sur couvre-objet à raison de 50.000 cellules par puits.

Une fois stimulées, elles sont mises 10 minutes en présence de PFA 4 % (dans du PBS) **froid**, à raison de 1 ml/puits. Les cellules sont alors rincées 3X au PBS et incubées 5 minutes dans 1 ml de Triton 1 % afin de les perméabiliser. 3 rinçages de 10 minutes sont une fois de plus nécessaires, mais cette fois avec du PBS/BSA 2 %.

Le rôle de la BSA sera d'empêcher toute interaction non spécifique de l'anticorps.

Le montage de la chambre humide et les étapes successives marquage sont réalisés comme décrit précédemment pour le facteur de Von Willbrand (*point 2.1.1.3*).

Les anticorps sont cependant dilués 500X. Deux contrôles négatifs sont également réalisés : un CTL- pour lequel on omet l'anticorps primaire et un CTL- pour lequel on omet l'anticorps secondaire.

La fluorescence émise rendra compte de la localisation de NFκB dans la cellule.

## 2.2.3 Dosage colorimétrique de l'activation du facteur de transcription AP-1.

### 2.2.3.1 Fixation des sondes de capture en plaque 96 puits..

Cette étape permet de fixer au fond des puits les sondes de capture, c'est à dire les oligonucléotides contenant la séquence consensus qui sera reconnue par la suite par le facteur de transcription d'intérêt, à savoir AP-1.

Ceci est réalisable grâce à une biotine préalablement liée à la sonde de capture. Cette dernière sera en effet le lien entre cette sonde et la streptavidine avec laquelle sont préconditionnés les puits.

### Matériel.

- Puits préconditionnés avec de la streptavidine (Roche, Allemagne)
- Sondes de capture biotinylées : solution stock 6,6 pmole/ $\mu$ g (Eurogentec)
- PBS (NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4)
- PBS bis (NaCl 50 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4)
- Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- Eau distillée

### Méthode.

Dans chaque puits il faut tout d'abord placer 50  $\mu$ l d'une solution contenant 4 picomoles de sondes de capture biotinylées diluées dans du PBS.

Après 1 heure d'incubation en chambre chaude (37°C), on effectue 2 lavages avec 100  $\mu$ l de PBS bis + tween 20 (0,1 %), suivis d'un dernier lavage dans 200  $\mu$ l d'eau distillée.

Enfin, les puits sont décantés et séchés en chambre chaude avant de stocker les plaques à 4°C.

Les plaques se conservent 1 an à cette même température.

### 2.2.3.2 Stimulation des cellules.

#### Matériel.

- Boîtes de cultures T25 contenant des HUVEC-C à confluence
- Milieu de culture : F12K stock avec ou sans 10 % sérum
- Tubes de 10ml
- Molécules activatrices décrites précédemment lors du *point* 2.2.1.2 : Hcy et/ou Hcy thio et/ou 8-iso PGF2 $\alpha$ .

#### Méthode.

On prépare tout d'abord stérilement les solutions de stimulation.

Les cellules sont décantées et rincées 1X au F12K stock, pour enfin être stimulées via l'ajout de 2 ml de solution d'activation.

Elles sont alors incubées le temps voulu dans une étuve à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3.3 Extraction nucléaire.

#### Matériel.

- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- PBS + Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1mM + NaF 5 mM:



- Pour 100 ml: 24 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (Sigma, USA)  
21 mg NaF (Merck, Allemagne)  
100 ml PBS
- HB 2X:  
Pour 100 ml : 0.95 g Hepes (40 mM) (Janssens Chimica, Belgique)  
0.042 g NaF (10 mM) (Merck, Allemagne)  
0.048 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (Sigma, USA)  
0.00745 g EDTA (0.2 mM) ( Merck, Allemagne)
- Solution RE :  
Pour 20 ml: 10 ml HB 2X  
4 ml glycérol 87 % (Merck, Allemagne)  
6 ml H<sub>2</sub>O
- PIC (Phosphatase Inhibitor Cocktail) (Complete, Boehringer, Allemagne)
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) (Complete, Boehringer, Allemagne)
- Solution SA :  
Pour 20 ml : 10 ml HB 2X  
4 ml glycérol 87 % ( Meck, Allemagne)  
4 ml NaCl 4 M ( Meck, Allemagne)  
2 ml H<sub>2</sub>O
- Racloirs
- Tubes eppendorf
- Centrifugeuse (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne)

### Méthode.

Après avoir stimulé les cellules en T25 et préparé l'ensemble des solutions décrites ci-dessus, les T25 sont vidées et rincées 1 minute avec 3 ml de PBS froid. Elles sont ensuite lavées 1 minute avec 3 ml de PBS + NaF + Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> froid, puis environ 10 minutes à l'aide de 3 ml de HB 1X dilué 2X dans l'eau à partir de HB 2X, et cela, afin de faire gonfler les cellules.

Vient alors la lyse de celles-ci : 200 µl de tampon de lyse sont répartis uniformément dans chaque T25, après quoi ces dernières sont raclées. Le tout est transvasé dans un eppendorf qui est centrifugé 30 secondes à 13.000 rpm avant de voir le culot resuspendu dans 30 µl de RE complet. Un volume identique de SA complet y est ajouté. Après que les tubes aient tourné sur une roue à 4°C durant 30 minutes, ils sont à nouveau centrifugés 10 minutes à 4°C et à 13.000 rpm. Leur surnageant est finalement aliquoté en deux échantillons : un premier eppendorf de 7 µl, destiné au dosage protéique de Bradford, et un deuxième, contenant le reste du surnageant, qui, lui, servira au dosage de l'activation d'AP-1 proprement dit. Ces derniers peuvent être stockés à -70°C en attendant la suite de l'expérience.

#### 2.2.3.4 Dosage protéique par la méthode de Bradford.

Ce dosage nous permettra par la suite de mettre l'ensemble de nos échantillons à la même concentration.

### Matériel.

- Colorant : réactif des protéines = bleu de Coomassie (Bio Rad protein assay, Bio Rad, USA)
- Tampon de lyse :  
Pour 20 ml: 10 ml HB 2X  
400 µl NP-40 10 % ( ON-6537, Sigma, USA)  
9.6 ml H<sub>2</sub>O
- Etalon BSA (Albumine Bovine, A45-03, Sigma, USA)
- Eau distillée
- Tubes de 5 ml
- Cuvette en quartz
- Acétone
- Spectrophotomètre (Stasar III, Gilford, USA)

### Méthode.

La méthode suivie est celle décrite au *point 2.2.1.4.*

La concentration en protéines se calcule de la façon suivante :

$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{(\text{D.O.échantillon} - \text{D.O.Tp lyse})}{(\text{D.O.étalon} - \text{D.O.eau})} \times \text{concentration étalon (mg/ml)}$
--

### 2.2.3.5 Dosage colorimétrique.

#### Matériel.

- Tampon de Binding 3X : NaCl 24 mM  
Hepes 6 mM  
EDTA 0,6 mM  
Glycérol 36 %
- Tampon de Lyse complet : 1 ml de solution RE  
1 ml de solution SA  
80 µl PIC (Complete, Boehringer, Allemagne)  
80 µl PIB (Complete, Boehringer, Allemagne)  
2 µl DTT 1 M (D-8024, Sigma, USA)
- Tampon de Binding complet: 800 µl de tampon de Binding 3X  
8 µl de Poly dI-dC 0.05 µg/µl  
24 µl d'une solution de Gloria 10 % (dissoute dans l'eau)  
2.4 µl DTT 1 M (D-8024, Sigma, USA)  
1590 µl d'eau autoclavée
- PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Tween 20
- PBS bis / BSA 1 %

- Anticorps de lapin (IgG) anti-c fos humain (Santa Cruz, USA)
- Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à une HRP (Roche, Allemagne)
- Solution de coloration : TMB (BioSource, Belgique)
- Solution STOP (BioSource, Belgique)
- Lecteur de plaques multi-puits (Ultramark, Bio-Rad, USA)

### Méthode.

Les échantillons sont dilués dans du tampon de lyse complet afin d'atteindre une concentration de 10 µg de protéines par puits. Ceux-ci sont alors déposés à raison de 20 µl par puits, puits dans lesquels sont ajoutés 30 µl de tampon de binding complet. Le tout est mis à incuber 1 heure à température ambiante, sous légère agitation.

Suite à 3 lavages successifs de 2 minutes avec 200 µl de PBS bis + Tween 0,1 %, on ajoute 100 µl par puits d'anticorps primaire dilué 1000X dans du PBS bis / BSA1 % et on laisse à nouveau incuber 1 heure à température ambiante.

3 lavages identiques aux précédents sont à nouveau réalisés, après quoi sont déposés 100 µl d'anticorps secondaire dilué de manière similaire aux premiers.

Après une nouvelle heure d'incubation et 4 rinçages avec, toujours, 200 µl de PBS bis + Tween 0,1 %, on dépose 100 µl de TMB à l'abri de la lumière. Après 10 minutes d'incubation, 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 colorimétrique de plaques multi-puits à 405 nm.

### 2.2.3.6 Inhibiteurs.

Le dosage de AP-1 décrit ci-dessus nous permettra également de tester l'effet de certains inhibiteurs sur l'activation des cellules endothéliales par l'isoprostane-8. Les inhibiteurs testés sont :

- SB203580 (L 02010, Alexis, Suisse) : = **inhibiteur de la p38<sup>MAPK</sup>**  
Dissous dans du DMSO, à une concentration de 10 mM, et stocké à -70°C.  
Dilué dans du milieu F12K + 10 % de sérum, pour une concentration finale de 20 µM.
- PD98059 (Calbiochem) : = **inhibiteur de la p42/p44<sup>MAPK</sup>**  
Dissous dans du DMSO, à une concentration de 100 mM, et stocké à -70°C.  
Dilué dans du milieu F12K + 10 % de sérum, pour une concentration finale de 20 µM.

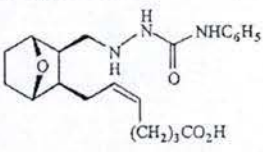
	Dénomination	Référence	Stock	Concentration finale
Inhibiteur de p42/p44 <sup>MAPK</sup>	PD 098059	Calbiochem	Dissous dans du DMSO, stocké à 100 mM, à -70°C	20 µM
Inhibiteur de p38 <sup>MAPK</sup>	SB 203580	L 02010, Alexis, Suisse	Dissous dans du DMSO, stocké à 10 mM, à -70°C	20 µM
Inhibiteur de PKA	H 89	Biomol	Dissous dans du DMSO, stocké à 20 mM, -70°C	20 µM
Antagoniste au TXA <sub>2</sub> 	SQ 29548	S-144, Sigma, USA	Dissous dans de l'éthanol absolu, stocké à 10 mg/ml, à -70°C	50 µM (20 µg/ml)

Figure 2.2: Tableau récapitulatif reprenant les caractéristiques des différents inhibiteurs et antagoniste testés sur l'activation de AP-1.

- H89 (Biomol) : = **inhibiteur de la PKA**  
Dissous dans du DMSO, à une concentration de 20 mM, et stocké à  $-70^{\circ}\text{C}$ .  
Dilué dans du milieu F12K + 10 % de sérum, pour une concentration finale de 20  $\mu\text{M}$ .
- SQ29548 (S-144, Sigma, USA) : = **antagoniste au thromboxane**  
Dissous dans de l'éthanol absolu, et stocké à une concentration de 10 mg/ml, à  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
Dilué dans du milieu F12K + 10 % de sérum, pour une concentration finale de 50  $\mu\text{M}$ .

L'ensemble des caractéristiques de ces différents inhibiteurs et antagoniste sont récapitulées par la *figure 2.2*.

Les cellules sont tout d'abord pré-incubées une heure avec une solution contenant l'inhibiteur, dilué dans du F12K stock + 10 % de sérum. Sans changer le milieu, ces cellules sont ensuite incubées durant le temps désiré, avec une solution activatrice d'isoprostane-8 dilué dans du F12K + 10 % de sérum. L'extraction, le dosage de type Bradford et le dosage colorimétrique s'effectuent comme décrit ci-dessus.

#### 2.2.4 Mise en évidence de la phosphorylation des MAPK par immunocytochimie.

Ces expériences nous permettront de mettre en évidence l'activation de deux des principales voies de transduction du signal des MAPK suite à une stimulation des cellules.

En effet, on décrit actuellement trois cascades de MAPK majeures, distinctes mais parallèles, caractérisées chacune par une succession de trois kinases qui se phosphorylent l'une à la suite de l'autre : il s'agit des MAPKKK, des MAPKK et des MAPK. Ces cascades se terminent par la phosphorylation et donc par l'activation de facteurs de transcription. Par ces expériences, nous avons tenté de mettre en évidence la phosphorylation de deux de ces MAPK, p42/p44 ainsi que la p38<sup>MAPK</sup>, par une technique d'immunocytochimie. Nous avons également utilisé un kit ELISA, récemment commercialisé pour suivre la phosphorylation de la p38<sup>MAPK</sup>.

#### Matériel.

Il s'agit des réactifs signalés au *point 2.2.2*, mis à part les anticorps spécifiques des MAPK :

- anticorps de lapin anti-phospho-p42/p44 humain dilués 100X (Biolabs, USA)
- anticorps de lapin anti-phospho-p38 humain dilués 100X (Biolabs, USA)

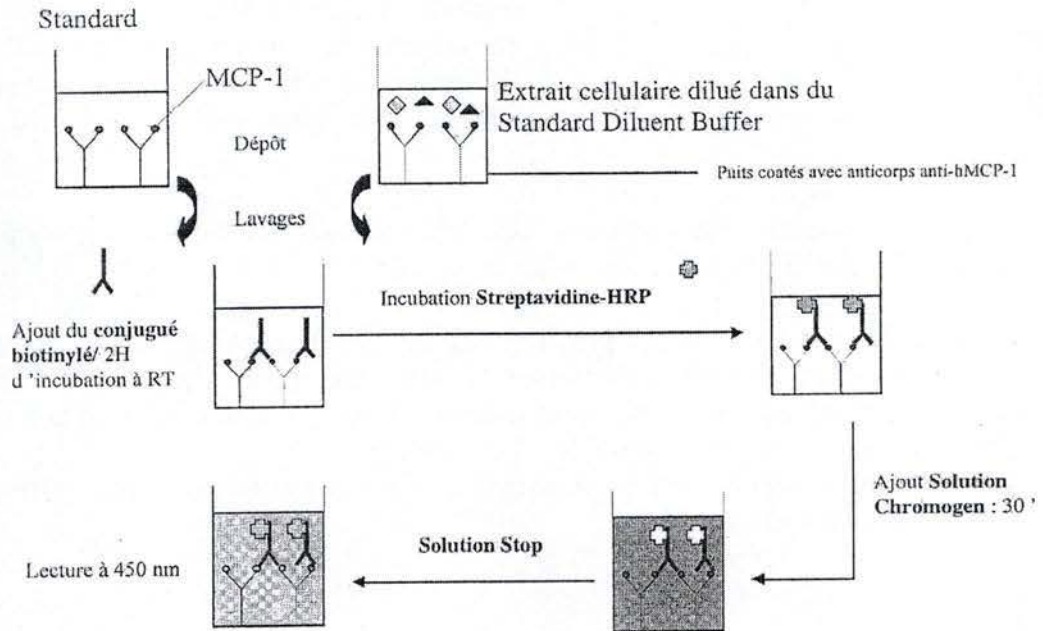


Figure 2.3 : Schéma illustrant le principe du test ELISA pour mesurer l'expression de MCP-1.

### Méthode.

Les cellules sont repiquées comme indiqué au *point 2.2.2*. Plusieurs puits sont prévus par échantillon puisque la phosphorylation des MAPK sera suivie au cours du temps. Une fois les cellules confluentes, elles sont donc stimulées, après rinçage au F12K stock.

Des contrôles négatifs sont prévus pour les temps intermédiaires et longs.

La procédure immunocytochimique correspond au protocole décrit au *point 2.2.2*, si ce n'est que l'anticorps primaire diffère, ainsi que sa dilution.

La fluorescence observée correspond aux MAPK phosphorylées.

### 2.2.5 Dosage du MCP-1 par test ELISA.

MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) est une molécule chémoattractante très puissante, sécrétée entre autre par les cellules endothéliales dans le milieu, et induisant le recrutement des monocytes lors, par exemple, de réactions inflammatoires.

Pour doser cette protéine, nous avons utilisé un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). (*figure 2.3*)

#### 2.2.5.1 Stimulation des cellules.

#### Matériel.

- Plaque de culture de 24 puits contenant des HUVEC-C (100.000 cellules / puits)
- F12K stock
- F12K stock + 10 % sérum
- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Grande-Bretagne)
- Molécules activatrices décrites au *point 2.2.1.2*.

#### Méthode.

Après avoir préalablement repiqué les HUVEC-C en plaque 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits, on les rince 1X au F12K stock, afin d'éliminer les débris. On les stimule alors à l'aide de 500 µl de solutions de stimulation préparées dans du F12K avec ou sans 10 % de sérum.

### 2.2.5.2 Récupération du surnageant.

#### Matériel.

- tubes eppendorf
- centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne )

#### Méthode.

Après avoir stimulé celles-ci durant une période d'incubation désirée, les surnageants, contenant ou non le MCP-1 sécrété par les cellules endothéliales, sont récoltés et centrifugés 3 minutes à 13.000 rpm. Le surnageant est alors aliquoté en deux eppendorf de 250 µl qui seront congelés à -20°C en attendant le test ELISA en tant que tel.

### 2.2.5.3 Dosage de la quantité totale de protéines dans les puits par la méthode du folin.

Le but de ce dosage est de mettre en parallèle la quantité de MCP-1 produit par les cellules contenues dans chaque puits avec la quantité de protéines totales correspondant à ces puits.

#### Matériel.

- NaOH 1 N (Merck, Allemagne)
- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Etalon BSA : 200 µl/ml (Albumine Bovine, A45-03 , Sigma, USA)
- Tubes eppendorf
- Centrifugeuse ( Universal Hettich, Allemagne)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % dissous dans l'eau distillée ( Sigma Aldrich, Grande-Bretagne)
- Na K tartrate 2 % dissous dans l'eau distillée ( Sigma Aldrich, Grande-Bretagne)
- CuSO<sub>4</sub> 1 % dissous dans l'eau distillée ( Sigma Aldrich, Grande-Bretagne)
- Colorant : Folin (Merck, Allemagne)
- Tubes de 5 ml
- Cuvette en quartz
- Spectrophotomètre (Uvikon 930, Kontron instruments, Suisse)

#### Méthode.

Parallèlement à la récolte des surnageants, les cellules sont rincées 2X au PBS préchauffé à 37°C, puis mises en présence de NaOH 0,5 N (1 ml/puits) afin d'extraire les protéines.



