



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 aux LOL natives et modifiées : importance du facteur de transcription Nrf2 en conditions statiques et dynamiques

CAESENS-KOENIG, Ludmilla

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

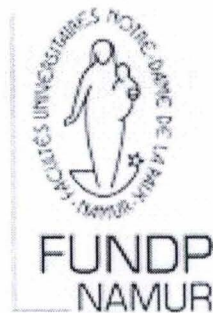
General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926
aux LDL natives et modifiées : importance du facteur de transcription Nrf2 en
conditions statiques et dynamiques.**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Ludmilla Caesens-Koenig

Janvier 2010

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>

**Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926
aux LDL natives et modifiées : importance du facteur de transcription Nrf2 en
conditions statiques et dynamiques.**

CAESENS-KOENIG Ludmilla

Résumé

Les dys- et hyperlipidémies sont considérées comme des facteurs de risque dans l'athérosclérose. Ainsi, l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) génère des particules pro-athérogènes. Dans la littérature, le modèle d'oxydation des LDL au cuivre (OX-LDL) est souvent utilisé. Cependant, l'oxydation *in vivo* peut faire intervenir d'autres acteurs comme la myéloperoxydase (MOX-LDL) présente dans les lésions. Nous avons tenté au cours de ce mémoire de caractériser la réponse de cellules endothéliales humaines aux OX- et MOX-LDL en nous attardant sur les effets différentiels entre ces LDL modifiées. Nous avons pu mettre en évidence une différence de réponse dans la voie cellulaire dépendante du facteur de transcription Nrf2, connu pour être activé en cas de stress oxydatif. Dans la deuxième partie du travail, nous avons poursuivi l'étude comparative des effets des OX- et MOX-LDL, mais sur un modèle de cellules endothéliales en conditions dynamiques, soumises à un flux. Le « shear stress », ou forces de cisaillement que l'endothélium subit par la dynamique de la circulation sanguine, est un acteur de plus en plus décrit comme étant à la fois pro- et anti-athérogène. Nous avons reproduit dans un circuit fermé et stérile un « shear stress » physiologique afin de stimuler les cellules EAhy926 pendant 24 heures à un flux combiné ou non avec des LDL natives ou modifiées. Le « shear stress » à lui seul active Nrf2 et module l'expression génique des cellules. Les LDL modifiées renforcent (*ho-1*) ou contrecarrent (*cox-2*) les effets du « shear stress », tandis que les LDL natives ont peu d'effets.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: M. Raes

Lorsque l'on décide de s'atteler à cette tradition qu'est la rédaction de la page de remerciements, c'est très certainement pour enfin permettre au cœur de prendre sa revanche sur la rigueur que nécessite la période du mémoire. A la fois extrêmement enrichissante et gratifiante, elle n'en reste pas moins un moment très éprouvant dans la vie d'un étudiant...

Cependant, à mon sens, ces inconvénients sont –et de loin- supplantés par ce que cette période m'a offert... Faisant à la fois office d'excuse à la mauvaise humeur et –certainement- de ciment dans une vie parfois décousue et effrénée, je n'en garderai que les bons souvenirs...

De tout mon cœur, je souhaite remercier le professeur M. Raes de m'avoir offert cette opportunité... Sans son dynamisme, sa bienveillance et ses encouragements, je n'en serai très certainement pas là... Merci à toi Damien, pour tes égards, ta bonne humeur, ton aide à de très nombreuses reprises, et ton intérêt sans faille pour la science en général... J'aurais sans doute de la chance d'arriver un jour à ton niveau de rigueur... Merci au reste de l'équipe athéro, dans laquelle je me suis immédiatement sentie accueillie et entourée...

La liste des personnes qui ont rendu cette éreintante période agréable est, ma foi, bien longue... Tout d'abord, il est évident que les « zouaves » du bureau des mémorisants y sont pour beaucoup !... Et d'ailleurs, je tiens à souligner le fait qu'ils ont réussi à supporter mes excentricités, chose pas toujours aisée. J'avoue avoir une pensée toute particulière pour Sabrina, chez qui la notion de « patience » prend tout son sens, et une mention spéciale à Stéphane, qui toujours a eu le don de me faire rire au bon moment (et encore plus aux mauvais ^^). Je ne vous oublie pas, Marie et Diane, surtout pour vos éclats de rire. Merci à vous, Virginie, Hélène, Florence et Mérédith, quatuor infernal quand il s'agit de faire résonner les murs du laboratoire de voix familiales et de rires tonitruants-la palme revient à Hélène!... Mes pensées, remplies de gratitude, vont d'ailleurs à tout le personnel de l'URBC en général... Sans me tromper, je peux affirmer que la cohésion –autant humaine que logistique- qui s'en dégage est impressionnante...

Il m'est évidemment impossible de passer à côté de la reconnaissance que j'ai pour ma famille, qui m'a soutenue, entourée, et évidemment permis d'arriver là où je suis... Une pensée toute particulière pour toi, qui me regarde sans doute de là haut en souriant à mes nombreuses bêtises...

A côté des liens du sang, il y a les liens du cœur...Je n'oublie donc pas mes amis, même si nous n'avons pas pu nous voir énormément faute de temps et de vie bien remplie, vous n'en restez pas moins les personnes avec qui j'ai partagé ces longues années d'études...

Et à côté des amis, il y a ces nombreuses personnes qui ont –fortuitement- eu le don de me faire rater de nombreuses manip... Je ne puis donc pas vous oublier, vous qui faites passer mes week-ends aussi rapidement que scandaleusement! (Et là, la mention va au fameux Troll de Boisfort, qui se reconnaîtra sans doute dans le portrait dressé).

Il m'est difficile de conclure de mettre sur une seule page de papier ce qui me traverse l'esprit maintenant, à cet instant précis... Les mots se bousculent, mais un sentiment persiste : la gratitude, qui a transformé ma routine en fête...

Liste des abréviations

ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1	<i>Hmox-1</i> : Gène codant pour l'hème oxygénase-1
acLDL : LDL acétylées	<i>Hmox-2</i> : Gène codant pour l'hème oxygénase-2
Akt: Serine/threonine protein kinase Akt	HO-1 : Hème Oxygénase-1
AP-1 : Activator Protein-1	HOCl: Acide hypochloreux (hypochlorite)
ApoA1: Apo-protéine A1	HODEs: Acides hydroxyoctadécaénoïques
ApoB100: Apo-protéine B100	ICAM- 1 : Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
ApoC: Apo-protéine C	IDL: Intermediate LDL
ApoE : Apo-protéine E	IKca1: Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel
ApoE3: Apo-protéine E3	IL-1 β : Interleukine-1 β
ApoJ : Apo-protéine J (Clusterine)	IL-6 RE: IL-6 Responsive Elements
ARE : Antioxydant Response Element	IL-6: Interleukine-6
ATF2: Activating Transcription Factor 2	IL-8: Interleukine-8 (CXC-8)
AVC : Accidents vasculaires cérébraux	INF- γ : Interféron- γ
BALB/C: BALB/c Autoimmunity 1 (Baa1)	IP-10 : Interféron Inducible-10
BH ₄ : Tetrahydrobioptérine	JCR :LA-cp : Lignée de rats obèses JCR :LA-cp
BTB: Broad complex, tramtrack, bric-a-brac domain	JNK : c-Jun NH2-terminal Kinase
CAT : Catalase	KEAP-1 : Kelch-like ECH-associated protein 1 (ou Inrf2)
CBP/P300: Creb Binding Protein/P300	KLF2 : Krüppel-Like Factor 2
CCL19: EBL1-Ligand Chemokine (ELC)	KO: Knock-Out
CCL21: 6-Ckine	LDL : Low Density Lipoprotein
CCR2 : Récepteur à CCL-2 (MCP-1)	LDLR: Récepteur aux LDL
CD36 : Cluster of Differentiation 36	Lkn-1 : Leukotactine-1 (CCL15)
Cdc42: Cdc42 GTP-ase	LOX-1: Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1
CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein	Maf: Maf protein
cGMP : Guanosine monophosphate cyclique	MAPK: Mitogen Activated Kinase-like Protein
c-Jun: C-Jun protein (Jun)	MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2)
CLA-1: Human SR-B1	MDA: Malondialdéhyde
ClO ₂ : Chlorite	Mef2 : Myocyte-specific Enhancer Factor 2
CO: Monoxide de carbone	MMP : Métallo-protéinase
CR-6: Class G scavenger Receptor 6	MPO: Myéloperoxydase
CRP : C-Reactive Protein	NAD(P)H oxydases : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) oxydases
CX3CL1 : Fractaline	NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CX3CR1: récepteur à la fractaline (CX3CL1)	NAP-2: Neutrophil-Activating Peptide-2 (CXC-17)
CXCL16: Scavenger Receptor SR-PSOX	NF κ B : Nuclear factor kappa-B
CXCL7 : Pro-Platelet Basic Protein (PPBP)	NK: Natural Killer
CXCR6: Récepteur à CXCL16	NO : Oxyde Nitrique
E3L: ApoE*3Leiden	NQO1: NAD(P)H quinone oxydoréductase
ELAM-1: Endothelium-Leukocyte Adhesion Molecule-1	Nrf1: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like (or related) 1
ENA-78: Epithelial Neutrophil Activating Peptide-78 (CXCL5)	Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like (or related) 2
eNOS : Endothelial NO synthase	Nrf3: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like (or related) 3
ERK1/2: Mitogen Activated Protein Kinase	O ₂ ⁻ : Anion superoxyde
ESS: Endothelial Shear Stress	ONOO- : Peroxynitrite
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide	oxLDL : LDL oxydées
FAK: Focal Adhesion Kinase	PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor
FEEL-1: Class H Scavenger Receptor (Stabilin-1, STAB1)	PAOD : Peripheral Artery Occlusive Disease
Flk1: Kinase insert Domain Receptor (VEGFR2, KDR)	PDGF : Platelet Derived Growth Factor
FMN : Flavine Mono Nucléotide	PECAM-1: Platelet-Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1
GCL : Glutamate cystéine ligase ou GSC (gamma-glutamyl cystéinyl synthétase), ou GCL modifier subunit ou GCLM	PGI ₂ : Prostacycline
GRO1 : Growth-Related Oncogene (CXCL1)	PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
GST : Glutathione S-transférase	PKA : Protéine Kinase A
H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène	
HDL: High Density Lipoprotein	