Suite à une incubation de 30 minutes minimum, on récupère le contenu des puits dans un eppendorf, en préparant également un blanc, constitué de 500 µl de NaOH 1 N dans 500 µl d'eau distillée, ainsi qu'un étalon, contenant 500 µl de BSA dilués dans 500 µl du NaOH 1 N.

Ces extraits peuvent également être conservés à -20°C.

Lors du dosage protéique, 2X 400 µl d'extraits sont prélevés dans des tubes de 5 ml auxquels sont ajoutés 2 ml d'une solution comprenant 100 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 %, 1 ml Na K tartrate 2 % et 1 ml CuSO<sub>4</sub> 1 %. Le tout est vortexé et incubé 15 minutes.

200 µl de folin dilué 2x dans de l'eau distillée sont alors déposés dans chaque tube de 30 secondes en 30 secondes.

Une demi-heure après, l'absorbance est lue à 660 nm, toujours de 30 secondes en 30 secondes, en rinçant le cuvette entre chaque lecture à l'aide d'une partie de l'échantillon suivant.

#### 2.2.5.4 Test ELISA.

##### Matériel.

- Surnageants des cellules stimulées.
- Kit ELISA pour MCP-1 humain (DCP00, R&D Systems, USA) comprenant les réactifs suivants :
  - 12 strips de 8 puits au fond desquels sont fixés des anticorps monoclonaux de souris anti-MCP-1 humain
  - Conjugué : anticorps polyclonaux anti-MCP-1 conjugués à une HRP
  - Solution standard de MCP-1 lyophilisé à reconstituer : 10 ng
  - Diluant de calibration RD5L concentré 5X
  - Solution de rinçage concentrée 25X
  - Réactif de coloration A : peroxyde d'hydrogène
  - Réactif de coloration B : chromogène (Tétraméthylbenzidine)
  - Solution STOP : acide sulfurique
- Lecteur de paques multi-puits (Ultramark, Bio-Rad, USA)

##### Méthode.

###### a) Préparation des réactifs.

- Solution de rinçage 1X : diluer la solution stock 25X dans l'eau distillée. Mélanger à température ambiante.
- Diluant de calibration RD5L 1X : diluer 20 ml du stock dans 80 ml d'eau distillée.
- Solution standard de MCP-1 : reconstituer le contenu lyophilisé du flacon dans 5 ml de diluant de calibration 1X

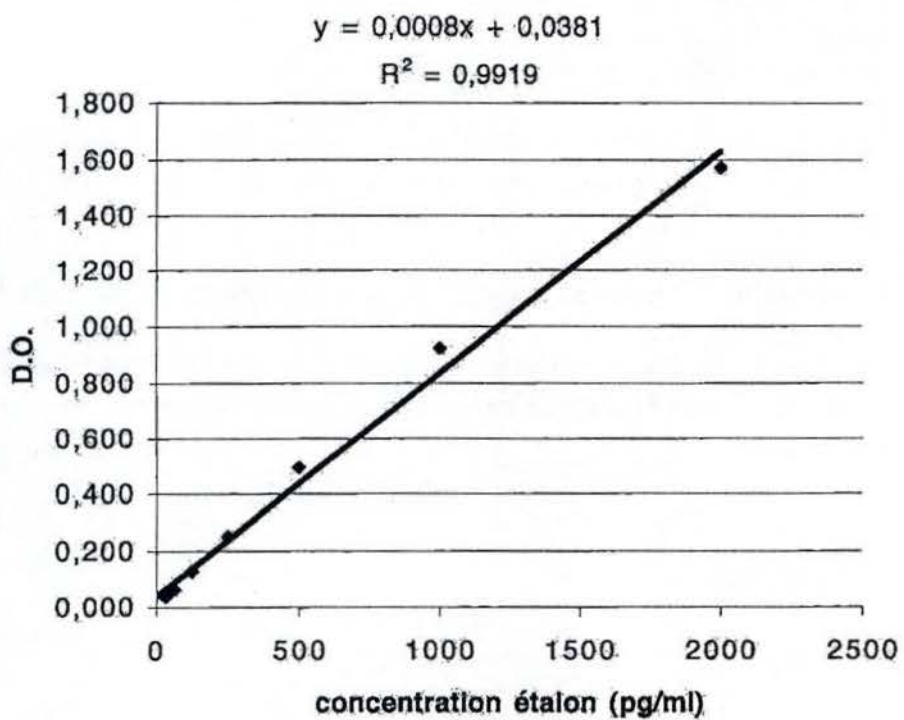


Figure 2.4 : Exemple de droite d'étalonnage provenant d'un kit R&D Systems permettant de mesurer la concentration en MCP-1 de chaque échantillon.

Agiter légèrement pendant 15 minutes.

b) Dosage de MCP-1.

Pour pouvoir par la suite connaître avec précision la concentration de MCP-1 dans chaque échantillon, il est nécessaire d'établir une droite d'étalonnage. (figure 2.4)

Celle-ci est réalisable à partir de la solution standard de MCP-1 reconstituée, que l'on dilue de 2 en 2 dans du diluant de calibration, afin d'obtenir une courbe standard comprenant des concentrations allant de 2000 pg/ml à 31,25 pg/ml.

Un blanc, ne contenant que du diluant de calibration, est également réalisé.

200 µl de chaque échantillon, du blanc et des différentes concentrations du standard sont ensuite déposés dans les puits, au fond desquels les anticorps sont fixés par simple liaison non spécifique entre leur partie Fc (figure 2.5) et le polystyrène, de nature hydrophobe.

Le tout est couvert et incubé 2 heures à température ambiante.

Suite à cela, ces puits sont décantés et lavés 3X avec 300 µl de solution de rinçage pour ensuite y déposer 200 µl d'anticorps anti-MCP-1 conjugués à une peroxidase.

Après 1 heure d'incubation, 3 lavages sont une fois de plus effectués avec la solution de rinçage, après quoi sont ajoutés 200 µl de solution de coloration. Celle-ci se compose de réactif A (peroxyde d'hydrogène) mélangé à la même quantité de réactif B (tétraméthylbenzidine), et doit être préparée dans l'obscurité, 15 minutes avant utilisation.

20 minutes plus tard, la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 50 µl de solution STOP, et l'absorbance est lue à deux longueurs d'onde différentes : 450 nm et 570 nm, la première étant la longueur d'onde de mesure, l'autre, la longueur d'onde de référence.

Ces résultats sont finalement comparés à ceux du Folin afin de mettre en évidence le rapport entre la quantité de MCP-1 produit (en pg) et l'ensemble des protéines (en µg).

### 2.2.6 Mesure de l'adhérence de cellules monocytaires humaines THP-1 sur des cellules endothéliales humaines HUVEC-C.

*In vivo*, l'adhérence des monocytes est un des premiers événements menant à la formation d'un athérome. De nombreux facteurs plasmatiques ou tissulaires peuvent en être la cause. Leurs mécanismes d'action peuvent cependant être de nature très différente, certains agissant préférentiellement sur les cellules endothéliales et d'autres sur les monocytes. Néanmoins, leurs effets se font en général ressentir simultanément de part et d'autre. Il va sans dire que ce phénomène est d'une complexité considérable et



que les acteurs y participant de manière directe ou indirecte restent encore peu connus. En outre, ce processus fait intervenir une telle gamme d'acteurs biochimiques qu'il représente un excellent test pour commencer notre étude sur le dysfonctionnement des cellules endothéliales.

Le but de cette expérience est donc de mesurer l'adhérence des monocytes THP-1 sur des HUVEC-C préalablement repiquées en plaque 96 puits et stimulées par différentes solutions d'activation, et cela par cytofluorimétrie. (*figure 2.6*)

#### Matériel.

- Plaque 96 puits (Costar, USA)
- F12K stock (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Chambre de Neubauer (Vel, Belgique)
- Bleu de Trypan (Sigma, USA)
- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM, pH 7,4
- Centrifugeuse
- RPMI (Gibco, BRL, Royaume-Uni)
- Vybrant<sup>TM</sup> Cell Adhesion Assay Kit (Calcéine AM 1 mM) (Molecular Probes)
- Cytofluostar (BMG)
- Molécules activatrices décrites au *point 2.2.1.2*

#### Méthode.

Les HUVEC-C sont tout d'abord repiquées la veille en plaque 96 puits, à raison de 20.000 cellules par puits.

Le jour de l'expérience, celles-ci sont rincées au F12K stock pour ensuite être mises en présence de différentes solutions de stimulation, et cela pendant un temps d'incubation désiré.

Deux heures avant la fin de l'incubation, les THP-1 sont préparés de la manière suivante :

Les cellules monocytaires en suspension dans du RPMI + 10 % sérum sont tout d'abord récoltées. Quelques dizaines de  $\mu$ l de cette suspension sont mis de côté et serviront au comptage. Le reste est centrifugé.

On lave ensuite le culot avec 10 ml de PBS et on en prélève une certaine quantité dans le but d'obtenir le nombre de THP-1 voulu dans un volume final de 10 ml.

Une petite partie est conservée pour les blancs, qui auront comme fonction de mettre en évidence une éventuelle fluorescence basale des HUVEC-C ou des THP-1, tandis que le reste de la suspension est marqué à la calcéine AM (concentration finale : 5  $\mu$ M). Ce marquage se déroule à 37°C, dans l'obscurité, pour préserver la fluorescence, et dure 30 minutes, période durant laquelle on viendra délicatement mélanger la solution toutes les 10 minutes.

Suivent alors trois rinçages au RPMI (sans sérum) afin d'éliminer le surplus de calcéine. Les THP-1 sont finalement resuspendus dans du F12K stock de manière à obtenir une densité cellulaire de 1.500.000 cellules par ml.

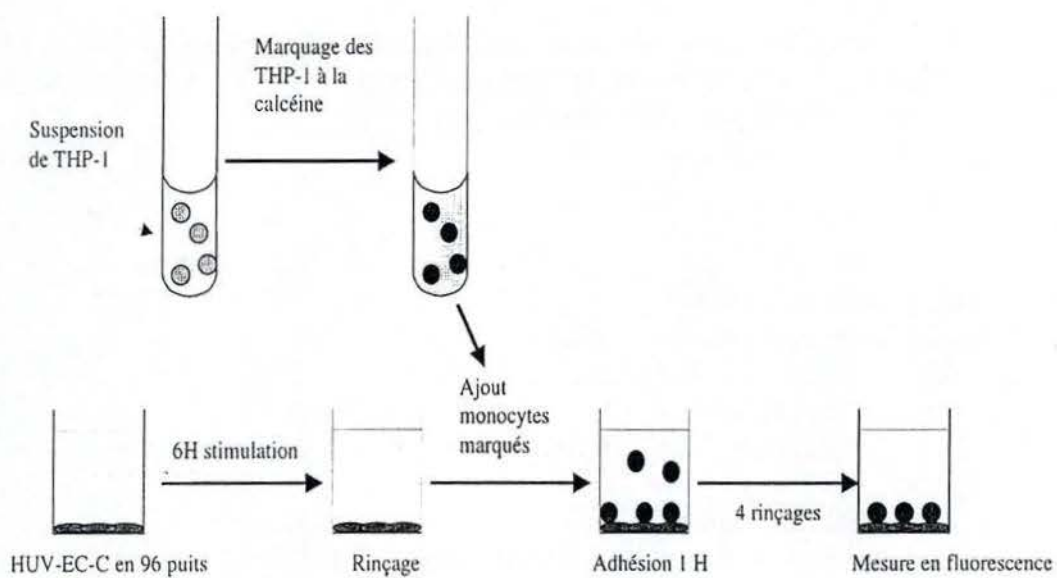


Figure 2.6 : Schéma illustrant le principe du test d'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales en plaque 96 puits.

Vient ensuite l'étape du dépôt de ces THP-1 sur les cellules endothéliales stimulées : ces dernières sont dans un premier temps rincées au F12K stock, pour qu'y soient finalement déposés 100  $\mu$ l de THP-1 marqués par puits. On déposera également 100  $\mu$ l de THP-1 non marqués dans les puits destinés aux blancs, ainsi que 100  $\mu$ l de THP-1 marqués que nous appellerons «100 % » puisqu'ils ne seront pas rincés et qu'ils nous permettront donc de mesurer la fluorescence totale de 150 000 THP-1 marqués à la calcéïne.

Après une heure d'incubation à 37°C, les puits sont délicatement décantés et rincés 3X avec 200  $\mu$ l de F12K stock préchauffé, à l'exception des blancs et des 100 %. On ajoute ensuite 100  $\mu$ l de PBS dans ces derniers puits ou 200  $\mu$ l dans les autres.

La fluorescence contenue dans les différents puits est alors lue à l'aide d'un cytofluostar, pour une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

En se référant aux 100 %, la fluorescence des puits nous permettra d'évaluer le nombre de THP-1 ayant adhéré aux cellules stimulées, et donc l'effet activateur des produits testés sur celles-ci.

---

## 3 Résultats et discussion.

---



Nous avons jusqu'ici décrit les événements majeurs intervenant dans le développement de cette pathologie trop fréquente qu'est l'athérosclérose, et insisté sur la notion de dysfonctionnement endothélial, qui joue clairement un rôle dans les étapes précoces de l'athérogenèse.

Le dysfonctionnement endothélial peut avoir des origines très variées : exposition à des forces hémodynamiques, à des excès de lipoprotéines athérogènes,...

Dans ce travail, nous nous focaliserons sur deux molécules qui pourraient bien, selon les données récentes de la littérature, induire un dysfonctionnement endothélial, mais via des mécanismes encore non élucidés.

La première n'est autre que l'homocystéine, acide aminé connu depuis longtemps pour être étroitement lié au risque d'athérosclérose. Une deuxième forme d'homocystéine, la thiolactone, sera également testée.

La seconde est un produit de l'oxydation des LDL attirant de plus en plus l'attention de bon nombre d'équipes de recherche à travers le monde biomédical. Il s'agit de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

## 3.1 Choix du modèle cellulaire.

### 3.1.1 Les HUVEC-C.

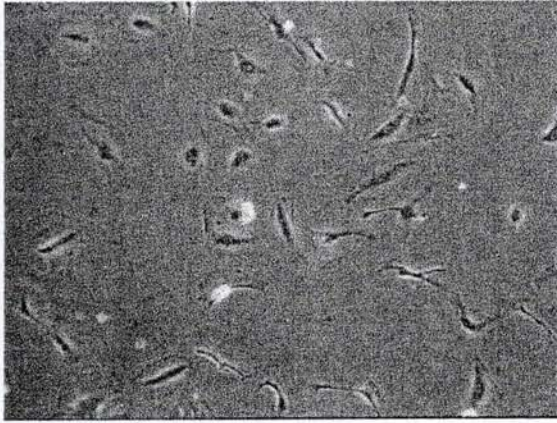
Afin d'étudier *in vitro* l'impact des deux molécules d'intérêt citées ci-dessus sur le dysfonctionnement endothélial, il était avant tout nécessaire de définir le type de cellules qui allaient être utilisées au cours des différentes expériences.

Le choix d'un modèle cellulaire n'est en général pas chose simple. Il faut en effet tenir compte de nombreux paramètres tant biologiques que pratiques ou économiques, tels que la simplicité du protocole de culture, les informations disponibles dans les banques de données ou encore le coût des facteurs de croissance ou des milieux nécessaires à la culture.

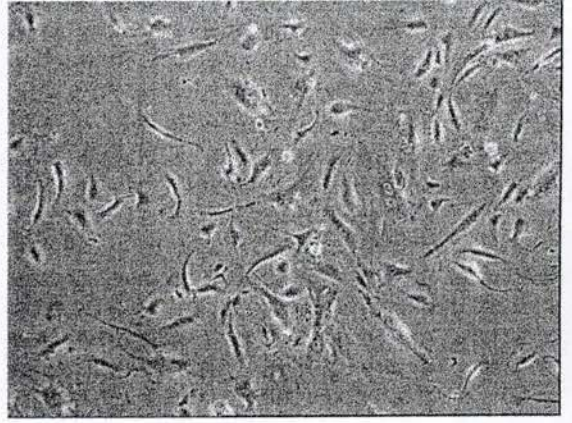
Depuis quelques années maintenant, une équipe de recherche de l'URBC se consacre à la compréhension des mécanismes cellulaires pouvant mener au développement de l'athérosclérose. Pour cela, le modèle utilisé jusqu'ici était un modèle murin : les **b-END5**. Cette lignée cellulaire, issue de cerveau de souris, était au coeur du projet PAI (Pôle d'Attraction Interuniversitaire), réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. P. Holvoet de la KUL et l'équipe du Pr. Cl. Remacle de l'UCL. Elle présentait entre autres l'avantage de rendre envisageable des travaux *in vivo* sur des souris. Ces dernières, malgré leur résistance naturelle à l'athérosclérose, peuvent en effet être modifiées génétiquement pour favoriser le développement de lésions précoces. C'est le cas des souris déficientes pour l'ApoE.

Mais il existe également quelques lignées cellulaires endothéliales humaines commercialement disponibles et constituant d'excellents modèles dans le cadre de l'athérosclérose.

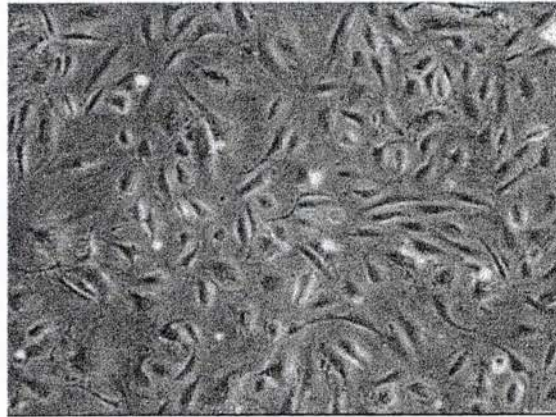
A.



B.



C.



*Figure 3.1* : Micrographies de cellules HUVEC-C, cultivées dans du milieu F12K complet (avec Hepes, facteurs de croissance et 10 % de sérum), correspondant à la génération 19,5. **A** : HUVEC-C non confluentes. **B** : HUVEC-C sub-confluentes. **C** : HUVEC-C à confluence et prêtes à être repiquées.

Parmi ces lignées, celle qui conviendrait *a priori* le mieux à cette problématique est celle des **HCAEC** (human coronary arterial endothelial cells). Idéales de par leur origine artérielle, elles nécessitent toutefois un milieu de culture très riche en facteurs de croissance. Cela les active de manière constitutive et rend leur culture assez coûteuse. De plus, on observe une grande variabilité entre les souches.

Il existe également des souches de cellules endothéliales immortalisées grâce à un croisement avec des cellules de carcinome. C'est notamment le cas des **EA.hy926** développées par Edgell et al. en 1983. On évite habituellement l'utilisation des ces dernières en raison d'éventuelles interférences dues aux cellules de carcinome.