PKC: Protéine Kinase C
PON-1 : Paraoxonase-1
POZ: Poxvirus zinc finger domain
PTX3 : Pentraxine-3
Rac: Rac GTP-ase
RANTES: CCL5
Rédox: oxydation-réduction
Rho: Rho GTP-ase
RIA: Radio Immuno Assay
RNS: Reactive Nitrogen Species
ROS: Reactive Oxygen Species
SAA : Serum Amyloid A
SAP : Serum Amyloid P component
SOD: Superoxyde Dismutase
SR-A : Macrophage Scavenger Receptor 1 (MSR1)
SR-B1: Scavenger Receptor class B-1
Src: v-Src sarcoma
SRE: Sterol Regulatory Element
SREBP: Sterol Regulatory Element-Binding Protein

SREC-I: Class F scavenger Receptor 1
SSRE: Shear Stress Response Element
STAT-3: Signal Transducer And Activator of Transcription-3
TF: Facteur Tissulaire
TIMPs : Tissue Inhibitors Of MMPs
TM: Thrombomoduline
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
uPA : Plasminogen Activator
UPR: Unfolded Protein Response
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VE-cadhérine : cadhérine vasculaire endothéliale
VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor
VLDL: Very Low Density Lipoprotein
VSMCs : Vascular Smooth Muscular Cells
XOR : Xanthine Oxydo-réductase

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	4
1.1. Epidémiologie, étiologie et anatomo-pathologie de l'athérosclérose.....	4
1.1.1. Description générale.....	4
1.1.2. Formation de la plaque athéromateuse.....	4
1.1.3. Facteurs de risque.....	6
1.2. L'athérosclérose en tant que maladie inflammatoire chronique.....	7
1.2.1. Athérosclérose et chémokines.....	7
1.2.2. Plaque athéromateuse et complication associées.....	8
1.2.2.1. Rupture de la plaque.....	8
1.2.2.2. Erosion de la plaque.....	8
1.2.2.3. Inflammation et rupture de la plaque.....	9
1.2.2.4. Stabilisation de la plaque.....	9
1.3. Modèles expérimentaux utilisés dans le cadre de l'athérosclérose.....	9
1.4. L'athérogenèse, un processus multifactoriel.....	10
1.5. Cholestérol, dyslipidémies et athérosclérose.....	11
1.5.1. Introduction au transport du cholestérol : les lipoprotéines.....	11
1.5.2. Les récepteurs aux lipoprotéines.....	12
1.5.3. Marqueurs associés aux maladies cardiovasculaires : lipoprotéines et autres.....	13
1.6. Rôle des modifications oxydatives dans l'athérosclérose.....	13
1.6.1. Introduction et acteurs principaux impliqués dans la génération d'oxydants.....	13
1.6.2. Hypothèse des modifications oxydatives dans l'athérosclérose.....	15
1.6.2.1. Oxydation des lipides et des protéines.....	15
1.6.2.2. Récepteurs « scavengers » aux lipoprotéines.....	16
1.6.2.3. Lipoprotéines oxydées : présence au niveau des lésions athéromateuses et dans la circulation.....	17
1.6.2.4. Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la perception des modifications oxydatives.....	18
1.7. La NO [•] synthase endothéliale et le dysfonctionnement endothélial.....	20
1.8. Rôle du « shear stress » dans l'athérosclérose.....	21
1.8.1. Définition du « shear stress » et des patterns de flux sanguins observés <i>in vivo</i>	21
1.8.2. Mécano-réception du « shear stress », récepteurs, acteurs potentiels et transduction du signal.....	22
1.8.3. Régulateurs transcriptionnels clefs de l'effet vasoprotecteur du « shear stress ».....	24
1.8.4. Implication d'un faible « shear stress » endothélial à différents niveaux moléculaires de la pathologie.....	25
1.9. Objectifs du mémoire.....	26
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	27
2.1. Lipoprotéines (LDL).....	27
2.1.1. Isolation.....	27
2.1.1.1. Matériel et réactifs (tableau II-1).....	27
2.1.1.2. Méthode.....	27
2.1.2. Modification des LDL par le sulfate de cuivre.....	27
2.1.2.1. Réactifs (tableau II-2).....	27
2.1.2.2. Méthode.....	27
2.1.3. Modification des LDL par oxydation à la myéloperoxydase (MPO).....	27
2.1.4. Dosage des LDL par la méthode de Folin-Ciocalteu.....	27
2.1.4.1. Matériel et réactifs (tableau II-3).....	27
2.1.4.2. Méthode.....	27
2.1.5. Migration des LDL sur gel d'agarose.....	28
2.1.5.1. Principe.....	28
2.1.5.2. Matériel et réactifs (tableau II-4).....	28
2.1.5.3. Méthode.....	28
2.1.6. Conditions de stimulation avec les LDL.....	28
2.2. Conditions statiques.....	28
2.2.1. Culture cellulaire.....	28
2.2.1.1. Type cellulaire utilisé.....	28
2.2.1.2. Repiquage des cellules EAhy926.....	28
2.2.2. Test de cytotoxicité : Mesure du relargage de la lactate déshydrogenase par le « Cytotoxicity Detection Kit » de ROCHE.....	29
2.2.2.1. Principe.....	29

2.2.2.2.	Matériel et réactifs (tableau II-6)	29
2.2.2.3.	Méthode.....	29
2.2.3.	Marquage de cellules spumeuses par coloration à l'Oil Red O.....	29
2.2.3.1.	Principe.....	29
2.2.3.2.	Matériel et réactifs (tableau II-7)	29
2.2.3.3.	Méthode.....	30
2.2.4.	Mesure de la production d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ROS).....	30
2.2.4.1.	Principe.....	30
2.2.4.2.	Matériel et réactifs (tableau II-8)	30
2.2.4.3.	Méthode.....	30
2.2.5.	Extraction nucléaire.....	30
2.2.5.1.	Matériel et réactifs (tableau II-9)	30
2.2.5.2.	Méthode.....	30
2.2.6.	Dosage de protéines par les méthodes de Bradford et de Pierce	30
2.2.6.1.	Dosage de protéines par la méthode de Bradford	30
2.2.6.2.	Dosage de protéines par la méthode de Pierce.....	31
2.2.7.	Quantification du taux de liaison à l'ADN de Nrf2 par Trans-AM	31
2.2.7.1.	Principe.....	31
2.2.7.2.	Matériel et réactifs (tableau II-11)	31
2.2.7.3.	Méthode.....	31
2.2.8.	Mesure de l'activité transactivatrice de Nrf2 par transfection des cellules EAhy926 avec un plasmide rapporteur.....	32
2.2.8.1.	Transfection en Single Luciferase Assay	32
2.2.8.2.	Transfection par Double Luciferase Assay.....	32
2.2.9.	Analyses en RT-PCR en temps réel.....	33
2.2.9.1.	Extraction d'ARN total	33
2.2.9.2.	Transcription réverse.....	33
2.2.9.3.	RT-PCR en temps réel	34
2.2.10.	Analyses en Western Blot.....	34
2.2.10.1.	Principe.....	34
2.2.10.2.	Extraction protéique totale et préparation des échantillons	34
2.2.11.	Autres réactifs	35
2.2.12.	Tests statistiques	35
2.3.	Conditions dynamiques	36
2.3.1.	Culture cellulaire.....	36
2.3.1.1.	Principe.....	36
2.3.1.2.	Matériel et réactifs	36
2.3.1.3.	Méthode.....	36
2.3.2.	Circuit.....	36
2.3.2.1.	Principe.....	36
2.3.2.2.	Matériel (tableau II-19)	36
2.3.2.3.	Méthode (figure II-1)	36
2.3.3.	Marquage en immunofluorescence.....	36
2.3.3.1.	Principe.....	36
2.3.3.2.	Matériel et réactifs (tableau II-20)	37
2.3.3.3.	Méthode.....	37
2.3.4.	RT-PCR en temps réel	37
2.3.4.1.	Matériel et réactifs (tableau II-14)	37
2.3.4.2.	Méthode.....	37
3.	RÉSULTATS	38
3.1.	Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 aux LDL modifiées en conditions statiques: implication du facteur de transcription Nrf2.....	38
3.1.1.	Caractérisation préliminaire de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 lors d'une stimulation aux LDL	38
3.1.1.1.	Les LDL modifiées au cuivre et à la myéloperoxydase se caractérisent par une mobilité électrophorétique différente par rapport aux LDL natives.....	38
3.1.1.2.	Les LDL modifiées sont faiblement cytotoxiques	38
3.1.2.2.	Effets des LDL sur l'activation de Nrf2	39
3.2.	Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines en conditions dynamiques : étude de l'effet du « shear stress » et des LDL modifiées sur la voie Nrf2	42
3.2.1.	Effets d'un flux seul sur les cellules EAhy926	42
3.2.1.1.	Etude de la morphologie des cellules EAhy926 en chambres Ibbidi®	42