Mais le modèle cellulaire le plus souvent mentionné dans la littérature en ce qui concerne l'étude du dysfonctionnement des cellules endothéliales est celui des **HUVEC** (human umbilical vein endothelial cells). Ces cellules présentent cependant un inconvénient majeur : il s'agit de primo-cultures, c'est à dire de cellules endothéliales prélevées *ex vivo* sur des veines de cordons ombilicaux humains, dont la culture est délicate et limitée à deux ou trois générations. Elles sont, qui plus est, d'origine veineuse. Or, l'athérosclérose est une pathologie touchant exclusivement les artères. On sait en outre qu'il existe *in vivo* comme *in vitro* une très grande hétérogénéité au sein des cellules endothéliales, même pour des cellules ayant une même origine anatomique.

Notre choix s'est alors porté sur les **HUVEC-C**. Celles-ci proviennent en réalité d'HUVEC ayant un potentiel prolifératif plus élevé. Disponibles à l'ATCC, elles sont cultivées dans du milieu F12K enrichi avec 10 % de sérum de veau foetal ainsi qu'avec des facteurs de croissance endothéliaux provenant d'hypophyse bovine. Elles sont ainsi capables de se diviser pour atteindre jusqu'à 50 générations.

Ces cellules ont été définies par l'ATCC comme étant effectivement des cellules endothéliales via notamment la mise en évidence du facteur de Von Willebrand.

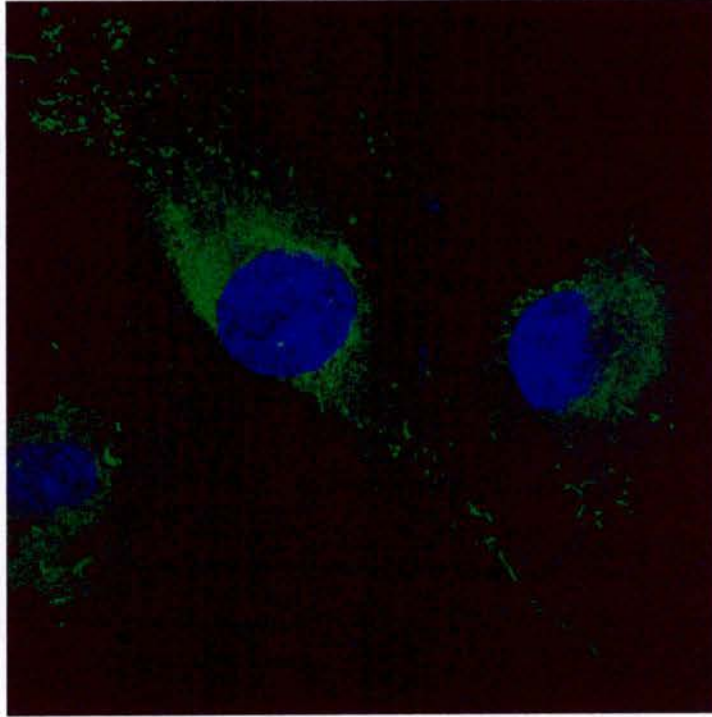
Les conditions de culture des HUVEC-C sont détaillées dans les matériels et méthodes au *point 2.1.1.1*. La *figure 3.1* montre la morphologie de ces cellules au cours du temps, après repiquage.

### 3.1.2 Mise en évidence du facteur de Von Willebrand.

Le facteur de Von Willebrand (vWF) est une molécule pro-agrégante, synthétisée et stockée exclusivement par les cellules endothéliales, au niveau des corps de Weibel-Pallade, corpuscules propres aux cellules endothéliales.

Sa sécrétion permet l'agrégation des plaquettes à l'endothélium en interagissant avec une glycoprotéine de la membrane plaquettaire. Le vWF doit pour cela s'associer au facteur VIII de la voie de coagulation. C'est d'ailleurs pour cette raison que, par abus de langage, la méthode utilisée pour le mettre en évidence est souvent appelée « marquage du facteur VIII ».

Cette technique, décrite au *point 2.1.1.3*, permet de réaliser des micrographies au microscope confocal à partir de cellules HUVEC-C marquées à l'aide d'un anticorps anti-vWF humain.



*Figure 3.2* : Micrographies, obtenues par immunocytochimie à fluorescence couplée à de la microscopie confocale, de cellules HUVEC-C marquées avec un anticorps anti-facteur de Von Willebrand humain.

### Résultats.

La *figure 3.2* montre quelques-unes de ces micrographies, sur lesquelles on observe le marquage, par fluorescence, de petits corpuscules assez denses dans le cytoplasme des cellules endothéliales. Ces corpuscules sont les corps de Weibel-Pallade, qui contiennent le facteur de Von Willebrand, caractéristique des cellules endothéliales.

Cette expérience nous permet donc de caractériser les HUVEC-C et d'affirmer avec certitude qu'il s'agit bien de cellules endothéliales.

## 3.2 Étude du comportement des cellules endothéliales en présence d'homocystéine.

### 3.2.1 Cytotoxicité de l'homocystéine.

Les molécules d'intérêt dont la toxicité sur les HUVEC-C a été testée, sont l'homocystéine et l'homocystéine thiolactone. Les conditions de préparation et de stockage de ces molécules sont expliquées dans les matériels et méthodes au *point 2.2.1.2*. Pour rappel, les deux formes d'homocystéine sont préparées fraîchement dans du milieu de culture F12K stock (la nomenclature utilisée pour les différents milieux de culture est expliquée au *paragraphe 2.1.1.1 – point a*).

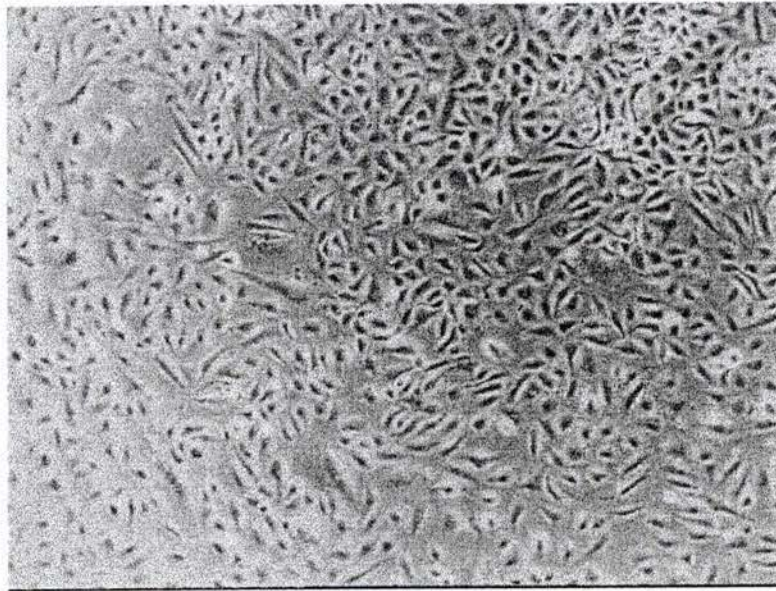
Tester la cytotoxicité de ces molécules nous permettra par la suite de s'assurer que leurs effets observés sur les cellules durant nos expériences, ne sont pas dus à un début de mortalité, mais bien à une réelle activation. Éventuellement, cela permettra aussi de déterminer les concentrations à ne pas dépasser si on veut éviter ces effets cytotoxiques indésirables.

Pour ce faire, les cellules ont tout d'abord été incubées en présence de chacune des deux molécules testées, pendant des temps de stimulation correspondant à ceux utilisés lors de nos expériences. Les concentrations testées étaient, elles aussi, représentatives de celles employées au cours des expériences.

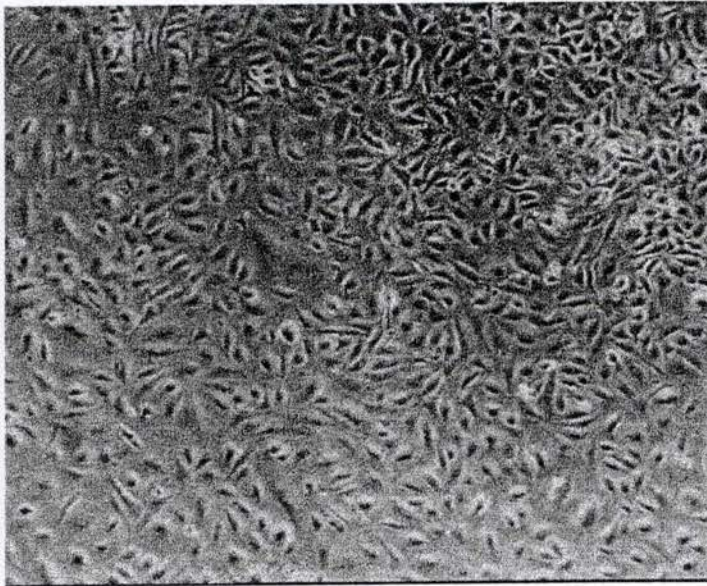
La toxicité de nos molécules d'intérêt sur les HUVEC-C fut ensuite testée de plusieurs manières.

La première méthode consiste à colorer les cellules stimulées, au bromure d'éthidium et à l'acridine orange. Cette technique nous permet de distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes. Le pourcentage de cellules mortes par rapport aux vivantes nous permet d'évaluer la cytotoxicité des deux agents testés.

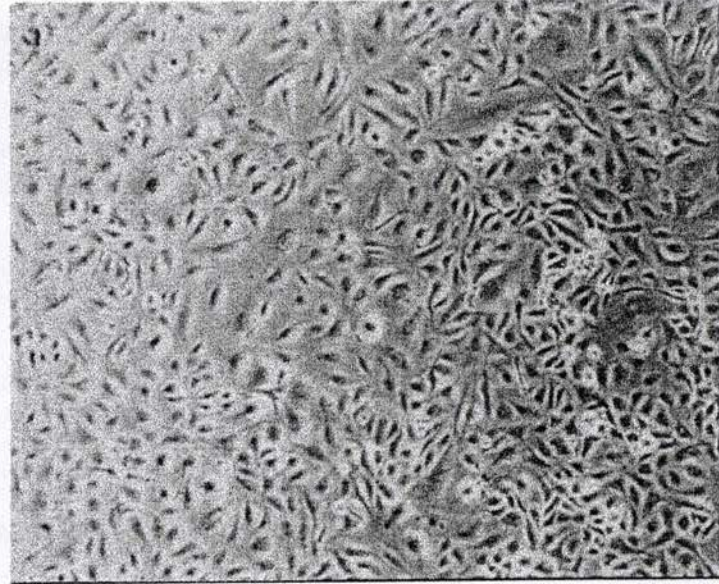
Une autre méthode consiste simplement à comparer les cellules endothéliales stimulées ou non, grâce à des micrographies en contraste de phase. Leur nombre et leur morphologie sont indicatives de leur état.



**A** : Contrôle (F12K stock)



**B** : Homocystéine 500 M



**C** : Homocystéine thiolactone 500 μM

*Figure 3.3* : Micrographies en contraste de phase de cellules HUVEC-C stimulées ou non avec de l'homocystéine. **A** : Cellules contrôles : HUVEC-C incubées 6 heures dans du milieu F12K stock. **B** : Cellules HUVEC-C stimulées 6 heures avec de l'homocystéine 500 μM. **C** : Cellules HUVEC-C stimulées 6 heures avec de l'homocystéine thiolactone 500 μM.

Contrôle	100%
TNF alpha	89%
Homocystéine 100 $\mu$ M	85%
Homocystéine 500 $\mu$ M	103%
Homocystéine thiolactone 100 $\mu$ M	111%
Homocystéine thiolactone 500 $\mu$ M	102%

*Figure 3.4 :* Résultat d'un dosage de type Bradford réalisé sur des extraits cellulaires d'HUVEC-C stimulées ou non à l'homocystéine ou à l'homocystéine thiolactone. Les résultats correspondent au rapport en pourcentage entre la biomasse de cellules stimulées à l'homocystéine ou à l'homocystéine thiolactone, par rapport à la biomasse de cellules non stimulées.

On peut également évaluer les effets néfastes de ces facteurs sur les HUVEC-C, par un dosage protéique, de type Bradford par exemple, qui donne la biomasse finale après stimulation.

### Résultats.

Les concentrations utilisées pour réaliser ce test varient de 100  $\mu\text{M}$  à 500  $\mu\text{M}$ . Les temps d'incubation ne dépasseront, quant à eux, pas 6 heures.

La coloration au bromure d'éthidium et à l'acridine orange ne met en évidence qu'un très faible taux de mortalité dû à l'une ou l'autre forme d'homocystéine. En effet, dans un cas comme dans l'autre, les pourcentages de cellules mortes par rapport aux vivantes sont peu élevés, c'est à dire toujours inférieurs à 10 %.

Des micrographies en contraste de phase de cellules HUVEC-C, incubées ou non en présence d'homocystéine et d'homocystéine thiolactone ne révèlent pas d'effet spectaculaire (*figure 3.3*).

Cette absence de cytotoxicité a été confirmée par des dosages de protéines (*figure 3.4*).

### Discussion.

Il apparaît ainsi que les deux formes d'homocystéine testées ne représentent qu'un risque minime de cytotoxicité pour les cellules, compte tenu du faible taux de mortalité qu'elles engendrent chez ces dernières.

Pour ces deux agents activateurs, la stimulation pourra donc avoir lieu à des concentrations élevées, allant jusqu'à 500  $\mu\text{M}$ , ainsi que pour des temps d'incubation importants comme 6 heures.

## 3.2.2 Effets de l'homocystéine sur les cellules endothéliales : Activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B.

NF $\kappa$ B est un facteur de transcription présentant un large spectre d'action. En effet, comme décrit au *point 1.3.3.3* de l'introduction, NF $\kappa$ B peut être activé par la présence dans le milieu de nombreux facteurs biochimiques, et est susceptible d'induire l'expression de bon nombre de gènes. Parmi ceux-ci, certains semblent être étroitement associés au phénomène d'athérosclérose. C'est la raison pour laquelle l'activation de ce facteur de transcription est habituellement détectée au niveau des lésions athéromateuses, comme l'a d'ailleurs décrit Brand en 1996.

L'étude de ce facteur transcriptionnel peut avoir lieu de plusieurs façons : son activation peut en effet être détectée par colorimétrie, tandis qu'une technique immunocytochimique permet de mettre en évidence sa translocation vers le noyau. Ces deux méthodes sont plus amplement expliquées aux *points 2.2.1* et *2.2.2* des matériels et méthodes.

Pour détecter une éventuelle action activatrice des deux formes d'homocystéines envers les HUVEC-C, l'activation de NF $\kappa$ B constituera un bon marqueur du



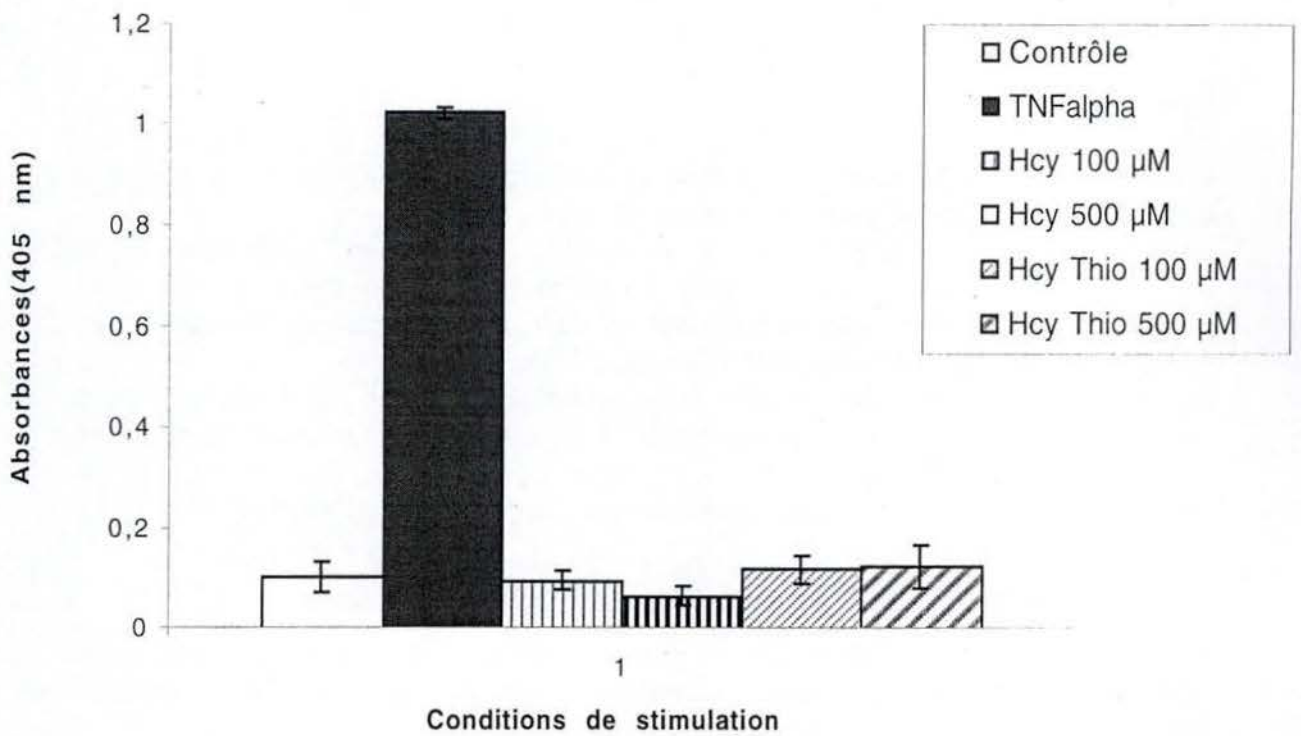


Figure 3.5 : Dosage de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B chez des HUVEC-C stimulées ou non à l'homocystéine ou à l'homocystéine thiolactone. Les effets de ces molécules activatrices sont évalués par dosage colorimétrique en multipuits et les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm. Les cellules ont été incubées 2 heures dans des solutions d'homocystéine ou d'homocystéine thiolactone, à une concentration de 100  $\mu$ M et 500  $\mu$ M. Pour le CTL-, les cellules ont été incubées 2 heures dans du milieu F12K stock (F12K + hepes + antibiotiques + fongizone), alors que pour le CTL+, les cellules ont été stimulées avec du TNF $\alpha$  (10 ng/ml).

dysfonctionnement endothélial et nous permettra de juger utile ou non une étude plus approfondie de ces deux molécules.

### 3.2.2.1 Dosage colorimétrique de NFκB.

Pour ce test, des HUVEC-C, à confluence dans des T25, ont tout d'abord été rincées avec du milieu F12K stock, puis stimulées à l'aide d'homocystéine ou d'homocystéine thiolactone 100 μM et 500 μM. Pour ces 4 conditions de stimulation, le temps d'incubation était de 2 heures.

Un contrôle négatif (CTL-) ainsi qu'un contrôle positif (CTL+) ont également été réalisés. Pour le premier, les cellules ont été incubées 2 heures dans du F12K stock contenant des antibiotiques, de la fongizone et de l'Hepes. Le CTL+ sert quant à lui à vérifier cette capacité qu'ont les cellules à répondre à stimulus externe. Il permet également de nous assurer qu'un éventuel manque de résultats satisfaisants n'est pas dû à une erreur de manipulation. Le CTL+ utilisé dans le cadre de ce test est une stimulation des cellules au TNFα, cytokine pro-inflammatoire reconnue depuis longtemps pour induire la voie de transduction du signal menant à l'activation de NFκB. Le TNFα est utilisé à une concentration de 10 ng/ml.

Il est à noter que le CTL-, le CTL+ et l'ensemble des autres échantillons ont été traités de manière tout à fait similaire, tant au niveau de l'extraction qu'au niveau du dosage en tant que tel.

### Résultats.

L'histogramme repris dans la *figure 3.5* met en évidence l'activation ou l'absence d'activation de NFκB pour chacune des conditions de stimulation.

Les résultats sont exprimés en absorbances à 405 nm. On constate immédiatement la réponse élevée du CTL+. Les cellules sont donc réceptives aux agents stimulateurs tels que le TNFα, et cette activation est intense (environ 1000 % d'activation par rapport au CTL-). Les cellules stimulées à l'homocystéine ou à l'homocystéine thiolactone ne montrent quant à elles qu'une très faible activation de NFκB, que ce soit pour une concentration de 100 μM ou de 500 μM. Les valeurs d'absorbance restent en effet extrêmement proches de celles obtenues pour le CTL-. On note cependant une légère augmentation des valeurs relatives à l'homocystéine thiolactone par rapport à celles de l'homocystéine, mais les écarts-type rendent cette différence, si minime soit-elle, non significative.

### 3.2.2.2 Étude de la translocation de NFκB vers le noyau par immunocytochimie.

Une fois la cellule activée, NFκB est libéré de son inhibiteur IκB et peut ainsi se diriger vers le noyau où il pourra ainsi assurer son rôle de facteur de transcription et enfin induire l'expression de certains gènes.

Dans ce test, nous tentons de mettre en évidence cette translocation au moyen d'une technique immunocytochimique couplée à la microscopie confocale.

Des contrôles positifs et négatifs sont également réalisés : les premiers consistent en une mise au repos des cellules pendant 1 H dans du milieu F12K stock, alors que les seconds correspondent à une incubation de 1 H dans du TNFα (10 ng/μl). La stimulation nécessite dans ce cas des HUVEC-C repiquées préalablement en plaques 24 puits sur couvre-objet et pas trop confluentes.

Après l'échec du test colorimétrique, nous avons jugé intéressant de soumettre nos cellules à des stimulations quelque peu différentes : d'une part, les deux types d'homocystéine sont testées à une concentration intermédiaire de 200 μM. D'autre part, deux temps de stimulation sont prévus : 1 heure et 2 heures, afin de s'assurer que lors du test colorimétrique, pendant lequel les cellules étaient incubées 2 heures, nous n'étions pas passés au-delà du temps nécessaire à l'activation de NFκB.

#### Résultats.

Les cellules HUVEC-C marquées avec un anticorps anti-p65 ont été observées au microscope confocal (micrographies non montrées).

Les cellules correspondant aux CTL- ont le cytoplasme bien marqué par la fluorescence, tandis que le noyau reste non marqué. Cela signifie que NFκB n'a pas subi de translocation vers le noyau et que la cellule n'a pas été activée.

Il n'en est pas de même pour le CTL+. Chez celui-ci, contrairement au CTL-, c'est le noyau qui est marqué par la fluorescence et non le cytoplasme. Cela prouve la présence du facteur de transcription dans le noyau et par conséquent son activation.

Au niveau des cellules stimulées avec l'une ou l'autre forme d'homocystéine, les images sont semblables à celles obtenues pour les CTL-, et ce quel que soit le temps d'incubation (1 heure ou 2 heures).

### 3.2.3 Discussion.

On sait maintenant que la présence d'homocystéine ou d'homocystéine thiolactone dans le milieu n'influence en rien l'état d'activité de NFκB.

Pour compléter les deux tests réalisés ci-dessus, il faut savoir qu'un test d'adhérence ainsi qu'un test ELISA pour MCP-1 ont également été réalisés au sein du laboratoire et sont décrits plus explicitement par Cindy Gustin dans un mémoire parallèle à celui-ci. Ce test d'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales a été réalisé dans les conditions suivantes : les deux formes d'homocystéine ont été diluées à des

concentrations de 100 et 500  $\mu\text{M}$  et mises en présence des cellules durant un temps d'incubation de 6 heures. Pour le test ELISA, l'expression de MCP-1 a été mesurée après 6 heures et pour des concentrations en homocystéine de 100  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$ . Les résultats de ces deux expériences furent encore une fois décevants.

Ces résultats ne concordent pourtant pas avec les données mises à notre disposition par la littérature.

En effet, l'activation de NF $\kappa$ B chez des patients atteints d'hyperhomocystéinémie a été proposée par Koch et al. en 1998. Mercié et al. (2000) ont ensuite confirmé l'activation de NF $\kappa$ B chez des HUVECs stimulées avec de l'homocystéine et ce grâce à différentes méthodes (EMSA, western blot, microscopie confocale,...). D'autre part, les travaux de Dudman et al. ont par exemple prouvé l'augmentation de l'adhérence des leucocytes sur des cellules HUVEC incubées en présence d'homocystéine.

Enfin, plus récemment, Sung et al. (2001) ont prouvé une augmentation de l'expression de MCP-1 par des cellules endothéliales HUVEC-C, lignée cellulaire à partir de laquelle nous travaillons, stimulées 6 heures avec de l'homocystéine. Leurs conseils, concernant notamment le stockage de l'homocystéine, ne nous ont malgré tout pas permis d'obtenir des résultats semblables aux leurs.

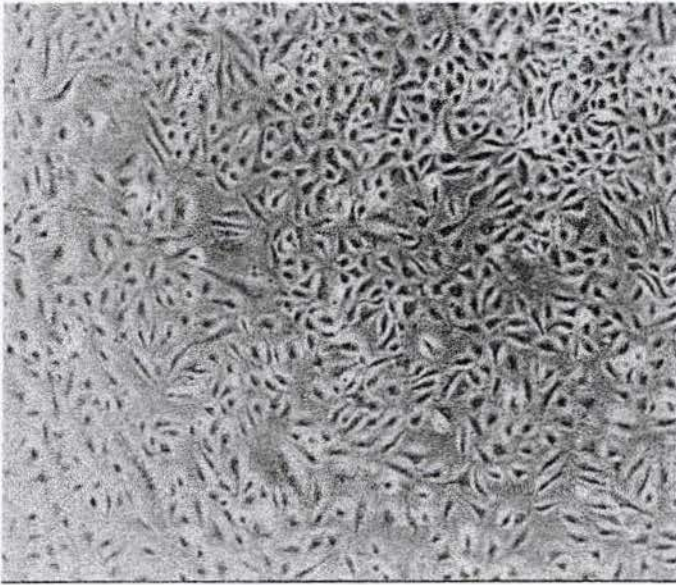
En conclusion, nous avons pris la décision de nous investir d'avantage dans l'étude d'une deuxième molécule présumée pro-athérogène : l'isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ .

### 3.3 Étude du comportement des cellules endothéliales en présence d'isoprostane-8.

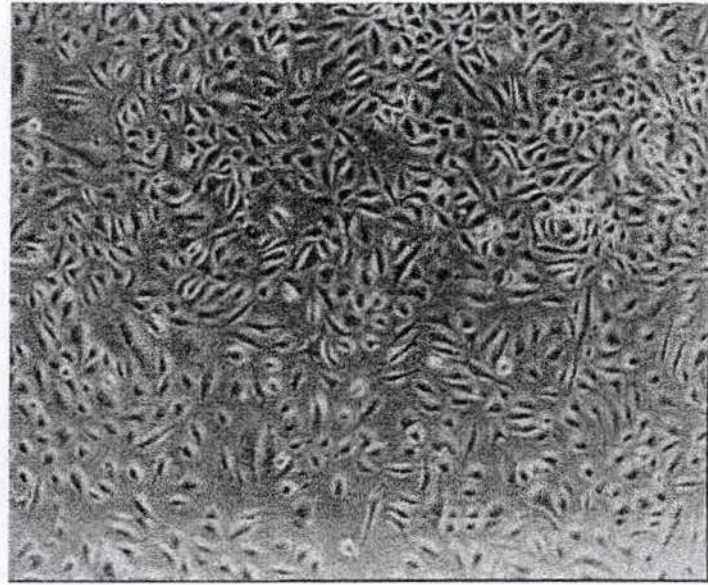
Pour mettre en évidence les effets de l'isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  sur les HUVEC-C, on s'est tout d'abord penché sur des réponses qu'on pourrait qualifier de post-traductionnelle : induction de l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales et expression de MCP-1. On s'est ensuite intéressé à l'activation de certains facteurs de transcription, puis aux voies de transduction du signal des MAPK, pour enfin remonter jusqu'à la perception du stimulus, c'est à dire le récepteur membranaire.

Les solutions de stimulation destinées à l'ensemble de ces expériences sont réalisées à partir du stock d'isoprostane de 10 mM dissous dans de l'éthanol et dilué dans du milieu F12K stock + 10 % de sérum.

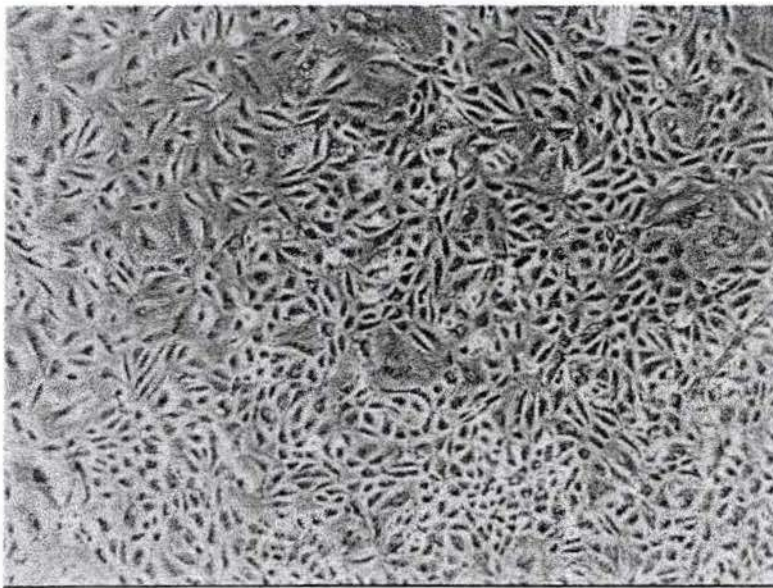
De plus, il faut rappeler que les solutions de stimulation sont réalisées à partir d'8-iso-PGF $_{2\alpha}$  dissous dans l'éthanol 100 %. L'éthanol peut donc avoir sur les cellules des effets secondaires indépendants de ceux de l'isoprostane. C'est la raison pour laquelle on réalisera, en plus des contrôles positifs, négatifs et avec sérum, des contrôles éthanol sans sérum (CTL+EtOH) et des contrôles éthanol avec sérum (CTL+EtOH+S) afin de dissocier les effets de l'un et de l'autre. Pour ces deux derniers, l'éthanol 100 % doit être dilué de manière identique à la solution d'isoprostane. À titre d'exemple, une solution de stimulation d'isoprostane 50  $\mu\text{M}$  demande pour CTL+EtOH+S une solution contenant 0,5 % d'éthanol et 10 % de sérum. En général, le CTL+S ainsi que le CTL+EtOH seront réalisés au moins une fois par type



**A** : Contrôle (F12K stock)



**B** : Contrôle isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>  
(F12K stock + 10 % sérum + 0,5 % éthanol)



**C** : Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 50 μM

*Figure 3.6* : Micrographies en contraste de phase de cellules HUVEC-C stimulées ou non avec de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. **A** : Cellules contrôles : HUVEC-C stimulées 6 heures dans du milieu F12K stock. **B** : Cellules HUVEC-C stimulées 6 heures dans du milieu F12K stock + 10 % de sérum + 0,5 % d'éthanol. **C** : Cellules HUVEC-C stimulées 6 heures avec de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 50 μM

Contrôle	100 %
Contrôle avec éthanol (2 heures)	96 %
PMA + ionomycine (2 heures)	90 %
Isoprostane 50 $\mu$ M (10 minutes)	64 %
Isoprostane 50 $\mu$ M (20 minutes)	82 %
Isoprostane 50 $\mu$ M (30 minutes)	104 %
Isoprostane 50 $\mu$ M (45 minutes)	85 %
Isoprostane 50 $\mu$ M (1 heure)	92 %
Isoprostane 50 $\mu$ M (2 heures)	92 %

*Figure 3.7* : Résultat d'un dosage de type Bradford réalisé sur des extraits cellulaires d'HUVEC-C stimulées ou non à l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Les résultats représentent le rapport en pourcentage entre la biomasse de cellules stimulées à l'isoprostane, et la biomasse de cellules non stimulées.

d'expérience. Une fois les effets du sérum et de l'éthanol dissociés, nous n'effectuerons plus qu'un CTL+EtOH+S.

Il reste à signaler que les CTL+ ont toujours été préparés dans du milieu sans sérum, cela afin d'éliminer les interférences pouvant être causées par ce dernier.

**Les résultats du CTL+ seront donc rapportés au CTL- simple, tandis que le CTL+EtOH+S fera office de CTL- pour les résultats de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> uniquement.**

### 3.3.1 Cytotoxicité de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

Avant de tester les effets de l'isoprostane sur les cellules endothéliales en culture, il fallait tout d'abord mesurer la toxicité de ce composé envers ces cellules. Comme pour l'homocystéine, la cytotoxicité a été mesurée selon les méthodes décrites au *point 3.2.1*, à savoir la coloration au bromure d'éthidium et à l'acridine orange et le dosage protéique de type Bradford. La morphologie en contraste de phase vient compléter ces données quantitatives.

#### Résultats.

La concentration de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> testée est de 50 μM, c'est à dire la concentration maximale qui sera utilisée lors des expériences ultérieures. Le temps d'incubation est de 6 heures, comme c'était le cas pour l'homocystéine. Afin d'évaluer la toxicité causée par l'éthanol, on a également mesuré la cytotoxicité d'un CTL EtOH.

La coloration au bromure d'éthidium et à l'acridine orange ne montre qu'une très faible toxicité de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> vis-à-vis des HUVEC-C : le taux de mortalité est en effet toujours inférieur à 10 %.

Il en va de même pour le CTL EtOH, pour lequel la cytotoxicité ne dépasse non plus jamais les 5 %.

Les micrographies en contraste de phases de la *figure 3.6* témoignent, elles aussi, de l'absence d'effet visible pour l'isoprostane et pour l'éthanol. Le dosage des protéines montre une légère réduction de la biomasse (*figure 3.7*). La faible valeur obtenue pour les cellules traitées à l'isoprostane-8 50 μM, pendant 10 minutes (64 %) résulte probablement d'un problème expérimental.

Face à ces résultats, la suite des expériences peut donc être réalisée sans crainte de voir les résultats altérés par des effets artéfactuels de cytotoxicité.

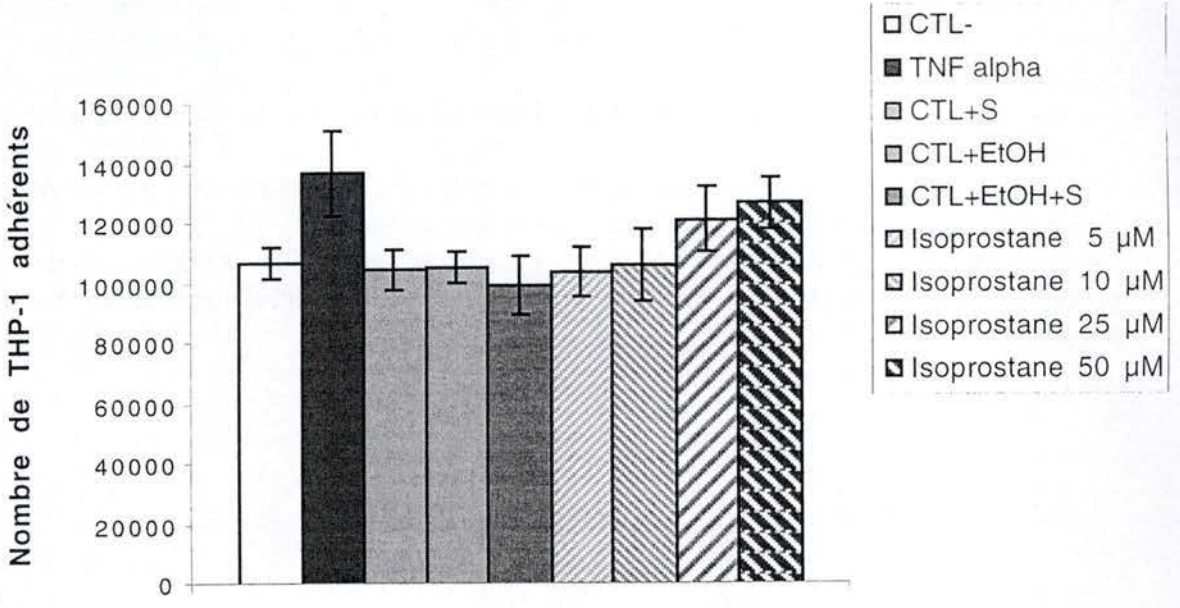
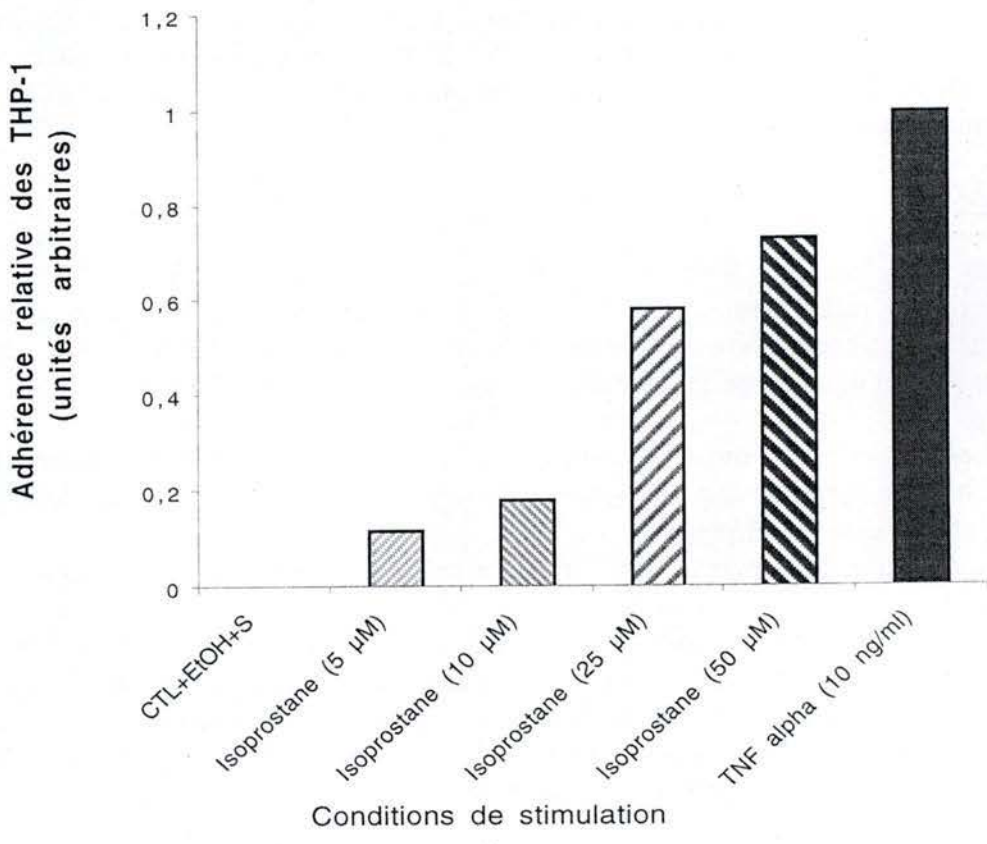
**A****B**

Figure 3.8 : Effets de l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes THP-1 aux cellules endothéliales HUVEC-C stimulées durant 6 heures avec des concentrations de 5, 10, 20 et 50 µM en isoprostane-8. Un CTL-, un CTL+S, un CTL+EtOH et un CTL+EtOH+S sont également réalisés. **A** : Résultats exprimés en nombre de THP-1 adhérents. **B** : Résultats exprimés en unités arbitraires représentant l'adhérence relative par rapport au CTL+.