3.2.1.2.	Nrf2 est transloqué dans le noyau après stimulation des cellules EAhy926 pendant 24 heures avec un flux physiologique.....	43
3.2.1.3.	Effet d'un un flux physiologique sur l'expression de gènes dans les cellules EAhy926 exposées pendant 24 heures	43
3.2.1.4.	L'utilisation d'un antioxydant permet de diminuer la surexpression de <i>Nrf2</i> , <i>ho-1</i> et <i>il-8</i> dans les cellules EAhy926 stimulées pendant 24 heures avec un flux physiologique	44
3.2.2.	Effets combinés d'un flux physiologique et des LDL natives ou modifiées sur les abondances relatives des ARNm de différents gènes dans les cellules EAhy926.....	44
4.	DISCUSSION	46
4.1.	Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 aux LDL modifiées en conditions statiques: implication du facteur de transcription Nrf2.....	46
4.1.1.	Caractérisation primaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL natives et modifiées.....	46
4.1.2.	Caractérisation secondaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL : Activation de la voie Nrf2	47
4.1.2.1.	Caractérisation secondaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL : Surexpression de cytokines pro-inflammatoires	50
4.1.2.2.	Caractérisation secondaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL : Effets sur l'expression du transporteur ABCA1	50
4.2.	Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines en conditions dynamiques : étude de l'effet du « shear stress » et des LDL modifiées sur la voie Nrf2	51
4.2.1.	Effets d'un « shear stress » seul sur les cellules EAhy926.....	51
4.2.2.	Effets d'un « shear stress » et des LDL natives et modifiées sur les cellules EAhy926	54
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	57
6.	BIBLIOGRAPHIE	61

1. Introduction

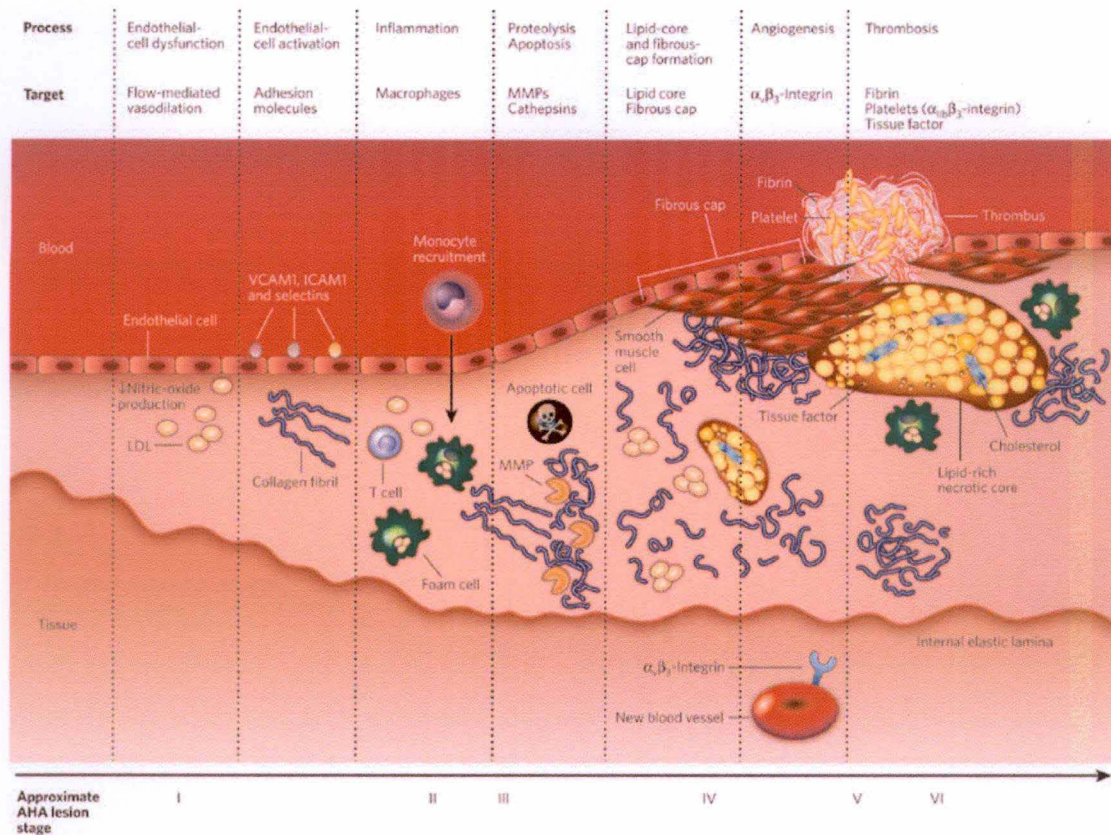


Figure I-1: Schéma général du processus séquentiel de formation de la plaque athéromateuse. La progression de la lésion athéromateuse est ici représentée de manière simplifiée, évoluant d'un vaisseau sanguin normal à gauche vers un vaisseau touché par la maladie à droite, additionnée d'un thrombus. La classification par l'AHA (American Heart Association, voir figure I-2 et table I-1) est mise en relation avec les mécanismes moléculaires. (AHA, American Heart Association; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; LDL, low-density lipoprotein; MMP, matrix metalloproteinase; VCAM1, vascular cell-adhesion molecule 1) (Sanz and Fayad 2008).

1. Introduction

1.1. Épidémiologie, étiologie et anatomo-pathologie de l'athérosclérose

1.1.1. Description générale

L'athérosclérose, pathologie artérielle, est considérée comme la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Elle est littéralement décrite comme une forme particulière d'artériosclérose, maladie dégénérative des artères caractérisée par leur épaissement et leur durcissement (Léoni, 2001; Pepine, 2001). Les processus patho-physiologiques et les éventuelles complications de la maladie, présentant un aspect dégénératif, chronique et inflammatoire, sont largement responsables des accidents cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Pepine, 2001). La pathologie, qui touche principalement les artères de gros et moyen calibres, résulte d'une accumulation de macrophages dérivés des monocytes sanguins dans l'intima de ces artères. L'infiltration de lipoprotéines de faible densité (LDL) au niveau de l'intima et leur internalisation excessive par ces macrophages, conduit à la formation de cellules gorgées de lipides, les cellules spumeuses (ou « foam cells »). Ce processus évolutif mène à la formation d'une lésion nommée « l'athérome », qui peut à terme obstruer la lumière du vaisseau sanguin (Léoni, 2001; Pepine, 2001). La figure I-1 décrit de manière générale le processus.

L'athéromatose commence typiquement dès l'adolescence et peut se dérouler dans la plupart des artères majeures. Ce processus s'avère asymptomatique dans un premier temps et n'est pas détecté par une majorité de tests diagnostiques. Les athéromes évoluant dans les artères des membres inférieurs sont à l'origine d'un flux sanguin diminué, provoquant des maladies artérielles obstructives périphériques, encore appelées PAOD (ou « peripheral Artery Occlusive Disease ») (Hiatt, Hoag *et al.*, 1995; Tesic, 2009). Il est décrit que la plupart des complications dues à une interruption du flux sanguin interviennent lorsque la lumière artérielle est réduite d'environ 50 % (Glagov, Weisenberg *et al.*, 1987). Les problèmes majeurs causés par la maladie sont de deux types et liés soit à la rupture de la plaque athéromateuse, soit à une dilatation artérielle compensatoire, avec altération de la paroi vasculaire résultant en un anévrisme (Léoni, 2001; Pepine, 2001). Une rupture de la plaque d'athérome provoque une thrombose qui ralentit ou arrête rapidement la circulation sanguine. Les tissus en aval du thrombus, ainsi privés de leur source d'oxygénation et de nutriments, se nécrosent. Les deux événements majeurs causés par ce phénomène sont sans doute l'infarctus du myocarde (thrombose au niveau d'une artère coronarienne) et l'accident cérébrovasculaire (thrombose au niveau d'une artère cérébrale) (Léoni, 2001; Pepine, 2001; Ding, Zhang *et al.*, 2008).

1.1.2. Formation de la plaque athéromateuse

Selon les modèles classiques de formation de la plaque athéromateuse, une altération de l'homéostasie endothéliale (notamment régulée par la production d'oxyde nitrique (NO), de prostacycline (PGI₂) et d'endothéline-1) (da Luz et Favarato, 1999; Gleissner, Leitinger *et al.*, 2007; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009) peut déclencher des interactions entre les monocytes sanguins, les plaquettes, les lymphocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) au niveau de l'endothélium, et serait à l'origine de la lésion (da Luz et Favarato, 1999). Les lipoprotéines de faible densité représentent une composante majeure dans le développement de la plaque. En effet, dans le cas d'un endothélium fragilisé (par exemple en cas de dysfonctionnement endothélial, suite à des facteurs de risque ou en conditions de « shear stress » défavorables et/ou présentant une perméabilité accrue, l'hypercholestérolémie

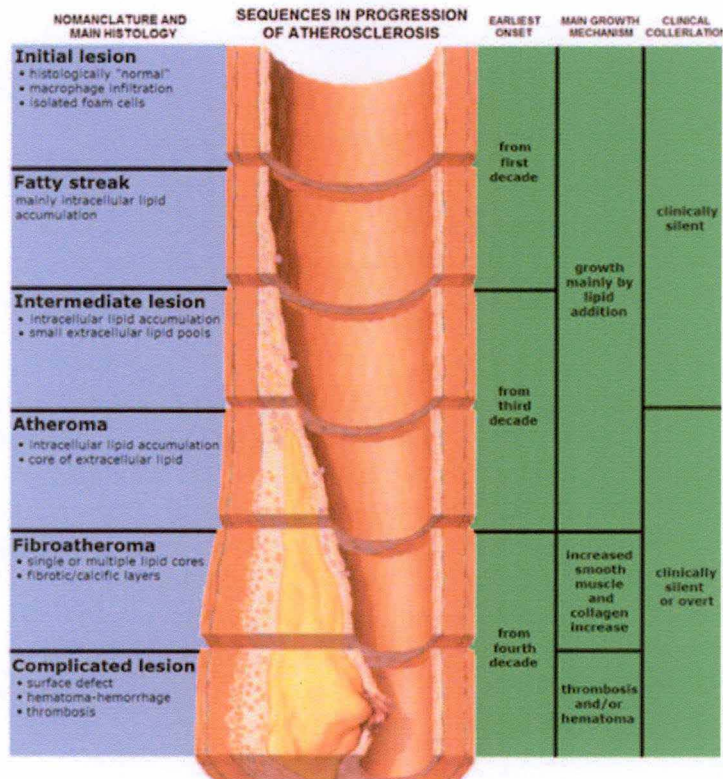


Figure I-2: progression séquentielle de la maladie et mise en rapport avec la nomenclature de l'American Heart Association. La classification des lésions proposée par l'American Heart Association est ici mise en relation avec les particularités histologiques de ces dernières, l'âge d'apparition des lésions, leur mécanisme de croissance et leur manifestation clinique. Ainsi, avec la croissance de la lésion en athérome correspondent les premières éventuelles manifestations cliniques de la pathologie (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Endo_dysfunction_Athero.PNG).