### 3.3.2 Effets de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur les cellules endothéliales.

#### 3.3.2.1 Adhérence des monocytes THP-1 sur les cellules endothéliales HUVEC-C.

L'adhérence des monocytes est un événement majeur induit suite à l'activation des cellules endothéliales. Ce phénomène a lieu lors de réactions inflammatoires, comme c'est le cas notamment dans l'athérogenèse.

Il est bon à rappeler que l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence telles que certaines CAM ou sélectines et de molécules chémoattractantes comme MCP-1 par les cellules endothéliales stressées, entraîne une augmentation de l'adhérence et de la migration des monocytes qui, une fois dans le tissu subendothélial, se différencie en macrophages. Ces derniers, porteurs de récepteurs scavengers, se transforment alors en cellules spumeuses, après s'être chargés de lipides oxydés.

Afin de mettre en évidence ce phénomène *in vitro*, nous avons utilisé une approche quantitative qui consiste en un test d'adhérence en plaques multi-puits permettant de déterminer en fluorescence la proportion de cellules monocytaires adhérentes sur un tapis confluent de cellules endothéliales (voir point 2.2.6). La lignée monocyttaire humaine utilisée pour ce test est celle des THP-1, dont la culture est expliquée au point 2.1.2.

#### Résultats.

Dans cette expérience, nous avons testé l'adhérence de cellules stimulées 6 heures avec 5, 10, 25 et 50 μM d'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> dilué dans du F12K + 10 % de sérum. Un CTL+, constitué de TNFα (10 ng/ml), un CTL-, un CTL+S, ainsi qu'un CTL+EtOH+S, contenant 0,5 % d'éthanol, sont également réalisés. Pour chacune de ces conditions, l'adhérence est mesurée en quadruple.

Les unités de fluorescence sont alors converties en nombre de THP1 adhérents, grâce aux puits 100 %, dans lesquels est mesurée la fluorescence correspondant au nombre total de THP-1 déposés, c'est à dire 150.000.

Le schéma repris à la figure 3.8 A représente le nombre de THP-1 adhérents aux HUVEC-C tapissant 1 puits d'une plaque 96 puits, pour chaque condition de stimulation.

Pour le CTL+, environ 140.000 monocytes semblent avoir adhéré dans chaque puits. Le CTL-, le CTL+S et le CTL+EtOH+S en comptent environ 100.000, et on retrouve dans les puits stimulés à l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> une quantité croissante de cellules monocytaires adhérentes en fonction de la concentration en 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. A 50 μM, on observe une augmentation du nombre de monocytes adhérents, qui correspond à 128 % par rapport au CTL+EtOH+S.

Toujours pour cette même expérience, nous avons essayé d'exprimer les résultats non plus en nombre absolu de THP-1 adhérents au tapis cellulaire, mais en valeurs relatives. L'ordonnée représente une valeur arbitraire qui correspondent au rapport suivant :

$$y = \frac{\text{THP-1}_{\text{ISO}} - \text{THP-1}_{\text{CTL-}}}{\text{THP-1}_{\text{CTL+}} - \text{THP-1}_{\text{CTL-}}}$$

Ainsi, le CTL+EtOH+S vaut dans tous les cas 0 et le CTL+ (TNF $\alpha$ ) est fixé à 1. En analysant les résultats selon cette présentation, on observe une augmentation de l'adhérence des monocytes THP-1 sur le tapis cellulaire d'HUVEC-C à partir de faibles concentrations en 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ . L'augmentation est dose dépendante. En effet, le rapport est de 0,12 pour l'isoprostane-8 5  $\mu$ M, 0,18 pour l'isoprostane-8 10  $\mu$ M, 0,58 pour l'isoprostane-8 25  $\mu$ M et 0,73 pour l'isoprostane-8 50  $\mu$ M.

Ces résultats ont été confirmés au cours d'une deuxième expérience, dans laquelle l'adhérence de monocytes, sur des HUVEC-C préalablement stimulées 6 heures avec de l'isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  50  $\mu$ M, augmentait de 132 % par rapport au CTL+EtOH+S (résultats non montrés).

### Discussion.

Suite à ce test, on sait maintenant que l'isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  induit l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales HUVEC-C *in vitro*.

Cela confirme les observations faites par Leitinger et al. (2001), qui avaient prouvé l'induction de l'adhérence des monocytes U937 à des cellules endothéliales HUVEC et HAEC stimulées durant 4 heures avec de l'isoprostane-8 2.5, 5, 10 et 20  $\mu$ M. A 20  $\mu$ M, ils observèrent par exemple une augmentation de l'adhérence d'environ 250 % par rapport au CTL-. Cette équipe a également démontré que l'isoprostane-8 induisait l'adhérence des monocytes indépendamment de la E-sélectine et de VCAM-1.

Cette induction de l'adhérence nécessite entre autres l'expression par les cellules endothéliales de molécules chémoattractantes telles que MCP-1. C'est donc en toute logique que le test suivant sera un dosage du MCP-1 exprimé et sécrété par les cellules endothéliales dans le milieu.

#### 3.3.2.2 Expression de la molécule chemoattractante MCP-1.

L'induction de l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales laisse donc supposer que ces mêmes cellules voient leur expression et leur sécrétion en MCP-1 augmentée suite à la présence d'isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ .

Le taux de MCP-1 exprimée dans le milieu a été mesuré grâce à un test ELISA réalisé sur le surnageant des cellules stimulées. Ce test est commercialisé par la firme R&D Systems.

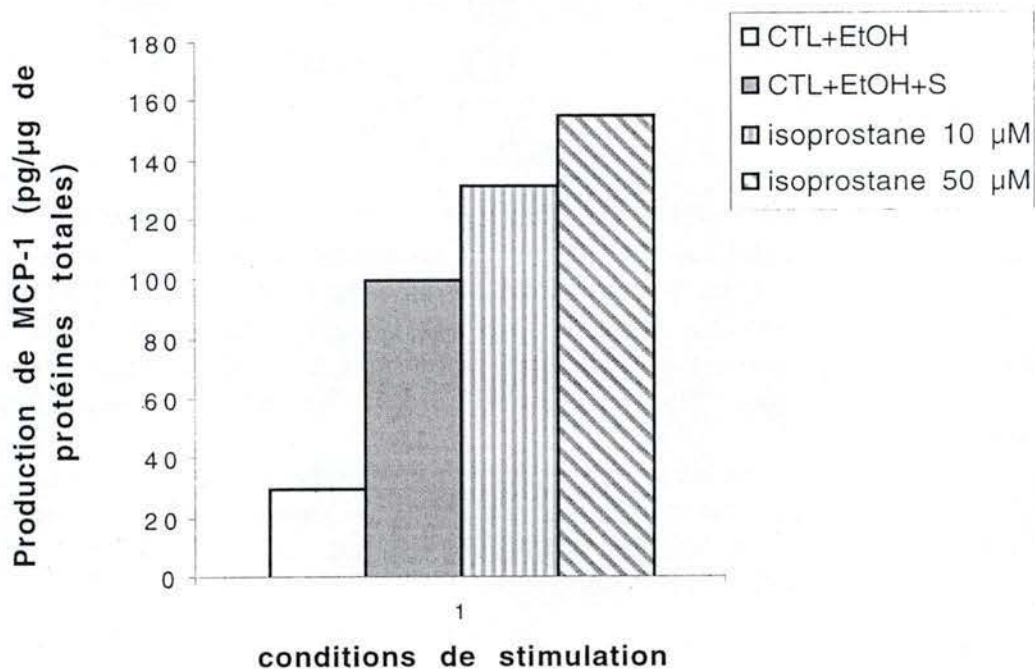
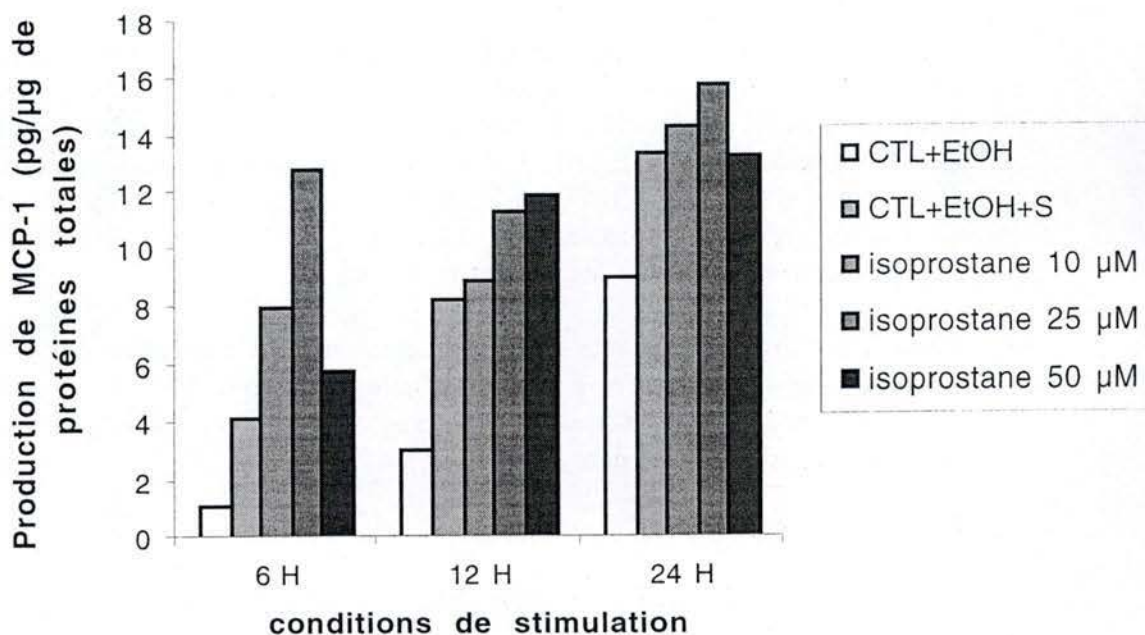
**A****B**

Figure 3.9 : **A** : Effet de l'isoprostane-8 sur l'expression de MCP-1 chez des HUVEC-C stimulées 6 heures avec de l'isoprostane-8 10 ou 50 μM. Les résultats sont exprimés en pourcentages, le CTL+EtOH+S étant fixé à 100 %. **B** : Effet de l'isoprostane-8 sur l'expression de MCP-1 chez des HUVEC-C stimulées 6, 12 et 24 heures, avec de l'isoprostane-8 10, 25 et 50 μM. Pour chaque temps, un CTL+EtOH et un CTL+EtOH+S sont réalisés.

### Résultats.

Une première expérience a tout d'abord été réalisée en testant un temps d'incubation (6 heures) et deux concentrations d'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (10 et 50 μM). Un CTL- et un CTL+EtOH+S sont également réalisés et TNFα (10 ng/ml) constitue une fois de plus le CTL+.

Celui-ci induit une expression de MCP-1 de plus de 3000 % par rapport au CTL-. Après 6 H, l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> induit, quant à lui, une libération de MCP-1 de 155 % par rapport au CTL+EtOH+S (*figure 3.9 A*) et cet effet est dose dépendant.

Ces résultats ont été reproduits au cours d'une deuxième expérience dans laquelle la sécrétion de MCP-1 dans le milieu a été mesurée après 6 H, 12 H et 24 H.

Si les HUVEC-C produisent continuellement du MCP-1 sous l'effet de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, le taux de MCP-1 dans leur surnageant doit donc normalement s'accumuler durant cette période totale de 24 H. Pour chaque temps, un CTL+EtOH+S a été testé, ainsi que trois concentrations de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> : 10 μM, 25 μM et 50 μM (*figure 3.9 B*).

Comme dans le test précédant, le CTL+ répond à une stimulation au TNFα par une réponse valant environ 3000 % du CTL-. Ce CTL+ n'est pas représenté sur le graphe pour une question de clarté des résultats. Les CTL+EtOH+S augmentent eux-aussi en fonction du temps, atténuant les effets de l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

Les résultats de la stimulation de 6 heures avec l'isoprostane confirment ceux de la première expérience, avec une activation par rapport au CTL+EtOH+S, la plus nette pour la concentration de 25 μM.

### Discussion.

Nous observons donc bien un effet inducteur de l'isoprostane-8 sur la production de MCP-1 par les cellules endothéliales et cet effet se marque surtout au temps d'incubation plus court. Les résultats pour l'isoprostane-8 50 μM sont cependant un peu surprenants et contradictoires avec l'expérience précédente. Il faudrait donc refaire encore une fois l'expérience en choisissant une cinétique plus rapide (4, 6 et 8 heures).

Tout comme l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales, l'expression de MCP-1 est induite par la présence d'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Mais pour avoir lieu, ces deux événements nécessitent l'activation de facteurs de transcription. Deux d'entre eux, connus pour être impliqués dans l'athérogenèse et décrits dans le *chapitre 1.3.3.3* ont été étudiés. Les résultats de ces tests sont exposés dans le chapitre suivant.

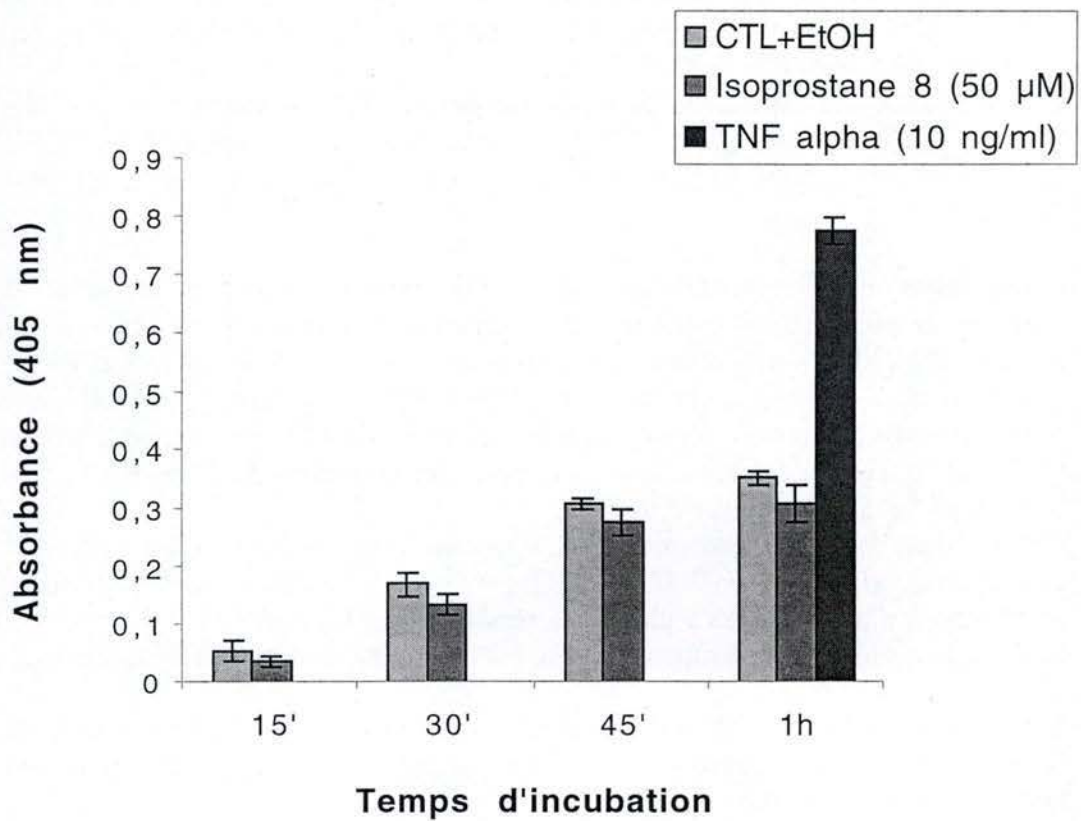


Figure 3.10 : Activation du facteur de transcription NFκB chez des HUVEC-C stimulées durant 15, 30, 45 minutes et 1 heure, avec de l'isoprostane-8 50 µM. L'activation est mesurée par dosage colorimétrique en multi-puits et les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm. Pour le CTL+, les cellules ont été stimulées 1 heure avec du TNFα (10 ng/ml). Un CTL+EtOH+S a été réalisé pour chaque temps.

### 3.3.2.3 Activation de facteurs de transcription.

#### a) Activation de NFκB.

Comme pour l'homocystéine, nous avons étudié l'activation de NFκB chez des HUVEC-C stimulées à l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. L'étude de l'activation de ce facteur de transcription a été réalisée grâce au même dosage colorimétrique que celui déjà utilisé pour l'homocystéine.

#### Résultats.

Pour ce test, les stimulations n'ont été faites qu'avec une concentration de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, mais selon une cinétique pour laquelle les différents temps d'incubation étant de 15, 30, 45, 60 et 120 minutes.

Cette fois, deux CTL+EtOH+S ont été réalisés, le premier à 15 min, le deuxième à 1 H. Cela a pour but de s'assurer que la durée d'incubation n'influence pas l'activation de NFκB chez les cellules au repos. Un CTL- ainsi qu'un CTL+ ont également été réalisés. Le CTL+ utilisé est encore une fois TNFα (10 ng/ml).

Le graphe repris par la *figure 3.10* représente l'absorbance à 405 nm lue dans les puits, pour chaque condition de stimulation.