est associée à une plus grande transcytose des LDL à travers l'endothélium (pour une revue, voir (Badimon, Vilahur *et al.*, 2009)). L'accumulation de LDL dans l'espace subendothélial a pour conséquence une interaction des LDL avec la matrice extracellulaire et des acteurs favorisant leurs modifications (agrégation, glycosylation, oxydation,...). Les modifications structurelles des LDL sont connues pour augmenter leur pouvoir athérogène (pour une revue, voir (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008)). Cette rétention de LDL dans l'intima artérielle est capable de déclencher le processus inflammatoire clef à l'athérogénèse et au remodelage vasculaire, tout comme les microlésions, un dysfonctionnement endothélial ou les conditions de « shear stress » pro-athérogène, qui sont également décrits comme des causes potentielles (pour une revue, voir (Traub et Berk, 1998; Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009)). En effet, l'accumulation de LDL oxydées dans l'intima artérielle cause l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales telles que VCAM-1, ICAM-1, la E-sélectine et la ELAM-1 (endothelium-leukocyte adhesion molecule) qui interviennent dans le phénomène de roulement (« rolling ») et d'adhérence des monocytes à la surface de l'endothélium et leur infiltration dans l'intima (Badimon, Vilahur *et al.*, 2009). L'expression de ces molécules est régulée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 β (IL-1 β), le tumor necrosis factor alpha (TNF α) et l'interféron gamma (INF- γ), sécrétées au niveau de la plaque athéromateuse en formation et s'accumulant au fur et à mesure du dysfonctionnement endothélial (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008). Les monocytes se différencient en macrophages au niveau du site inflammatoire. Ces macrophages internalisent par endocytose les LDL oxydées via des membres de la famille des récepteurs « scavenger » (pour une revue, voir (Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007)). Au fur et à mesure de l'internalisation lipidique, les macrophages évoluent en cellules spumeuses (« foam cells »), dont l'accumulation dans l'intima est à l'origine de l'évolution de la plaque athéromateuse. Les macrophages sécrètent également différents facteurs pro-inflammatoires impliqués dans cette évolution (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008). A terme, les cellules spumeuses meurent dans l'intima, provoquant la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires supplémentaires qui viennent alimenter ce processus. Les monocytes constituent donc avec les cellules endothéliales des acteurs majeurs de la pathologie.

L'IL-1 β est également connue pour favoriser la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (ou VSMCs pour « vascular smooth muscle cells ») de la média artérielle vers l'intima, ainsi que leur prolifération. Les VSMCs sont connues pour être responsables de la production de facteurs de croissance, de cytokines, mais également de collagène et protéoglycans, composantes de la matrice extracellulaire et de protéases dégradant cette matrice (pour une revue, voir (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008)). Ces VSMCs sont à la base de la formation de la chappe fibreuse ou la composante matricielle de la plaque athéromateuse (pour une revue, voir (da Luz et Favarato, 1999; Pepine, 2001; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009)). Un troisième effet des LDL oxydées est la formation de micro-thrombi plaquettaires au niveau de l'endothélium activé par la réaction inflammatoire, micro-thrombi qui interviennent de plus dans la production du facteur de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth factor) favorisant la formation de la chappe fibreuse.

La lésion primaire athéromateuse, appelée strie lipidique (ou « fatty streak »), est la première observable macroscopiquement (Léoni, 2001; Pepine, 2001). Son évolution en plaque fibreuse est relativement lente, et il a été montré sur des modèles animaux et chez l'homme que sa croissance s'effectue d'abord vers la paroi extérieure du vaisseau sanguin (Glagov, Weisenberg *et al.*, 1987), préservant ainsi dans un premier temps la lumière artérielle. Le processus de sténose peut ainsi prendre des années avant de se manifester. La plaque

Terms for Atherosclerotic Lesions in Histological Classification

Other Terms for the Same Lesions Often Based on Appearance With the Unaided Eye

Type I lesion	Initial lesion		Early lesions
Type IIa lesion	Progression-prone type II lesion	Fatty dot or streak	
IIb	Progression-resistant type II		
Type III lesion	Intermediate lesion (preatheroma)		
Type IV lesion	Atheroma	Atheromatous plaque, fibrolipid plaque, fibrous plaque, plaque	
Type Va lesion	Fibroatheroma (type V lesion)		
Vb	Calcific lesion (type VII lesion)	Calcified plaque	Advanced lesions, raised lesions
Vc	Fibrotic lesion (type VIII lesion)	Fibrous plaque	
Type VI lesion	Lesion with surface defect, and/or hematoma-hemorrhage, and/or thrombotic deposit	Complicated lesion, complicated plaque	

Tableau I-1 : Classification anatomique de la progression séquentielle des lésions du type I au type VI en fonction de l'accumulation lipidique (American Heart Association). Dans ce tableau sont reprises les différentes nomenclatures de l'American Heart Association pour désigner la variété de lésions athéromateuses. Selon une classification histologique, les lésions sont désignées par des lettres romaines indiquant leur état d'avancement. La lésion initiale (I) contient assez de lipoprotéines athérogènes pour favoriser la formation de macrophages spumeux. Les lésions de type II consistent majoritairement en une couche de macrophages spumeux et de cellules musculaires lisses vasculaires chargées en lipides. La lésion de type II est souvent désignée par le terme « fatty streak », ou brèche lipidique. La lésion de type III, intermédiaire entre la lésion II et IV (l'athérome, pathologique) contient un certain nombre de gouttelettes lipidiques extracellulaires en plus des cellules chargées en lipides. Ce sont ces lipides extracellulaires qui sont les précurseurs immédiats d'un cœur lipidique élargi et fragile, qui caractérise l'athérome (lésion IV). Débutants au niveau du dernier quart de la vie (voir figure I-2), les athéromes peuvent également posséder une couche épaisse de tissu conjonctif (lésion IV). La lésion IV évolue en lésion VI par fissure, hématome ou thrombus. Certaines lésions V sont largement calcifiées (lésions Vb) ou sont quasi exclusivement constituées de tissu conjonctif (lésion Vc) (Stary, Chandler *et al.* 1995)

athéromateuse mature montre deux composantes principales à savoir le cœur lipidique composé des macrophages spumeux, et la chappe fibreuse composée des VSMCs et de la matrice extracellulaire (Léoni, 2001; Pepine, 2001). Une classification anatomique par l'American Heart Association décrit la progression séquentielle des lésions de type I au type IV en fonction de l'accumulation lipidique (Stary, Chandler *et al.*, 1995) (voir Tableau I-1 et figure I-2). Cette lente évolution démarre dans la première décennie de la vie et se prolonge silencieusement jusque la troisième décennie. Lorsqu'elle atteint le stade IV, la lésion croît de manière accélérée par l'accumulation des VSMCs et de collagène vers la lésion de type V, ou de manière plus radicale vers une lésion de type VI si la plaque se rompt. Le thrombus causé par la rupture de la plaque peut à ce moment être incorporé et croître dans la lésion, qui régressera alors vers un type V. Cette oscillation entre les lésions de type V et VI constitue le mécanisme principal d'occlusion de lésions avancées dans les artères de moyen calibre (Stary, Chandler *et al.*, 1995).

1.1.3. Facteurs de risque

Les pathologies cardiovasculaires sont bien souvent décrites comme étant multifactorielles. Ces dernières découlent en effet d'une interaction complexe entre des facteurs variables dépendant du mode de vie (alimentation et dyslipidémie, tabagisme, exercice physique, consommation d'alcool), de facteurs locaux (« shear stress » au niveau de l'endothélium) et d'un ensemble de facteurs fixes, ceux-ci dépendant des prédispositions génétiques d'un individu, son âge, son sexe, le statut ménopausal de la femme (pour une revue, voir (Fearon et Faux, 2009)) ou d'interférences par d'autres pathologies comme le diabète, l'obésité ou l'hypertension (pour une revue, voir (Bonetti, Lerman *et al.*, 2003)). L'étape initiant les maladies cardiovasculaires semble devoir passer par un dommage endothélial, exposant la paroi vasculaire au démarrage d'un processus inflammatoire délétère menant à la formation d'une lésion athéromateuse. Cette dernière étape est intrinsèquement liée à un stress oxydatif cellulaire dû à la production de dérivés actifs de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) ou de l'azote (RNS pour Reactive Nitrogen Species) par les types cellulaires impliqués dans la formation et la progression de la lésion, à savoir les cellules endothéliales, les VSMCs, les monocytes et donc les macrophages. Des facteurs exogènes, comme le tabagisme et l'hyperlipidémie mentionnés ci-dessus, ou encore le diabète ou l'hypertension contribuent au stress oxydatif et constituent donc des facteurs de risque importants dans le cas des pathologies cardiovasculaires (pour une revue, voir (Bonetti, Lerman *et al.*, 2003; Fearon et Faux, 2009)).

Bien que l'association entre les facteurs de risque et l'athérosclérose soit bien documentée, il semblerait que certains individus ne développent pas la pathologie bien qu'ils possèdent plusieurs facteurs de risque. Cette observation suggère l'existence d'un seuil au-delà duquel la balance penche en faveur du développement athérosclérotique (pour une revue, voir (Bonetti, Lerman *et al.*, 2003; Fearon et Faux, 2009)). La plupart des facteurs de risque associés à la production d'un stress oxydatif sont également associés au dysfonctionnement endothélial : en réagissant avec le NO[•] protecteur, les ROS diminuent sa disponibilité et promeuvent les dégâts endothéliaux entre autres via une molécule très réactionnelle, le peroxy-nitrite produit à partir du NO[•] et d'ions superoxyde. Situé en aval de toute une série de facteurs de risques, le dysfonctionnement endothélial peut être considéré comme l'élément clef faisant pencher la balance en faveur du développement de la pathologie (Bonetti, Lerman *et al.*, 2003; Fearon et Faux, 2009).

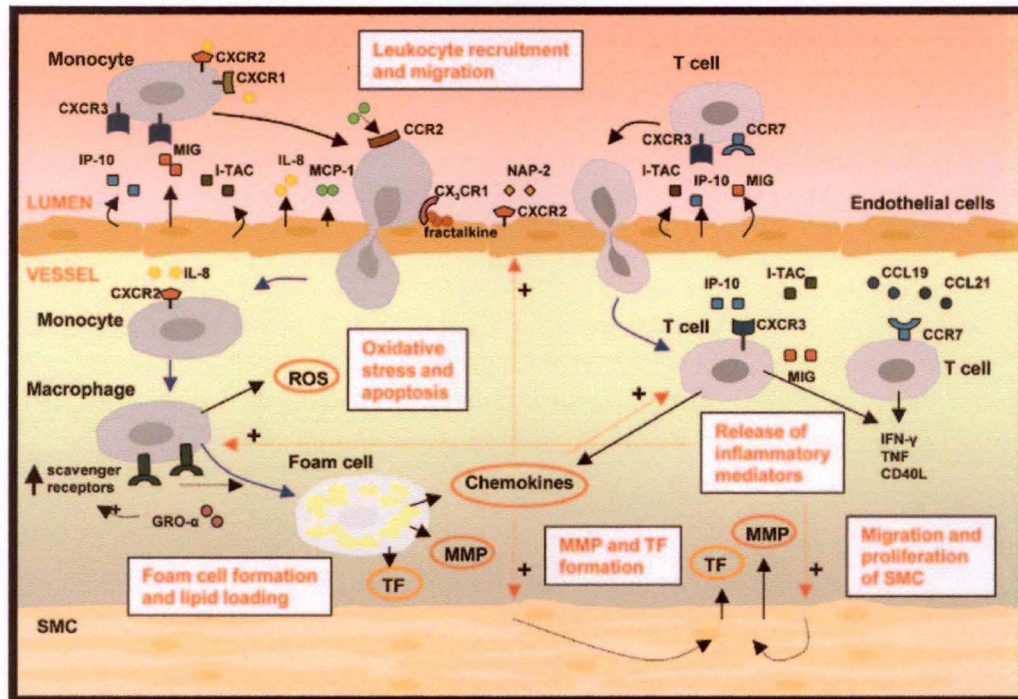


Figure I-3 : Le rôle des chémokines dans l'athérosclérose. Les chémokines favorisent le recrutement et la migration des leucocytes (cellules T et monocytes) au niveau de la lésion athéromateuse. A l'intérieur de la lésion, ces mêmes chémokines interviennent dans l'activation des cellules endothéliales et des cellules T, qui à leur tour synthétiseront une variété de cytokines et chémokines, alimentant le processus inflammatoire. L'activation des cellules T semble dépendre de l'interaction entre CXCR3 et leurs ligands MIG, IP-10 et I-TAC. L'activation des cellules T favorise l'activation des macrophages via les médiateurs inflammatoires synthétisés par ces dernières. Ces chémokines favorisent la production de facteur tissulaire (TF), de métalloprotéinases matricielles (MMPs), d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène par les macrophages mais également des médiateurs favorisant la formation de cellules spumeuses ($GRO\alpha$) par leur action sur l'expression de récepteurs scavengers. L'interaction entre MCP-1 et CCR2 semble essentielle afin d'activer le monocyte. Les chémokines permettent enfin la migration des VSMCs au niveau de la lésion et leur passage d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire et prolifératif. ($GRO\alpha$, growth-related oncogene α /CXCL1; NAP-2, neutrophil-activating peptide-2/CXCL7; IL-8/CXCL8; MIG, monokine induced by IFN- γ /CXCL9; IP-10, INF- γ -inducible 10/CXCL10; I-TAC, INF- γ inducible T cell /CXCL11; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1/CCL2; fractalkine/CX3CL1) (Aukrust, Halvorsen *et al.* 2008).

1.2. L'athérosclérose en tant que maladie inflammatoire chronique

1.2.1. Athérosclérose et chémokines

L'athérosclérose est caractérisée par un trait important, la composante inflammatoire. Bien que ce caractère inflammatoire soit maintenant communément admis, l'imbrication et la régulation de ces processus ne sont pas encore totalement comprises (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009). Les chémokines semblent jouer un rôle important dans cette pathologie à composante immunitaire, dans sa progression, voire même dans la déstabilisation de la plaque (pour une revue, voir (Shah, 2009)).

Les chémokines, ou cytokines pro-inflammatoires caractérisées par leur propriété de chémoattractant pour la migration des leucocytes sur le site inflammatoire, sont trouvées en hautes concentrations systémiques et à l'intérieur des plaques athéromateuses. Ainsi, au niveau de la plaque sont présentes les CXC chémokines comme l'IL-8 (ou CXCL8), le neutrophil-activating peptide-2 (NAP-2/CXCL7), le growth-related oncogene (GRO/CXCL1), l'interféron inductible 10 (IP-10) et la CXCL16. Les CC-chémokines sont également exprimées au niveau de la plaque, comme le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2), la leukotactine-1 (Lkn-1/CCL15), CCL19, CCL21 et la chémokine exprimée et sécrétée par les cellules T à savoir la RANTES/CCL5. Des études suggèrent que là où ces chémokines sont surexprimées, on observe également très souvent une expression augmentée de leurs récepteurs (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009; Shah, 2009).

Le rôle de ces chémokines dans l'athérosclérose est renforcé par le fait que les LDL modifiées sont de puissants inducteurs de ces dernières dans beaucoup de types cellulaires comme les macrophages et les VSMCs. De plus, outre leur propriété de chémoattractant, les chémokines peuvent induire la prolifération cellulaire, la sécrétion enzymatique (principalement la production de metalloprotéases), la formation des cellules spumeuses ou encore la production de ROS. Elles peuvent également induire la migration des VSMCs au site inflammatoire et leur prolifération, ainsi que l'activation des plaquettes (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009; Shah, 2009). Ces réponses sont clairement pertinentes dans le cadre de l'athérosclérose, que ce soit dans le cadre de la formation ou de la déstabilisation des lésions (Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009; Shah, 2009).

Ces données ont été confirmées par de nombreuses observations réalisées à partir de modèles murins où les gènes de certaines chémokines ou de leurs récepteurs ont été invalidés. En effet, des modèles knock-out (KO) pour CCL2, CCR2 (i.e. le récepteur pour CCL2), CXCR2 (i.e. le récepteur pour CXCL1, CXCL7, et CXCL8), CXCR6 (i.e. le récepteur pour CXCL16), et CX3CR1 (i.e. le récepteur pour la fractalkine/CX3CL1), ont montré une réduction significative de la formation des lésions athéromateuses, ainsi que du dépôt lipidique (Boring, Gosling *et al.*, 1998; Lessner, Prado *et al.*, 2002; Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008). De plus, un croisement de souris CCR2^{-/-} avec des souris ApoE^{-/-} a montré une réduction drastique dans le développement de la pathologie, suggérant donc qu'à l'avenir, il serait intéressant de s'orienter vers cet aspect inflammatoire pour développer des traitements de la maladie ciblant les chémokines et leurs récepteurs associés (Smith, Trogan *et al.*, 1995; Boring, Gosling *et al.*, 1998). D'autres études par contre mettent en exergue le rôle athéroprotecteur de certaines chémokines. Dans ce sens, des modèles de souris KO pour CXCL16 ou CCR1 montrent une accélération de la pathologie (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008). L'interaction entre les différentes chémokines et les acteurs cellulaires contribuant à la pathologie sont repris dans la figure I-3.