La réponse du CTL+ atteint environ 220 % d'activation par rapport au CTL-. L'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, quant à lui, ne semble avoir aucun effet sur NFκB.

#### Discussion.

Au vu de ces résultats, on peut affirmer que l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> n'induit pas l'activation de NFκB.

Il semble donc que les effets produits par l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur les cellules endothéliales ne requièrent pas l'activation de ce facteur de transcription.

Signalons cependant que le test colorimétrique est basé sur l'anticorps anti-p65. Il révèle donc l'activation des dimères p50-p65, les plus fréquents. On ne peut donc pas exclure complètement l'activation d'autres formes du facteur NFκB.

Mais cette hypothèse semble peu probable, car Leitinger et al. (2001) ont également démontré qu'en présence d'isoprostane-8 10 μM, NFκB restait inactivé. Ils ont en effet montré par western blot l'absence de phosphorylation de IκB.

En conclusion, l'isoprostane-8 passe donc par une autre voie de signalisation et induit un ou plusieurs autre(s) facteur(s) de transcription.

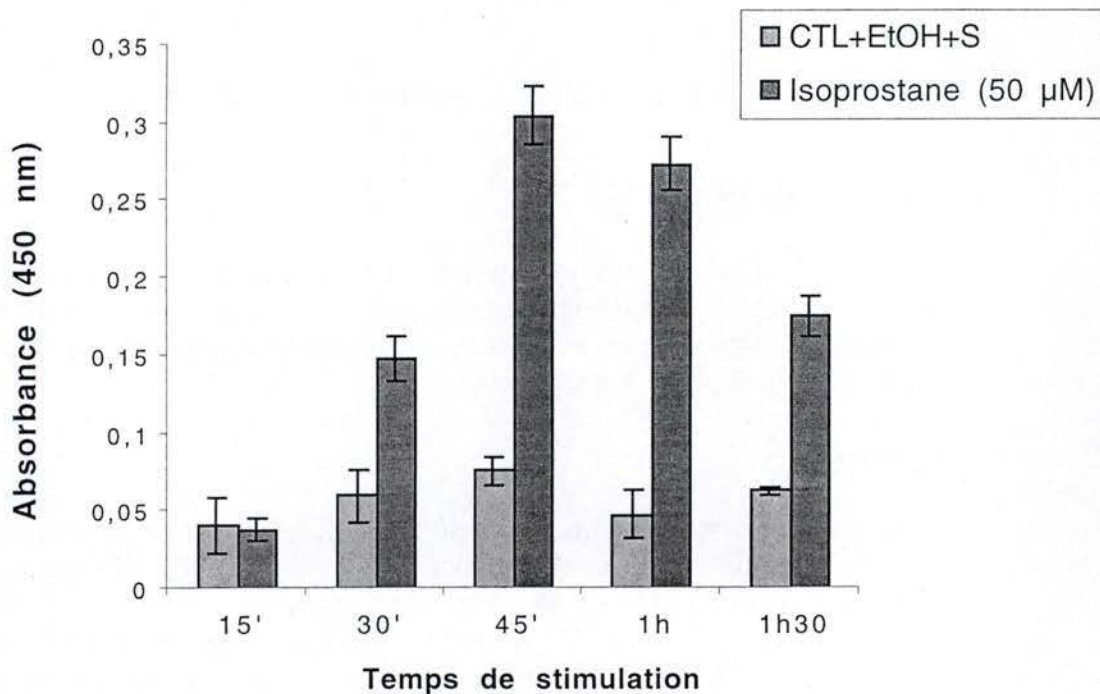
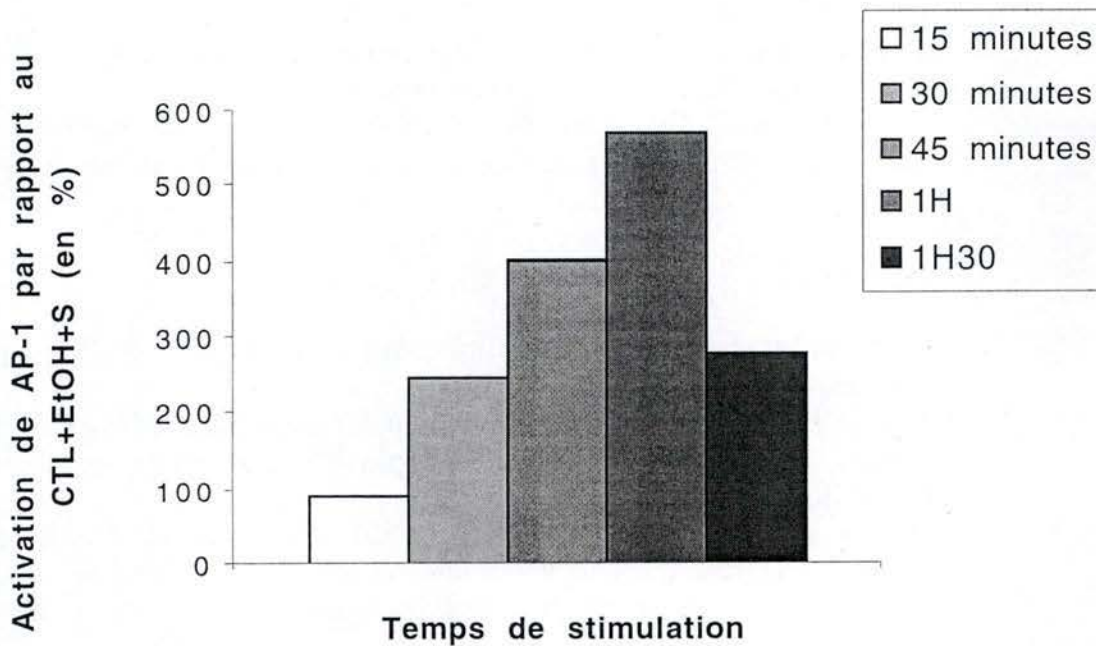
**A****B**

Figure 3.11 : Activation du facteur de transcription AP-1 chez des HUVEC-C stimulées avec de l'isoprostane-8 50 µM durant 15, 30, 45 minutes, 1 H et 1 H 30. Elle est mesurée par dosage colorimétrique en multi-puits. La réponse est exprimée en absorbance à 450 nm. **A** : Des CTL+EtOH+S sont réalisés pour chaque temps. **B** : Pour chaque temps, le résultat correspondant à l'isoprostane-8 est exprimé en pourcentage par rapport à celui du CTL+EtOH+S correspondant.

#### a) Activation de AP-1.

AP-1 est un autre facteur de transcription qui intervient dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales et des CML en induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le processus d'athérosclérose et est régulé par des facteurs de croissance ou encore par des LDL oxydées (voir chapitre 1.3.3.3). Son activation a été testée par un dosage colorimétrique identique à celui utilisé pour NFκB.

#### Résultats.

Un premier dosage fut réalisé suivant une cinétique passant par les temps 15, 30, 45 minutes, 1 H et 1 H 30, pour une concentration en 8-iso-PGF<sub>2α</sub> de 50 μM. Pour chaque temps d'incubation, un CTL+EtOH+S a été réalisé. Les cellules ont également été stimulées 1 H avec un CTL+ contenant une solution de PMA à 0,1 μg/ml complémenté par de l'ionomycine 1 M.

La *figure 3.11* représente l'absorbance à 450 nm en fonction de chaque condition de stimulation. L'activation de AP-1 est proportionnelle à cette absorbance.

Non représenté sur le graphe, le CTL+ subit une importante activation d'au moins 7800 % par rapport au CTL+EtOH+S.

Si on met de côté ce pic gigantesque de PMA + ionomycine, on peut observer à la *figure 3.11 A* une nette activation de AP-1 chez les HUVEC-C stimulées à l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> pour des temps d'incubation de 30, 45 minutes, 1 H et 1 H 30, avec un pic à 45 minutes. Cette figure montre également la grande stabilité des contrôles. En effet, les CTL+EtOH+S de chaque temps, ne varient pas l'un par rapport à l'autre.

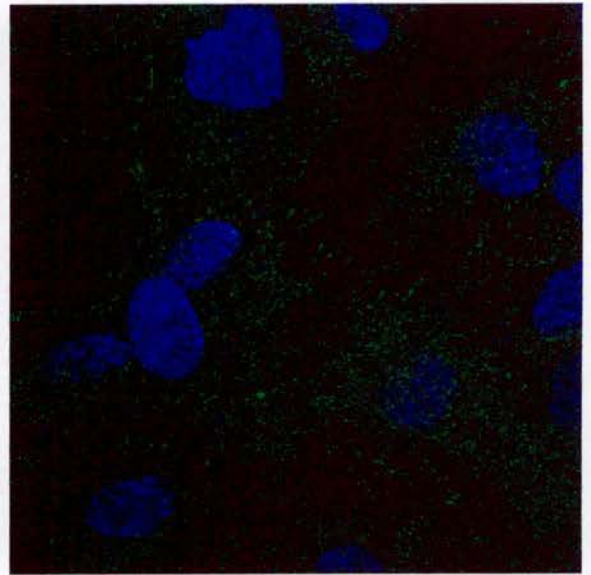
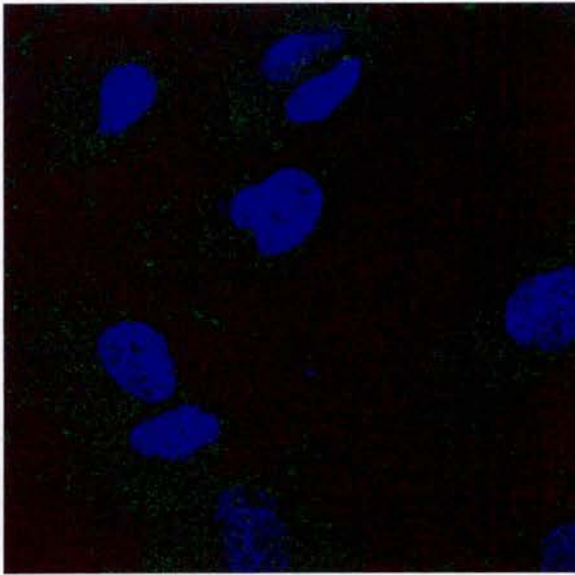
Si on exprime ces résultats en fonction du pourcentage d'activation de AP-1 par l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> par rapport au CTL+EtOH+S **correspondant au même temps d'incubation**, on obtient la *figure 3.11 B*. On n'observe alors aucune activation de AP-1 jusqu'à 15 min de stimulation. À 30 minutes, un effet de 247 % se fait ressentir et à 45 min, la réponse est de 401 %. À 1 H, on assiste enfin à un pic d'activation de 571 %, diminuant progressivement pour revenir à 279 % à 1 H 30.

Deux autres expériences, réalisées selon des cinétiques similaires à celle-ci, ont reproduit ces résultats et ont donc à nouveau prouvé l'activation de AP-1 chez des HUVEC-C stimulées à l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, avec des pics d'activation aussi élevés et tournant toujours autour des 45 minutes.

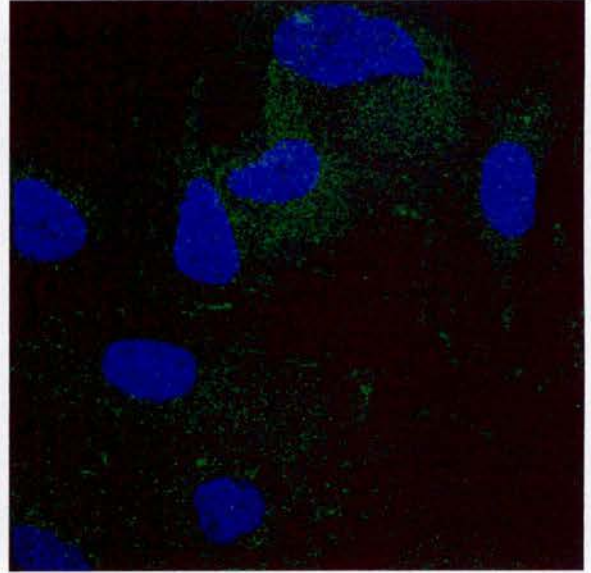
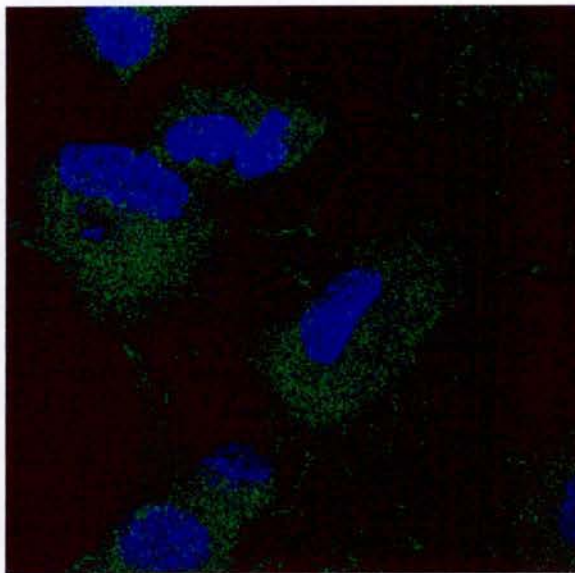
#### Discussion.

Les résultats apportés par les deux expériences décrites ci-dessus prouvent que AP-1 est indiscutablement activé par l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Compte tenu de l'implication de ce facteur de transcription dans l'athérogenèse, ces résultats sont plutôt en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> serait un facteur de risque pour l'athérosclérose.





**A** : Contrôle (F12K stock + 10 % sérum)    **B** : Isoprostane-8 (50  $\mu$ M) 10 minutes



**C** : Isoprostane-8 (50  $\mu$ M) 1 heure

**D** : Isoprostane-8 (50  $\mu$ M) 2 heures

*Figure 3.12* : Effet de l'isoprostane-8 sur la phosphorylation de la p42/p44<sup>MAPK</sup>. Les micrographies ont été obtenues par immunocytochimie, couplée à de la microscopie confocale. **A** : Les cellules contrôles ont été incubées 1 heure dans du milieu F12K + 10 % de sérum. **B** : Les cellules ont été stimulées 10 minutes dans de l'isoprostane-8 50  $\mu$ M. **C** : Les cellules ont été stimulées durant 1 heure dans de l'isoprostane-8 50  $\mu$ M. **D** : Les cellules ont été stimulées 2 heures dans de l'isoprostane-8 50  $\mu$ M.

Or, AP-1 est en aval des voies de transduction du signal des MAPK. Les chapitres suivants décrivent l'ensemble des expériences réalisées pour étudier l'activation des trois voies principales des MAPK.

#### 3.3.2.4 Activation des voies de signalisation des MAPK.

Les principales voies des MAPK sont au nombre de trois, toutes caractérisées par une succession de trois kinases (MAPKKK, MPKK et MAPK) qui se phosphorylent l'une l'autre pour aboutir à l'activation de facteurs de transcription. Les MAPK appartenant à ces à ces trois voies sont p42/p44 (ou ERK1/2), p38 et JNK.

L'étude de l'activation de ces voies peut être réalisée selon plusieurs méthodes, mais d'une manière générale, on mesure la phosphorylation des MAPK.

Pour p42/p44 et p38, la phosphorylation a été observée par immunocytochimie.

##### a) Phosphorylation de la p42/p44 MAPK.

C'est une technique immunocytochimique couplée à la microscopie confocale, décrite au *chapitre 2.2.4.1*, qui a permis de détecter la phosphorylation de p42/p44.

##### Résultats.

Les cellules, repiquées en plaque 24 puits, ont été stimulées avec une solution d'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 50 μM durant 10 minutes, 20 minutes, 1 H et 2 H. Un CTL-, un CTL EtOH et un CTL+ ont également été réalisés. Le premier correspond à une mise au repos de 1 H dans du F12K stock, le second, à une stimulation de 1 H dans du F12K stock contenant 0,5 % d'éthanol et le troisième dans du bFGF (fibroblast growth factor) 1 nM (CTL+).

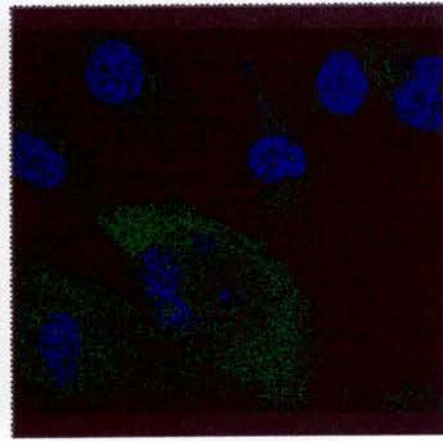
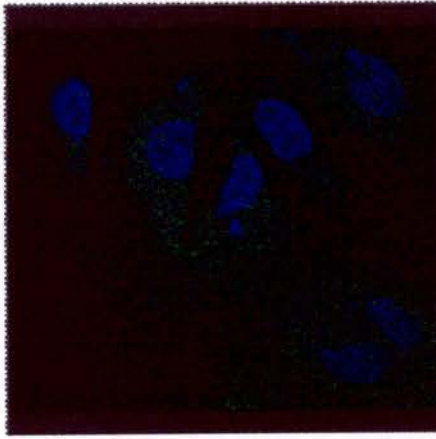
La forme phosphorylée de la p42/p44<sup>MAPK</sup> est révélée par immunocytochimie, via des anticorps couplés à une sonde Alexa verte. L'ADN apparaît en bleu, par coloration avec la sonde TO PRO (*figure 3.12*) (*voir point 2.2.4.1 des matériels et méthodes*).

Les cellules du CTL-, cellules au repos, ne montrent aucune activation de cette voie de ERK1/2, quel que soit le temps considéré. Seuls les noyaux marqués en bleu par le TO PRO sont visibles, mis à part un léger bruit de fond correspondant à une faible activation de p42/p44, même au repos. Pour le CTL+, le bFGF est reconnu pour activer la voie de signalisation de la p42/p44<sup>MAPK</sup> en 10 minutes à peine, mais la phosphorylation de la p42/p44 est transitoire et disparaît rapidement.

Ces expériences ont déjà été réalisées en URBC par western blot, sur des cellules endothéliales soumises à des conditions hypoxiques, pour lesquelles le bFGF avait été pris comme CTL+.

A.