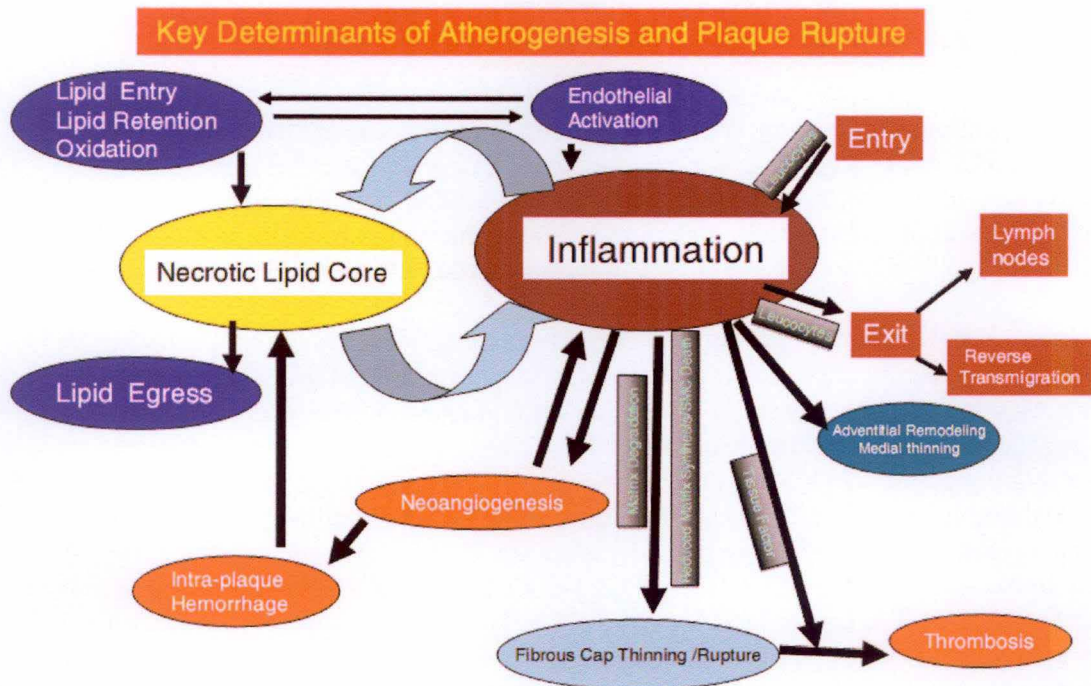


Figure I-4 : Les déterminants clés dans le processus d'athérogenèse et la rupture de la plaque : rôle central de l'inflammation. Représentation schématique de l'interaction entre les différents concepts intervenant dans la rupture de la plaque athéromateuse. La taille du coeur lipidique et l'étendue de l'inflammation de la plaque athéromateuse dépend de nombreux facteurs. L'inflammation et l'activation des cellules immunitaire joue un rôle central dans la déplétion en collagène de la chappe fibreuse et donc dans la rupture de cette dernière. De plus, l'inflammation joue un rôle dans l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires qui synthétisent le collagène. L'inflammation est certainement un acteur central dans la formation du thrombus qui suit la rupture de la plaque, en favorisant la synthèse de facteur tissulaire (Shah 2009)

1.2.2. Plaque athéromateuse et complication associées

Les observations histologiques de plaques d'athérome rompues ont montré des caractéristiques distinctives. Ces dernières possèdent un cœur lipidique important (+ de 30 % du volume de la plaque), composé de cristaux libres de cholestérol, d'esters de cholestérol, de lipides oxydés, et d'une chappe fibreuse pauvre en VSMCs et en collagène. Ces plaques montrent également une croissance luminale, une invasion de cellules inflammatoires (macrophages dérivés de monocytes sanguins, cellules T activées, cellules dendritiques et quelques mastocytes) avec une néo-vascularisation marquée de l'adventice et de la plaque (pour une revue, voir (Shah, 2003; Shah, 2009)). Ces caractéristiques phénotypiques ont été considérées comme des traits indiquant la vulnérabilité de la plaque qui ne s'est pas encore rompue. La composante inflammatoire est centrale au processus de rupture de la plaque, ceci étant résumé dans la figure I-4.

1.2.2.1. Rupture de la plaque

La rupture de la plaque serait due à la déplétion en composants matriciels. En effet, le « turn over » matriciel assuré par une balance entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire, pourrait pencher en faveur de la dégradation, menant à l'amenuisement de la plaque (Shah, 2003; Shah, 2009). D'ailleurs, et allant dans ce sens, il a été montré que les plaques qui s'étaient rompues possèdent moins de collagène et de protéoglycans, ainsi que moins de VSMCs que les plaques stables (Burleigh, Briggs *et al.*, 1992; Shah, 2003; Shah, 2009). La moindre teneur en matrice extracellulaire rendrait les plaques plus sensibles aux facteurs hémodynamiques ou à d'autres déclencheurs.

Ces plaques présentent également une dégradation matricielle plus soutenue, à imputer à la famille des métallo-protéinases (MMPs), enzymes dégradant la matrice extracellulaire et sécrétées par les macrophages et cellules spumeuses, ainsi que dans une moindre mesure par les VSMCs et les cellules endothéliales (Burleigh, Briggs *et al.*, 1992; Galis, Sukhova *et al.*, 1994; Shah, 2003; Shah, 2009). Cette famille d'enzymes peut dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire, et leurs activités sont régulées par un contrôle étroit au niveau de la transcription, ainsi qu'au niveau de leur sécrétion : sécrétées à l'état de zymogènes, les MMPs nécessitent une activation extracellulaire. Il existe également une famille d'inhibiteurs de MMPs, les « Tissue Inhibitor of MMPs » (TIMPs), qui, lorsqu'ils sont diminués, favorisent la rupture de la plaque (Galis, Sukhova *et al.*, 1994; Shah, 2003; Shah, 2009). Les MMPs latentes peuvent également être activées par la plasmine, elle-même produite par le « plasminogen activator » (uPA) à partir du plasminogène par les macrophages, la trypsine et la chymase (contenue dans les granules mastocytaires). Une production accrue de MMPs peut être également imputée à une augmentation en ROS, en LDL oxydées, en cytokines inflammatoires ou un à stress hémodynamique (Shah, 2003; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Shah, 2009). D'autres acteurs sont également décrits comme des causes potentielles de la rupture de la plaque athéromateuse. Ainsi, une activité physique extrême et aiguë, voire même un traumatisme émotionnel ou un abus de substances illicites, sont décrits comme des causes possibles de rupture de la plaque athéromateuse. Les différents mécanismes qui interviennent dans la rupture de la plaque, sa fragilité et la thrombose sont conceptuellement modélisés dans la figure I-5. Pourtant, un nombre significatif de thromboses coronariennes se produisent sans rupture de plaque, mais suite à une érosion de la plaque (Shah, 2003; Shah, 2009).

1.2.2.2. Erosion de la plaque

Des thrombi coronariens se superposant aux plaques athéromateuses sans rupture de la plaque ont été observés dans 20 à 40 % des cas. Ce genre de thrombi naît au niveau de plaques sur lesquelles une érosion faible et superficielle endothéliale a lieu. Ce genre de phénomène,

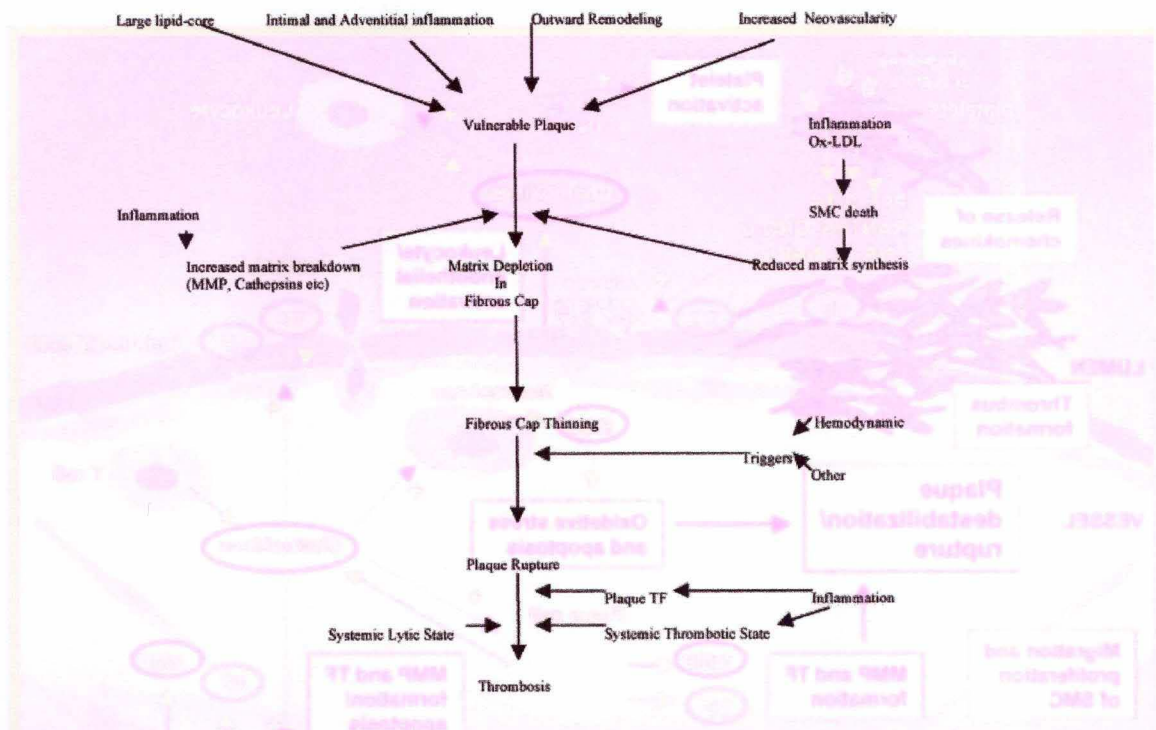


Figure I-5: Modèle conceptuel des mécanismes patho-physiologiques impliqués de manière séquentielle dans la vulnérabilité et rupture de la plaque. Plusieurs facteurs sont pris en compte dans la rupture de la plaque, à savoir la présence, entre autre, d'un cœur lipidique étendu, une inflammation intimale et d'une néovascularisation accrue. Ces facteurs tendent à rendre la plaque vulnérable. Cette dernière, en cas de diminution de « turn-over » matriciel, voit sa partie fibreuse diminuer. Tout ceci converge, en présence de facteurs comme l'hémodynamique, à la rupture de la plaque. (Ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein; MMP, matrix degrading metalloproteinases; SMC, smooth muscle cells; TF, tissue factor) (Shah 2003).

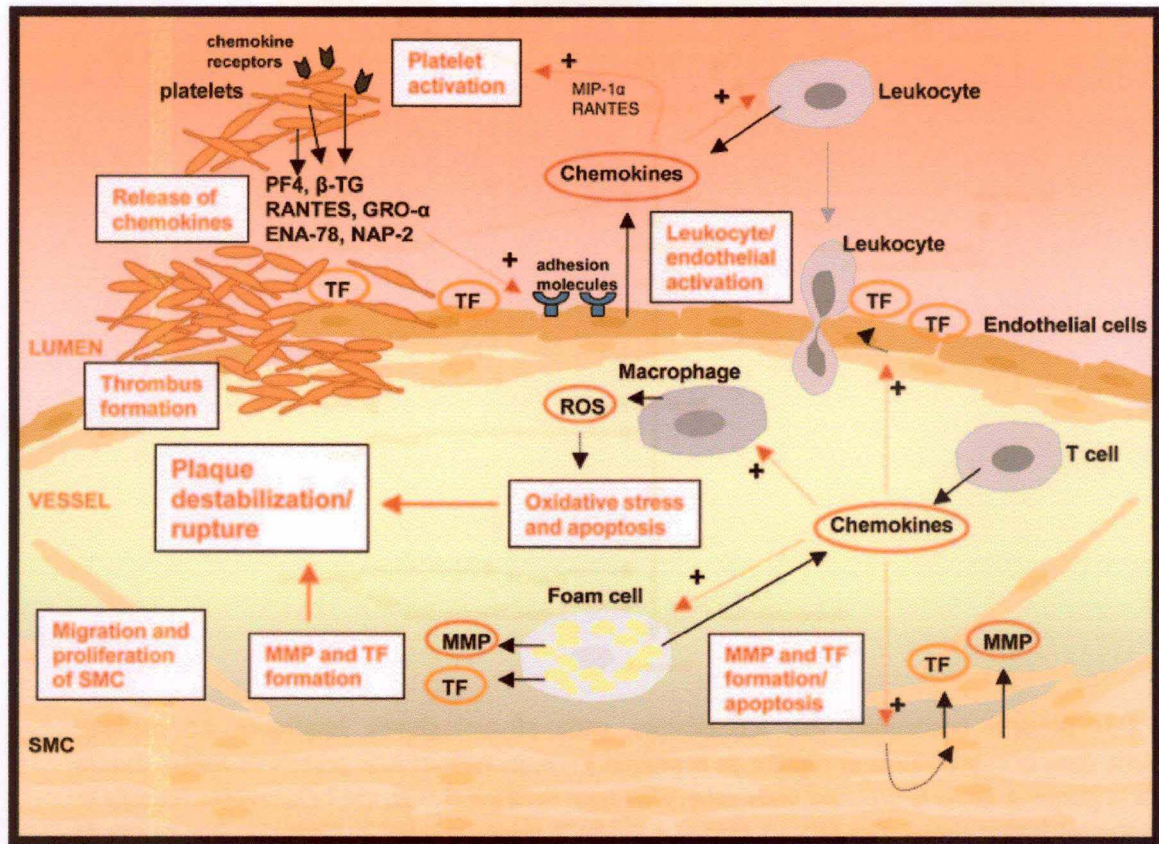


Figure I-6 : Rôle pathogénique des chémokines et implication des plaquettes dans le processus de rupture de la plaque. L'infiltration et l'activation leucocytaire dans les lésions athéromateuses jouent un rôle déclencheur important des syndrômes coronariens aigus (SCA). Ainsi, en favorisant la dégradation matricielle et la production de facteur tissulaire par les VSMCs et les cellules endothéliales, les chémokines sont à la base du processus de rupture de la plaque athéromateuse. De plus, elles promeuvent l'apparition d'un stress oxydatif et l'apoptose des cellules endothéliales et des VSMCs. Le rôle des plaquettes, déjà décrit dans le cas de la formation du thrombus, est également mis en avant dans le développement d'un SCA : les plaquettes activées, notamment par les chémokines libérées au niveau de la lésion, relarguent une série de chémokines comme RANTES, GRO- α , la platelet factor-4, ENA-78 et NAP-2, alimentant de ce fait le processus inflammatoire notamment décrit dans la figure I-4. (GRO- α , growth-related oncogene- α /CXCL1; NAP-2, neutrophil-activating peptide-2/CXCL7; platelet factor 4/CXCL4; ENA-78, epithelial neutrophil activating protein 78/CXCL5; MIP-1, macrophage inflammatory peptide-1/CCL3; RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted/CCL5; β -TG, β -thromboglobulin; MMP, matrix metalloproteinases) (Aukrust, Halvorsen *et al.* 2008).

observé généralement chez de jeunes victimes, des fumeurs ou des femmes, se produit au niveau de plaques à prédominance fibreuse et avec un cœur lipidique réduit. De plus, la prévalence du mécanisme inflammatoire est également plus faible que celui observé dans le cas d'une rupture de la plaque (Shah, 2003; Shah, 2009). La thrombose, dans ce cas, semble déclenchée par l'augmentation d'un état systémique thrombotique, avec une agrégation plaquettaire augmentée et un état fibrinolytique diminué. Les leucocytes, en augmentant la concentration en facteur tissulaire par un effet mécanique d'érosion de la plaque, participent à l'augmentation de cet état pro-thrombotique. De plus, des déficiences en molécules anti-thrombotiques, comme la thrombomoduline et le récepteur à la CRP (C-Reactive Protein) jouent également un rôle dans cet état thrombotique (pour une revue, voir (Shah, 2003; Shah, 2009)).

1.2.2.3. Inflammation et rupture de la plaque

L'infiltration et l'activation de leucocytes sont également considérées comme des déclencheurs du phénomène de rupture de la plaque athéromateuse et dans le déclenchement de syndromes coronariens aigus (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008). Ainsi, les chémokines sont impliquées dans ce phénomène de déstabilisation de la plaque, non seulement en recrutant les leucocytes activés au niveau de la lésion, mais également en contribuant directement à la rupture et à la formation du thrombus en favorisant notamment la production de MMPs, de facteur tissulaire par les cellules endothéliales et VSMCs mais également en augmentant le stress oxydatif et l'apoptose au niveau de la lésion (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008). Même si le rôle des plaquettes est bien connu dans la formation du thrombus, l'inflammation médiée par ces dernières joue également un rôle dans l'apparition de syndromes coronariens aigus. Ainsi, en relarguant une série de médiateurs inflammatoires comme les CCL5, CXCL1, l'epithelial neutrophil activating peptide-78 (ENA-78/CXCL5) ou le CXCL7, les plaquettes, possédant une variété de récepteurs aux chémokines, promeuvent le phénomène inflammatoire au niveau de la plaque et répondent elles-même à des médiateurs libérés à cet endroit (figure I-6) (Stoll et Bendszus, 2006; Aukrust, Halvorsen *et al.*, 2008).

1.2.2.4. Stabilisation de la plaque

Plusieurs études se basant sur des angiogrammes ont montré que les modifications au niveau des facteurs de risque sont capables de diminuer la formation et la progression de la lésion, voire même dans certains cas, de provoquer une régression de la lésion. L'hypothèse générée pour soutenir une stabilisation dérive d'observations sur modèles animaux dans lesquels la diminution des lipides via l'alimentation, l'administration de statines ou l'administration directe d'ApoA1 et d'HDL peuvent mener à une diminution du cœur lipidique de la plaque, du processus inflammatoire, de l'activation et de la production de MMPs ainsi que du facteur tissulaire, et a contrario augmenter la production de collagène au niveau de la plaque. Tout ces mécanismes contribuent à rendre la plaque d'athérome moins susceptible à la rupture et donc plus stable (Shah, 2003; Shah, 2009).

1.3. Modèles expérimentaux utilisés dans le cadre de l'athérosclérose

De nombreux modèles animaux, et plus précisément des modèles murins KO, ont été développés afin d'étudier les processus complexes et imbriqués à la base de la pathologie. Ainsi, la possibilité de développer des traitements préventifs et/ou curatifs dépend de ces modèles, qui imitent de manière la plus similaire possible les conditions physiologiques et métaboliques présentes chez l'humain. La souris est l'animal le plus souvent utilisé, ceci pour des raisons économiques et étant donné les facilités pour la modifier génétiquement, malgré que la souris soit naturellement résistante à la pathologie grâce à son haut taux plasmatique de

	Level	Blood concentration (mg/ml)
Cholesterol	Desirable	< 200
	Borderline High	200 - 239
	High	>240
LDL-Cholesterol	Optimal	<100
	Near Optimal/Above Optimal	100 - 129
	Borderline High	130 - 159
	High	160 - 189
	Very High	>190
HDL-Cholesterol	Low (Men)	<40
	Low (Women)	<50
	High	>60
Triglyceride	Ideal	<100
	Normal	100 - 150
	Borderline High	150 - 200
	High	200 - 500
	Very High	500 - 1000
	Extreme	>1000

Tableau I-2: Concentrations en cholestérol et triglycéride recommandées et à risque (<http://www.cholesterolfocus.com/articles/high-cholesterol/cholesterol-measurement.php>).