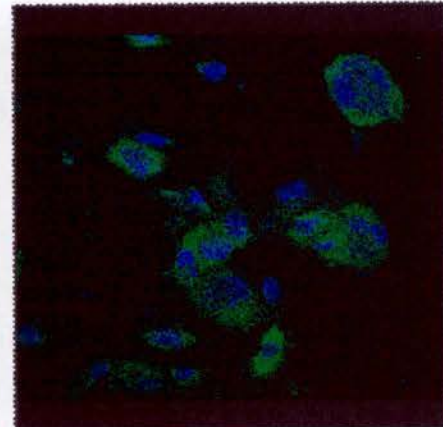
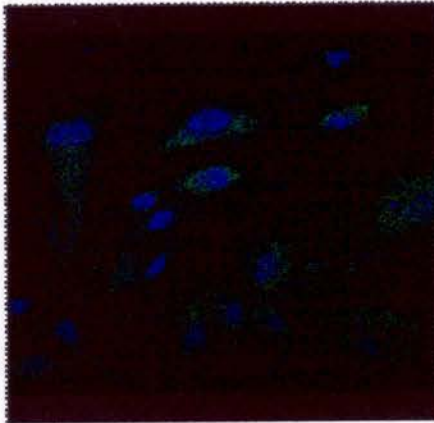
Contrôle-  
+EtOH+S  
1 heure 30



Contrôle+  
(TNFα)  
1 heure 30

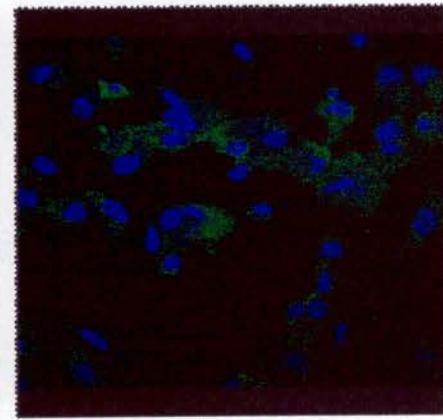
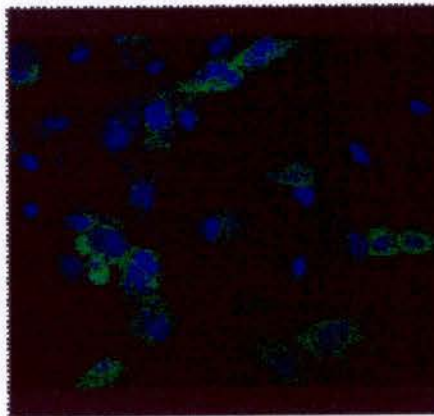
B.

Isoprostane-8  
(50 μM)  
10 minutes



Isoprostane  
(50 μM)  
45 minutes

Isoprostane-8  
(50 μM)  
1 heure 30



Isoprostane  
(50 μM)  
3 heures

*Figure 3.13* : Effet de l'isoprostane-8 sur la phosphorylation de la p38<sup>MAPK</sup>. Les micrographies ont été obtenues par immunocytochimie, couplée à de la microscopie confocale. **A** : Les cellules contrôle ont été incubées 1 heure 30 dans du milieu F12K avec éthanol et sérum. Pour le CTL+, les cellules ont été stimulées 1 heure 30 avec du TNFα (10 ng/ml). Le grossissement est de 100X. **B** : Les cellules ont été stimulées avec de l'isoprostane-8 50 μM, durant 10, 45 minutes, 1 heure 30 et 3 heures. Le grossissement est de 40X.

Or, par erreur, nos cellules ont été stimulées avec ce facteur de croissance pendant 1 H entière. Le CTL+ ne donne aucune réponse au niveau de la phosphorylation de p42/p44, probablement par déphosphorylation trop rapide de p42/p44. On observe en revanche, chez les cellules incubées en présence d'isoprostane-8 une augmentation du signal, en fonction du temps, jusqu'à 1 H, après quoi on constate que le signal redevient comparable à celui observé à 10 minutes.

Ces résultats ont été confirmés par une deuxième expérience similaire.

L'isoprostane-8-iso-PGF<sub>2α</sub> semble induire la phosphorylation de p42/p44 et donc utiliser entre autres cette voie pour induire des réponses cellulaires. Nous avons voulu vérifier s'il en allait de même pour la p38<sup>MAPK</sup>.

#### a) Phosphorylation de la p38<sup>MAPK</sup>.

La deuxième voie des MAPK à avoir été étudiée est celle de la p38<sup>MAPK</sup>. La phosphorylation de cette kinase a, comme dans le cas de la p42/p44, été évaluée par immunocytochimie à fluorescence couplée à de la microscopie confocale.

Cette technique permet de mettre en évidence la phosphorylation de p38 grâce à un anticorps de détection anti-phospho-p38.

#### Résultats.

Pour cette expérience, un CTL+ et un CTL- ont été réalisés. Pour le premier, les cellules ont été stimulées 1 heure 30 avec du TNFα 10 ng/ml. Les micrographies de ces cellules, montrées à la *figure 3.13*, ont été prises au grossissement 100X, et ne révèlent aucun signal indiquant la phosphorylation de p38. Ce résultat surprenant pourrait être dû à la déphosphorylation rapide de p38. La CTL+EtOH+S, pour lequel les cellules ont été incubées 1 heure 30 dans du milieu F12K avec de l'éthanol et 10 % de sérum, ne montre lui non plus aucun signal, mis à part un léger bruit de fond.

Des cellules ont également été stimulées avec de l'isoprostane-8 50 μM durant 10, 45 minutes, 1 heure 30 et 3 heures. Les micrographies (prises au grossissement 40X) révèlent une nette augmentation de la phosphorylation de p38 après 45 minutes de stimulation. après 1 heure 30 ou 3 heures de stimulation, le signal semble plus faible qu'après 45 minutes, mais il reste supérieur par rapport au CTL+EtOH+S.

#### Discussion.

Que ce soit pour p42/p44 ou pour p38, la phosphorylation des MAPK semble donc atteindre son maximum suite à une activation d'environ 45 minutes à 1 heure. La figure 3.13 nous laisse également supposer que la déphosphorylation

est relativement lente, du moins pour la p38<sup>MAPK</sup>, puisqu'à 3 heures, le signal reste identique à celui observé après 1 heure 30.

Ces observations confirment les résultats obtenus par Leitinger et al. (2001) montrant par western blot la phosphorylation de ERK1/2 et de p38, en présence d'isoprostane-8. D'après ces auteurs, pour ERK1/2, cette phosphorylation a lieu après 10 minutes déjà et le signal reste important jusque 40 minutes, après quoi il diminue progressivement. Cependant, la phosphorylation de p38 a lieu beaucoup plus rapidement que dans les nos expériences. En effet, ce phénomène est observé après 10 minutes seulement et son signal disparaît plus rapidement, c'est à dire après environ 60 minutes, alors que dans notre cas, c'est après 45 minutes seulement que la phosphorylation de p38 semble maximale.

### 3.3.2.5 Effet des inhibiteurs des MAPK.

On sait à présent que l'isoprostane8-iso-PGF<sub>2α</sub> emprunte certaines voies des MAPK pour induire les effets dont il est responsable. Cette activation peut également être étudiée par l'utilisation d'inhibiteurs des trois MAPK.

Pour tester les effets des inhibiteurs de MAPK sur les réponses induites par l'isoprostane-8, nous avons choisi de nous limiter pour terminer ce travail, à l'activation du facteur transcriptionnel AP-1. En effet, la réponse à l'isoprostane8-iso-PGF<sub>2α</sub> est très élevée, atteignant les 500 % d'activation par rapport aux contrôles. C'est donc ce test qui a été choisi pour tester les inhibiteurs de kinase.

L'inhibiteur de p42/p44 utilisé est le PD98059, et celui de la p38<sup>MAPK</sup>, le SB203580. Les caractéristiques de ces inhibiteurs sont expliquées au *point 2.2.3.6 des matériels et méthodes* et sont récapitulés à la *figure 2.2*.

### Résultats.

Les HUVEC-C sont pré-incubées 1 heure avec une solution contenant le PD98059 ou le SB203580, dilués dans du milieu F12K stock + 10 % de sérum pour atteindre une concentration finale de 20 μM. signalons qu'après cette pré-incubation, l'observation des cellules ne révélait aucun signe de toxicité. Les cellules sont ensuite stimulées « normalement » avec de l'isoprostane-8 50 μM durant 45 minutes. C'est en effet à ce temps d'incubation qu'on observe habituellement l'activation la plus élevée de AP-1 *voir figure 3.11*).

Un CTL+ a également été réalisé. Celui-ci consiste en une stimulation des cellules avec de l'isoprostane-8 50 μM, SANS pré-incubation avec les inhibiteurs.

Enfin, pour chacune de ces conditions, un CTL- a été réalisé, pour lequel les cellules sont incubées pendant 45 minutes dans du milieu F12K stock avec éthanol et 10 % de sérum.

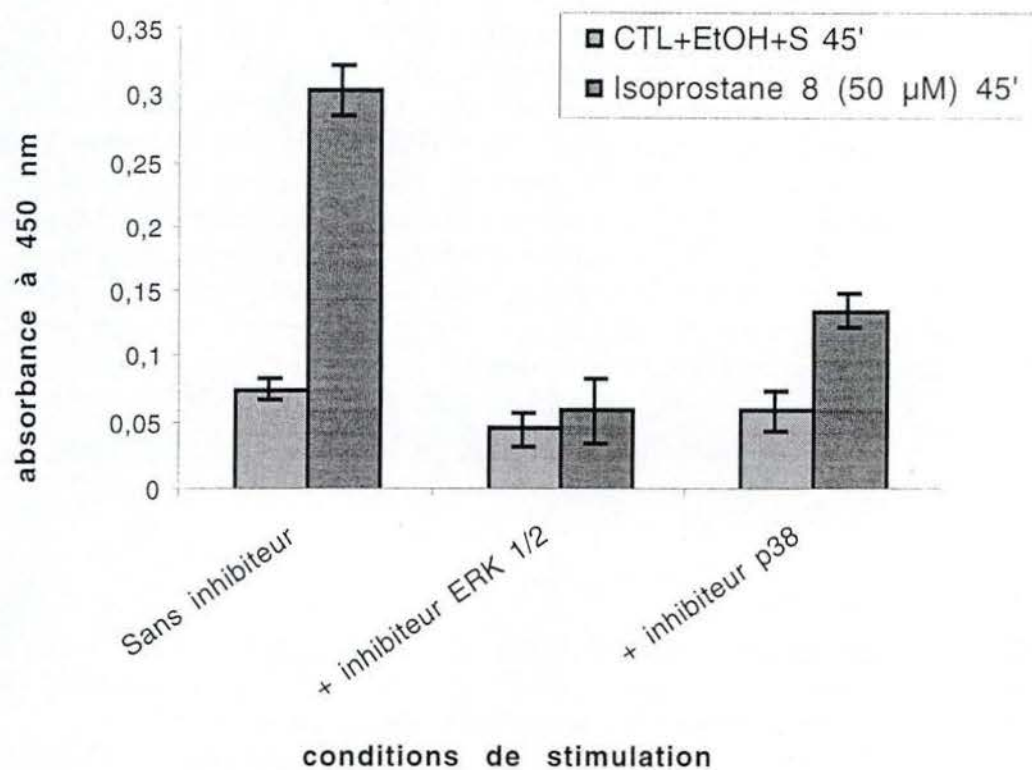


Figure 3.14 : Effet des inhibiteurs des MAPK sur l'activation du facteur de transcription AP-1 chez des cellules HUVEC-C stimulées avec de l'isoprostane-8 50 µM. Le temps de stimulation est de 45 minutes. Pour chaque condition, un CTL+EtOH+S est réalisé.

La *figure 3.14* représente l'activation du facteur de transcription AP-1, dosé par test colorimétrique en multi-puits. Cette activation est exprimée en absorbance à 450 nm.

On obtient pour la stimulation à l'isoprostane-8 une activation de 401 % par rapport au CTL+EtOH+S. Par contre, en présence du PD98059, inhibiteur de la p42/p44<sup>MAPK</sup>, l'activation de AP-1 n'est plus que de 130 % par rapport au CTL+EtOH+S correspondant. De même, en présence de SB203580, l'inhibiteur de p38, la réponse à l'isoprostane-8 diminue et l'activation de AP-1 est de 228 % par rapport au CTL+EtOH+S.

### Discussion.

L'activation de AP-1 est donc diminuée en présence d'inhibiteurs des MAPK et, même avec des réponses de 130 ou 228 %, on est encore loin des valeurs observées en absence d'inhibiteurs.

Cette expérience nous permet donc, non seulement de mettre en évidence l'activation des MAPK en présence d'isoprostane-8, mais également d'affirmer que ces dernières sont impliquées dans l'activation du facteur de transcription AP-1 par l'isoprostane-8.

Ces résultats complètent ceux obtenus en immunocytochimie et les confirment. Les travaux de Leitinger et al. (2001) confirment également ces résultats. En effet, ils ont également testé des inhibiteurs en prenant comme référence un test d'adhérence des monocytes, test pour lequel ils obtiennent en général d'excellents résultats. Ils ont ainsi prouvé que la présence de PD98059, inhibiteur de p42/p44, empêchait l'action de l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes. Il en va de même pour p38. Son inhibiteur SB203580 empêche l'action de l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes.

#### 3.3.2.6 Implication du récepteur à Thromboxane A2.

Comme décrit dans le chapitre 1.3.3.1, l'isoprostane-8 pourrait se lier à deux récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Un d'eux serait un récepteur spécifique à l'isoprostane-8 (encore non identifié), tandis que le deuxième serait le récepteur au thromboxane.

De plus, ces mêmes auteurs ont souligné l'implication possible de la PKA dans le mécanisme d'action de l'isoprostane-8, au sein de la cellule endothéliale. En effet, le récepteur au thromboxane est lié à une protéine G et pourrait mener à l'activation de la PKA.

Nous avons donc testé l'implication du récepteur au thromboxane et celle de la PKA dans la réponse à l'isoprostane-8. Nous avons pour cela testé l'action d'un antagoniste au thromboxane et d'un inhibiteur de la PKA sur l'activation du facteur transcriptionnel AP-1, soit respectivement le SQ29548 et le H89 (*point 2.2.3.6 des Matériels et méthodes et figure 2.2.*

Comme pour l'expérience précédente, les cellules ont subi, avant stimulation, une pré-incubation de 1 heure en présence de l'inhibiteur ou de l'antagoniste.

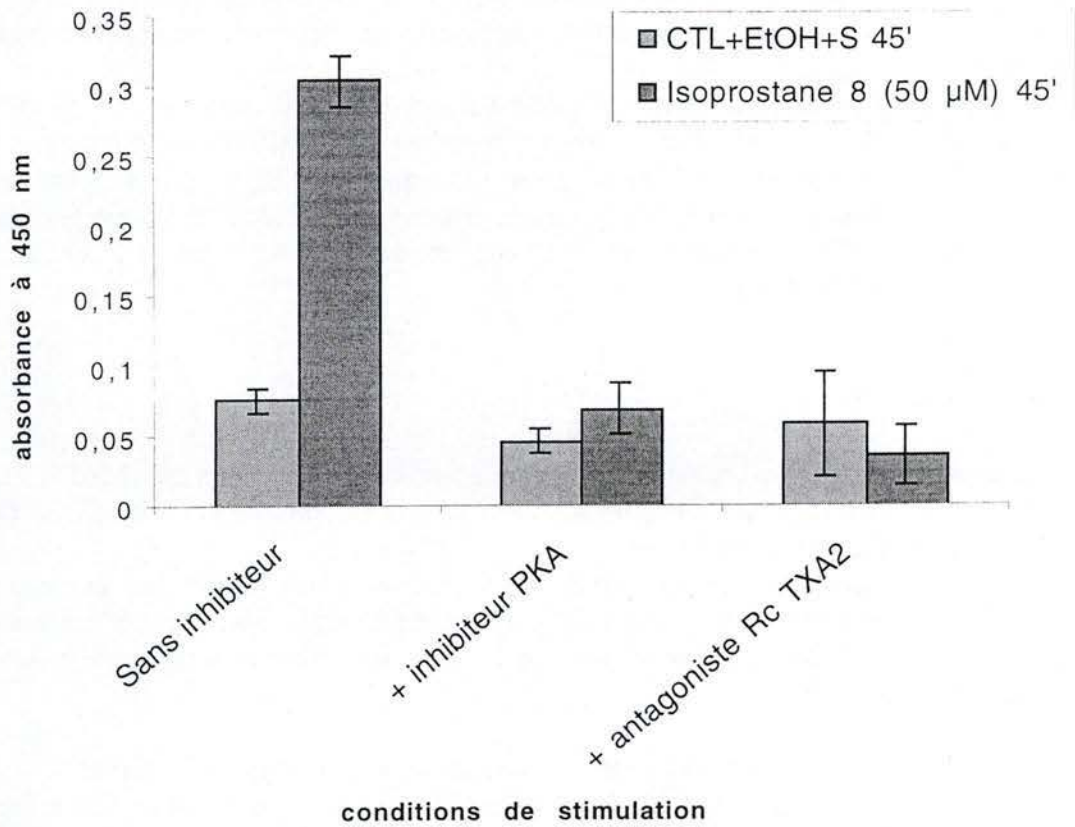


Figure 3.15 : Effet de l'inhibiteur de la PKA et de l'antagoniste du récepteur au thromboxane sur l'activation du facteur de transcription AP-1, chez des cellules HUVEC-C stimulées avec de l'isoprostane-8 50 µM. Le temps d'incubation est de 45 minutes. Pour chaque temps, un CTL+EtOH+S a été réalisé.



### Résultats.

L'activation de AP-1 par l'isoprostane-8 a tout d'abord été contrôlée en stimulant des cellules avec de l'isoprostane-8 50  $\mu\text{M}$  durant 45 minutes. L'inhibiteur et l'antagoniste testés ont été dilués dans du milieu F12K avec éthanol et 10 % de sérum, pour une concentration finale de 20  $\mu\text{M}$  pour l'inhibiteur et de 50  $\mu\text{M}$  pour l'antagoniste. Enfin, pour chaque solution de stimulation, un CTL+EtOH+S a été réalisé.

La figure 3.15 montre l'activation de AP-1 en absorbance à 450 nm. Pour le CTL+, l'activation est de 401 % par rapport au CTL+EtOH+S correspondant. En présence de l'antagoniste au thromboxane, la réponse n'est plus que de 61 % par rapport au CTL+EtOH+S correspondant.

### Discussion.

Ces résultats sont en accord avec les observations faites par Leitinger et al. (2001). cette équipe a en effet démontré que la présence de SQ29548, un antagoniste du récepteur au thromboxane, empêchait l'action de l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales. Ils montrent également qu'en présence de H89, inhibiteur de la PKA, l'isoprostane-8 n'a plus aucun effet sur l'adhérence des monocytes.

Les résultats de Leitinger et al. (2001) et les nôtres suggèrent l'isoprostane-8 agit bien via un récepteur couplé à une protéine G et à une adénylate cyclase. On ne sait toujours pas s'il s'agit d'un récepteur spécifique aux isoprostanes, mais proche du récepteur au thromboxane, puisqu'il est reconnu par le SQ29548.

---

## 4 Conclusions et perspectives

---

Dérivé de l'autooxydation d'acides gras insaturés, tels que l'acide arachidonique, l'isoprostane-8 suscite le plus vif intérêt dans le cadre des recherches concernant les maladies cardio-vasculaires. Mais cette molécule est au coeur de nombreux débats, car son mode d'action et les mécanismes moléculaires impliqués, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, sont encore peu connus. Son action passerait entre autres par la perturbation de certaines fonctions normales des cellules endothéliales, telles que l'adhérence des monocytes circulants ou encore l'activation de facteurs de transcription, mais aussi des plaquettes et des cellules musculaires lisses.

Dans le cadre de ce mémoire, les effets de l'isoprostane-8 ont été étudiés sur un modèle de cellules endothéliales humaines en culture : les HUVEC-C (*human umbilical vein endothelial cells*), dans le but de mettre en évidence le rôle pro-athérogène de cette molécule. Cette étude devrait permettre, à plus long terme, de mieux comprendre *in vivo* les mécanismes moléculaires et cellulaires menant au développement des lésions athérosclérotiques.

Nous avons pour cela choisi de nous pencher sur les effets de l'isoprostane-8 à plusieurs niveaux au sein de la cellule endothéliale.

Afin d'avoir une vue relativement globale sur ses effets, nous avons choisi de tester l'isoprostane-8 sur l'adhérence des monocytes circulants à l'endothélium ou sur l'expression de la molécule chémoattractante MCP-1, événements qui, *in vivo*, contribuent au développement des lésions athéromateuses. Les résultats obtenus suite à cette approche se sont révélés assez concluants et nous ont permis de reproduire les résultats observés dans la littérature.

Ces résultats nous ont donc incité à étudier des effets de l'isoprostane-8 situés plus en amont de la réponse cellulaire, à savoir l'activation de certains facteurs de transcription. Les facteurs en question ont été choisis en fonction des données fournies par la littérature. Il s'est avéré que AP-1 et NF $\kappa$ B sont les deux facteurs de transcription dont l'activation est la plus souvent observée au niveau des lésions athéromateuses précoces.

Par dosage colorimétrique, il est apparu que l'activation de NF $\kappa$ B n'était pas induite par l'isoprostane-8. Ces résultats sont conformes avec ceux de Leitinger et al. en 2001. En effet, ces auteurs observèrent, par western blot, que I $\kappa$ B, l'inhibiteur du facteur NF $\kappa$ B, n'est pas du tout affecté par l'isoprostane-8, alors que le TNF $\alpha$  (contrôle positif) induit la disparition transitoire de I $\kappa$ B. Ces expériences ont été réalisées sur des cellules endothéliales dérivées d'aorte et de veine ombilicale.

Par contre, en présence d'isoprostane-8, nous observons une nette activation du facteur AP-1, de l'ordre de 500 % par rapport aux cellules contrôle. A notre connaissance, c'est la première fois que l'on décrit l'effet activateur de l'isoprostane-8 sur le facteur transcriptionnel AP-1. Nous exploiterons par ailleurs cette activation, pour tester différents inhibiteurs.

Nous nous sommes donc intéressés aux voies de transduction du signal, pouvant être empruntées par l'isoprostane-8, pour induire les effets déjà démontrés. Comme AP-1 est l'une des cibles en aval des voies des MAPK, c'est à ces voies que nous nous sommes plus particulièrement intéressés. L'activation de la p42/p44<sup>MAPK</sup> et de la p38<sup>MAPK</sup> a ainsi été démontrée, par immunocytochimie couplée à de la microscopie confocale et par l'étude d'inhibiteurs de MAPK sur l'activation de AP-1. La phosphorylation de ces deux MAPK a déjà été mise en évidence par Leitinger et al. (2001), mais par western blot. Nous avons espéré tester un inhibiteur de la JNK, récemment commercialisé, le SP 600125, mais malheureusement, ce produit n'est pas arrivé dans les délais et nous n'avons pas pu le tester.

Toujours dans le domaine des voies de transduction du signal, l'implication de la PKA a également été prouvée par l'utilisation d'un inhibiteur, testé lui-aussi sur l'activation de AP-1. Nous confirmons donc bien les résultats de Leitinger et al. (2001) qui suggèrent également l'implication des MAPK et de la PKA, mais nous montrons en outre que l'activation de ces kinases est nécessaire pour induire l'activation du facteur de transcription AP-1.

Quant au(x) récepteur(s) impliqué(s), le problème reste entier. Certes, nous confirmons que l'antagoniste du récepteur au thromboxane, inhibe les effets activateurs de l'isoprostane-8 sur l'activation du facteur AP-1, ce qui suggère l'intervention du récepteur au thromboxane. Mais plusieurs données suggèrent néanmoins l'intervention d'un autre récepteur qui serait spécifique des isoprostanes-8 tout en étant reconnu par l'antagoniste SQ 29548 du récepteur au thromboxane.

En effet, Leitinger et al. (2001) ont démontré qu'il existe des différences entre les effets de l'isoprostane-8 et ceux de l'U46619, un agoniste du récepteur au thromboxane :

1. Alors que l'U46619 induit l'adhérence des monocytes et des polymorphonucléaires neutrophiles, ainsi que l'expression de VCAM-1 et de la E-sélectine, l'isoprostane-8 n'induit quant à lui que l'adhérence des monocytes, et ce indépendamment de ces deux molécules d'adhérence.
2. Cette adhérence des monocytes passe par l'activation de la PKC pour l'agoniste U46619, mais de la PKA, pour l'isoprostane-8.
3. Au niveau des MAPK, p42/p44 et p38 sont impliqués dans la réponse à l'isoprostane-8, tandis que seule la p38<sup>MAPK</sup> l'est dans la réponse à l'U46619.

Une autre hypothèse pour expliquer les différences de réponses entre l'isoprostane-8 et l'U46619, fait intervenir des variants du récepteur au thromboxane, par épissage alternatif: il s'agit du TP $\alpha$  et du TP $\beta$ . Alors que TP $\alpha$  est couplé aux protéines G $\alpha_q$  et G $\alpha_{11}$ , TP $\beta$  est couplé à d'autres protéines G : G $\alpha_{11}$  et G $\alpha_s$ . Les deux isoformes régulent donc l'adénylate cyclase de manière différente. Les différences rencontrées pour l'isoprostane-8 et l'U46619 pourraient donc aussi être dues à l'affinité qu'ont ces deux molécules envers les deux isoformes du récepteur au thromboxane.

Ce travail est préliminaire et présente de nombreuses perspectives.

Dans un premier temps, la confirmation de certains résultats s'avère nécessaire.

La phosphorylation des MAPK peut par exemple être vérifiée par western blot. D'autres MAPK peuvent également être testées, comme la JNK, faisant également partie des trois voies principales des MAPK. L'étude de cette JNK peut par exemple passer par l'utilisation d'un inhibiteur, testé également sur AP-1.

L'ensemble des inhibiteurs des MAPK et de la PKA ainsi que l'antagoniste du récepteur au thromboxane seraient testés non plus sur l'activation du facteur AP-1, mais sur l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales ou encore sur la production de MCP-1.

De plus, sachant que l'adhérence des monocytes est induite par l'isoprostane-8, indépendamment de l'expression de VCAM-1 et de la E-sélectine, la question de la nature des molécules d'adhérence impliquées dans ce phénomène subsiste et pourrait également faire l'objet de recherches supplémentaires.

A plus long terme, on pourrait imaginer de transfecter de manière transitoire les cellules HUVEC-C avec des mutants dominants négatifs, par exemple pour une MAPK ou pour d'autres acteurs impliqués dans la signalisation. Cette perspective serait d'un intérêt certain, mais il ne faut pas oublier la difficulté qu'on rencontre encore actuellement pour transfecter des cellules endothéliales.

Enfin, signalons que ce travail bénéficiera également de travaux complémentaires réalisés par d'autres chercheurs en URBC. Il s'agit de gels d'électrophorèse bidimensionnels et de l'approche protéomique, pour détecter des effets de l'isoprostane-8 sur l'expression protéinique des cellules. C'est à cette approche qu'a été consacré le mémoire de Cindy Gustin (2002). En effet, les gels bidimensionnels sont devenus au cours des dernières années, une technique de choix pour étudier le protéome. Comme les mécanismes moléculaires d'action de l'isoprostane-8 restent largement méconnus, l'approche protéomique semblait une voie possible pour élucider ces mécanismes d'action.

Cette technique est complémentaire d'une approche transcriptionnelle, mettant, elle, en évidence l'expression des ARNm. Dans notre équipe, une technique de damiers à faible densité a été utilisée par Sébastien Toffoli, lors de son mémoire (2002), mais sur un autre type cellulaire lui aussi impliqué en grande partie dans l'athérogenèse : le monocyte. Par la suite une approche transcriptionnelle par des damiers à haute densité est également envisageable au niveau des cellules endothéliales HUVEC-C et fait d'ailleurs partie des objectifs de la thèse d'Aurélien Tacheny.

L'application majeure de l'approche protéomique, consiste à comparer les profils obtenus pour un état de repos des cellules par rapport à un état d'activation (dans la problématique qui nous concerne, suite à une stimulation à l'isoprostane-8). Une série de grands gels ont ainsi été réalisés, ainsi que des petits gels, d'une résolution cependant excellente. Après coloration

au bleu de Coomassie et à l'argent, il s'est avéré que d'une condition à l'autre, certains spots variaient, notamment par leur intensité, leur localisation sur le gel ou tout simplement leur absence.

Les protéines correspondant à ces spots seront par la suite analysées et identifiées par spectrométrie de masse, dans l'espoir de les identifier.

Par la suite, elles pourront éventuellement faire l'objet de recherches plus approfondies et, à plus long terme, on pourra envisager pour les protéines/gènes d'intérêt, de construire des systèmes rapporteurs, où le gène rapporteur sera sous le contrôle du promoteur d'un gène d'intérêt sélectionné par l'approche protéomique ou transcriptionnelle. De telles approches s'avèrent également très efficaces pour décortiquer les mécanismes de signalisation et pourront également aboutir à une meilleure compréhension des dérégulations que peut entraîner l'isoprostane-8.

---

# 5 Bibliographie.

---

- Alderson L. M., G. Endemann *et al.*, *LDL enhances monocyte adhesion to endothelial cells in vitro*, *Am J Pathol*, 123, 334-42., 1986.
- Alpert M. A., *Homocyst(e)ine, atherosclerosis, and thrombosis*, *South Med J*, 92, 858-65, 1999.
- Anderson T. J., M. D. Gerhard *et al.*, *Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis*, *Am J Cardiol*, 75, 71B-74B., 1995.
- Andreotti F., F. Burzotta *et al.*, *Homocysteine and risk of cardiovascular disease*, *J Thromb Thrombolysis*, 9, 13-21, 2000.
- Ares M. P., B. Kallin *et al.*, *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.
- Baud V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*, *Trends Cell Biol*, 11, 372-7., 2001.
- Berliner J. A. and J. W. Heinecke, *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*, *Free Radic Biol Med*, 20, 707-27, 1996.
- Berliner J. A., M. Navab *et al.*, *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*, *Circulation*, 91, 2488-96., 1995.
- Boeynaems J. M. and S. Pirotton, *Regulation of the vascular endothelium : signals and transduction mechanisms*, Ed., R. G. L. C. A., 1994.
- Brand K., S. Page *et al.*, *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*, *J Clin Invest*, 97, 1715-22., 1996.
- 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.
- Brown M. S. and J. L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*, *Science*, 232, 34-47., 1986.
- Busse R. and I. Fleming, *Endothelial dysfunction in atherosclerosis*, *J Vasc Res*, 33, 181-94., 1996.
- Chisolm G. M. and D. Steinberg, *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview*, *Free Radic Biol Med*, 28, 1815-26., 2000.
- Collins T., *Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion*, *Lab Invest*, 68, 499-508., 1993.
- Collins T. and M. I. Cybulsky, *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?*, *J Clin Invest*, 107, 255-64., 2001.



- 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 *et al.*, *The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester*, J Biol Chem, 265, 9782-7., 1990.
- Cushing S. D., J. A. Berliner *et al.*, *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 87, 5134-8., 1990.
- Dadoune J. P., P. Hadjiisky *et al.*, *Histologie*, Flammarion, Médecine-Sciences., 1990.
- Davi G., P. Alessandrini *et al.*, *In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17, 3230-5, 1997.
- Demuth K., I. Myara *et al.*, [*Biology of the endothelial cell and atherogenesis*], Ann Biol Clin, 53, 171-91, 1995.
- Dichtl W., L. Nilsson *et al.*, *Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells*, Circ Res, 84, 1085-94., 1999.
- Duplaa C., T. Couffinhal *et al.*, *Monocyte/macrophage recruitment and expression of endothelial adhesion proteins in human atherosclerotic lesions*, Atherosclerosis, 121, 253-66., 1996.
- Edgell C. J., C. C. McDonald *et al.*, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*, Proc Natl Acad Sci U S A, 80, 3734-7., 1983.
- Esterbauer, *Chemistry of oxidation of lipoproteins*, Press, P., *Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*, 1995.
- Esterbauer H., J. Gebicki *et al.*, *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, 241-50., 1989.
- Fukunaga M., T. Yura *et al.*, *Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2 alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release*, J Cardiovasc Pharmacol, 26, S51-2., 1995.
- Gimbrone M. A., Jr., *Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis*, Am J Cardiol, 75, 67B-70B., 1995.
- Gniwotta C., J. D. Morrow *et al.*, *Prostaglandin F2-like compounds, F2-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17, 3236-41., 1997.

- Gomez del Arco P., S. Martinez-Martinez *et al.*, *Antioxidants and AP-1 Activation: A Brief Overview*, Immunobiology, 198, 273-278, 1997.
- Griffin E., A. Re *et al.*, *A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation*, Nat Med, 7, 840-6., 2001.
- Hall E. D., *Lipid peroxidation*, Adv Neurol, 71, 247-57, 1996.
- Henrich W. L., *The endothelium--a key regulator of vascular tone*, Am J Med Sci, 302, 319-28., 1991.
- Hickey M. J. and P. Kubes, *Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions*, Exp Physiol, 82, 339-48, 1997.
- Hofmann M. A., E. Lalla *et al.*, *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.
- Horkko S., C. J. Binder *et al.*, *Immunological responses to oxidized LDL*, Free Radic Biol Med, 28, 1771-9., 2000.
- Jialal I. and S. Devaraj, *The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*, J Nutr, 126, 1053S-7S., 1996.
- Karin M., Z. Liu *et al.*, *AP-1 function and regulation*, Curr Opin Cell Biol, 9, 240-6., 1997.
- Kluft C., *Disorders of the hemostatic system and the risk of the development of thrombotic and cardiovascular diseases: limitations of laboratory diagnosis*, Am J Obstet Gynecol, 163, 305-12., 1990.
- Koch H. G., M. Goebeler *et al.*, *The redox status of aminothiols as a clue to homocysteine-induced vascular damage?*, Eur J Pediatr, 157 Suppl 2, S102-6., 1998.
- Korenaga R., J. Ando *et al.*, *Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells*, Am J Physiol, 273, C1506-15., 1997.
- Krieger M., *Lipoproteins receptors and atherosclerosis*, Molecular Cardiovascular Medicine, 1995.
- Kuhn H. and B. J. Thiele, *The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance*, FEBS Lett, 449, 7-11., 1999.
- 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., I. Blazek *et al.*, *The influence of isoprostanes on ADP-induced platelet aggregation and cyclic AMP-generation in human platelets*, Thromb Res, 86, 337-42., 1997.

- Leitinger N., J. Huber *et al.*, *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., P. M. Ridker *et al.*, *Inflammation and atherosclerosis*, *Circulation*, 105, 1135-43, 2002.
- Lusis A. J., *Atherosclerosis*, *Nature*, 407, 233-41., 2000.
- Massy Z. A. and W. F. Keane, *Pathogenesis of atherosclerosis*, *Semin Nephrol*, 16, 12-20., 1996.
- McCully K. S., *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*, *Am J Pathol*, 56, 111-28., 1969.
- Meagher E. A. and G. A. FitzGerald, *Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations*, *Free Radic Biol Med*, 28, 1745-50., 2000.
- Mercie P., F. Belloc *et al.*, *Comparative methodologic study of NFkappaB activation in cultured endothelial cells*, *J Lab Clin Med*, 136, 402-11., 2000.
- Minden A. and M. Karin, *Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases*, *Biochim Biophys Acta*, 1333, F85-104., 1997.
- Minuz P., G. Andrioli *et al.*, *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.
- Morrow J. D., B. Frei *et al.*, *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. and L. J. Roberts, 2nd, *The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research*, *Biochem Pharmacol*, 51, 1-9., 1996.
- Munro J. M. and R. S. Cotran, *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation*, *Lab Invest*, 58, 249-61., 1988.
- Pratico D., *F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo*, *Atherosclerosis*, 147, 1-10, 1999.
- Read M. A., M. Z. Whitley *et al.*, *NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation*, *J Exp Med*, 179, 503-12., 1994.
- Roberts L. J., 2nd and J. D. Morrow, *The generation and actions of isoprostanes*, *Biochim Biophys Acta*, 1345, 121-35., 1997.
- Rollins B. J., T. Yoshimura *et al.*, *Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE*, *Am J Pathol*, 136, 1229-33., 1990.

- 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.
- Sarabi M., B. Vessby *et al.*, *Relationships between endothelium-dependent vasodilation, serum vitamin E and plasma isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) levels in healthy subjects*, J Vasc Res, 36, 486-91., 1999.
- Stein O., J. Thiery *et al.*, *Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis*, Atherosclerosis, 160, 1-10, 2002.
- Subbanagounder G., A. D. Watson *et al.*, *Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities*, Free Radic Biol Med, 28, 1751-61., 2000.
- Sung F. L., Y. L. Slow *et al.*, *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*, médecine/sciences, 17, 162-9, 2001.
- Terpstra V., E. S. van Amersfoort *et al.*, *Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20, 1860-72., 2000.
- Territo M. C., J. A. Berliner *et al.*, *Beta-very low density lipoprotein pretreatment of endothelial monolayers increases monocyte adhesion*, Arteriosclerosis, 9, 824-8., 1989.
- Theilmeyer G., T. Lenaerts *et al.*, *Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoïd/endothelial cell interaction under shear stress*, Blood, 94, 2725-34., 1999.
- Voet D. and J. G. Voet, *Biochimie*, De Boeck Université, 1, 1362, 1998.
- Wang G. P., Z. D. Deng *et al.*, *Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages*, Atherosclerosis, 133, 31-6., 1997.
- Wang N., L. Verna *et al.*, *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.
- Wilcox J. N. and B. F. Blumenthal, *Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins*, J Nutr, 125, 631S-638S., 1995.
- Witztum J. L. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*, J Clin Invest, 88, 1785-92., 1991.

- Wolfbauer G., J. M. Glick *et al.*, *Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions*, Proc Natl Acad Sci U S A, 83, 7760-4., 1986.
- Woolf N., *Pathology - Basic and Systemic, Ltd, W. S. C.*, 1998.
- Zhu Y., J. H. Lin *et al.*, *LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18, 473-80., 1998.