HDL (bon cholestérol – voir point 1.5) et son faible taux de LDL (mauvais cholestérol) (pour une revue, voir (Zadelaar, Kleemann *et al.*, 2007)). Les modèles murins les plus courants sont les souris KO pour l'ApoE (ApoE^{-/-}) et pour les récepteurs aux LDL (LDLR^{-/-}). Le modèle murin ApoE^{-/-} développe naturellement une hypercholestérolémie VLDL-dépendante et une athérosclérose spontanée, alors que le modèle LDLR^{-/-} développe la pathologie si et seulement si la souris est nourrie via un régime alimentaire riche en lipides (Zadelaar, Kleemann *et al.*, 2007). Un nouveau modèle ApoE, le modèle murin transgénique ApoE*3Leiden (E3L) semble émerger : ce dernier exprime une forme mutée du gène humain *apoE3*. La souris E3L possède un phénotype hyperlipidémique. Enfin, ce modèle semble intéressant par sa sensibilité accrue aux médicaments capables de réduire les lipides plasmatiques par rapport aux modèles murins classiques ApoE^{-/-} et LDLR^{-/-}. Un autre modèle murin utilisé et décrit dans la littérature est le modèle LDLR^{-/-} combiné avec la surexpression d'un transgène humain codant pour l'ApoB100. Ce modèle ne nécessite pas l'utilisation d'un régime hypercholestérolémique et/ou enrichi en graisses pour développer la pathologie contrairement aux modèles classiques LDLR^{-/-} (Sanan, Newland *et al.*, 1998; Zadelaar, Kleemann *et al.*, 2007). A côté des modèles murins majoritaires coexistent quelques modèles de rats KO pour des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Un modèle de rat connu pour être susceptible au développement de plaques athéromateuses est le rat JCR :LA-cp (Russell, Shillabeer *et al.*, 1998; Russell et Proctor, 2006). Ce rat est intéressant car développant un syndrome extrême de résistance à l'insuline et une sévère obésité tels qu'à l'âge de 12 semaines, il n'y a plus de « turn-over » glucosidique. Ce modèle, hyperinsulinémique à la base, montre également des taux plasmatiques élevés en PAI-1 et un système de coagulation perturbé. Ceci le rend doublement intéressant dans le cadre de l'étude de l'athérosclérose (Russell, Shillabeer *et al.*, 1998; Russell et Proctor, 2006).

1.4. L'athérogenèse, un processus multifactoriel

Il est maintenant clair que la pathologie qu'est l'athérosclérose dépend de l'imbrication complexe de multiples facteurs. Ainsi, mis à part les facteurs de risques et le processus inflammatoire qui ont été décrits précédemment, les dyslipidémies, le dysfonctionnement endothélial et les forces mécaniques sur l'endothélium constituent trois acteurs majeurs dans la pathologie qui seront abordés dans les points suivants.

Les **triglycérides**, le **cholestérol** et les **lipoprotéines** sont impliqués dans la pathologie. On sait depuis longtemps que les taux plasmatiques élevés en LDL constituent un facteur de risque majeur. Il a été également montré que des taux plasmatiques réduits en lipoprotéines de haute densité (HDL), associées au transport inverse du cholestérol, étaient également en partie responsables de la genèse du processus athérosclérotique. Le taux de triglycérides circulants est aussi considéré comme un fait prédictif quant au développement de la pathologie. Finalement c'est le profil lipidique général qui est le plus révélateur : par exemple, une concentration en triglycérides de plus de 2.25 mM associée à un ratio LDL:HDL supérieur à 5 est associée à un grand risque de développer la pathologie, et ceci surtout chez les personnes atteintes de syndrome métabolique ou présentant une résistance à l'insuline (pour une revue, voir (Singh, Mengi *et al.*, 2002). Le tableau I-2 reprend les concentrations en cholestérol recommandées et à risques.

Le **dysfonctionnement endothélial** est également décrit comme étant une composante essentielle déclenchant la pathologie. L'endothélium peut en effet être considéré comme un organe endocrine à part entière (Singh, Mengi *et al.*, 2002) en régulant des fonctions telles que la tonicité vasculaire, la formation de NO[•] ou de prostacyclines, le maintien de la composition de la matrice subendothéliale, la prolifération des VSMCs, la coagulation et la

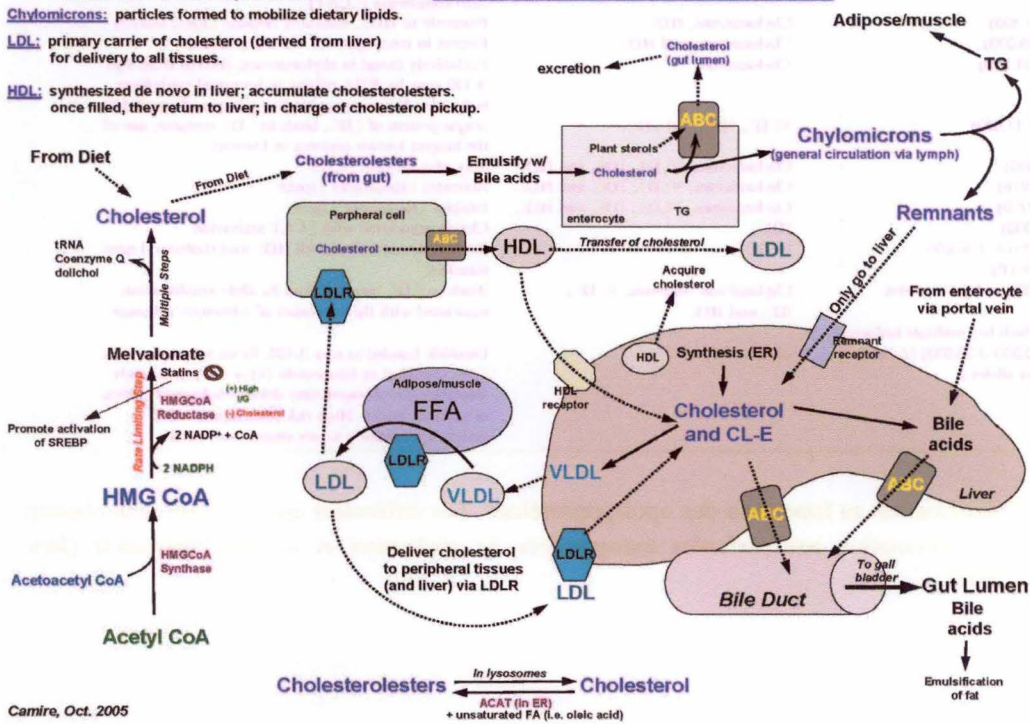
Cholesterol Metabolism #2

VLDL: particles formed to transport *endogenously* derived TG/CL to extra-hepatic tissues.

Chylomicrons: particles formed to mobilize dietary lipids.

LDL: primary carrier of cholesterol (derived from liver) for delivery to all tissues.

HDL: synthesized de novo in liver; accumulate cholesterol esters. once filled, they return to liver; in charge of cholesterol pickup.



Camire, Oct. 2005

Figure I-7: Synthèse et transport du cholestérol. Le cholestérol possède deux origines. Tout d'abord, il peut être synthétisé au niveau du foie par l'HMG-CoA à partir d'Acétyl-CoA, pour former son précurseur, le mévalonate. Ce dernier est repris dans une réaction d'oxydo-réduction par l'HMG-CoA réductase, pour former du cholestérol via une réaction multistep. Le cholestérol trouve aussi son origine dans l'alimentation. Ce dernier est émulsifié au niveau du duodénum par les sels biliaires produits par le foie, pénètre les entérocytes intestinaux via les transporteurs ATP Binding Cassette (ABC) et est intégré aux chylomicrons circulant dans la lymphe. Les muscles utilisant principalement les triglycérides, les chylomicrons chargés en cholestérol sont récupérés au niveau du foie, et restructurés en particule transportrices du cholestérol, à savoir les VLDL. Ces VLDL pénètrent la grande circulation, où, puisque les cellules endothéliales captent encore des triglycérides, ils seront restructurés en Intermediate Density Lipoprotein (IDL, non montrés) et puis en LDL au fur et à mesure que la concentration en cholestérol augmente. Les LDL sont captés par le récepteur aux LDL au niveau des cellules périphériques, où le cholestérol est nécessaire. La formation d'HDL s'opère au niveau du foie, et le chargement des HDL par l'excès de cholestérol via les transporteurs ABC se fait au niveau des cellules périphériques. Les HDL retournent au foie pour être métabolisés. Il s'agit du transport inverse du cholestérol

Apoprotein—[MW (Da)]	Lipoprotein association	Comments
apo A-I (29,016)	Chylomicrons, HDL	Major protein of HDL, activates Lecithin, Cholesterol AcylTransferase (LCAT)
apo A-II (17,400)	Chylomicrons, HDL	Primarily in HDL, enhances Hepatic Lipase activity
apo A-IV (46,000)	Chylomicrons and HDL	Present in triacylglycerol rich lipoproteins
apo B-48 (241,000)	Chylomicrons	Exclusively found in chylomicrons, derived from apo B-100 gene by RNA editing in intestinal epithelium; lacks the LDL receptor-binding domain of apo B-100
apo B-100 (513,000)	VLDL, IDL, and LDL	Major protein of LDL, binds to LDL receptor; one of the longest known proteins in humans
apo C-I (7600)	Chylomicrons, VLDL, IDL, and HDL	May also activate LCAT
apo C-II (8916)	Chylomicrons, VLDL, IDL, and HDL	Activates Lipoprotein Lipase
apo C-III (8750)	Chylomicrons, VLDL, IDL, and HDL	Inhibits Lipoprotein Lipase
apo D (33,000)	HDL	Closely associated with LCAT activation
Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP)	HDL	Exclusively associated with HDL and cholesteryl ester transfers
apo E (34,000) (at least 3 alleles [E ₂ , E ₃ , E ₄])	Chylomicron remnants, VLDL, IDL and HDL	Binds to LDL receptor, apo E ₄ allele amplification associated with the late-onset of Alzheimer's disease
apo (a) (3,00,000–8,00,000) (At least 19 different alleles.)	LDL	Disulfide bonded to apo B-100, forms a complex with LDL identified as lipoprotein (a) or Lp (a); strongly resembles plasminogen; may deliver cholesterol to sites of vascular injury. High risk association with premature coronary artery disease and stroke

Tableau I-3: Classification et fonctions des apolipoprotéines. Les différentes apo-protéines sont classées en fonction de leur association aux particules transportrices du cholestérol et de leur fonction(s) (Jain, Kathiravan *et al.* 2007).

fibrinolyse, la perméabilité aux lipoprotéines et protéines plasmatiques, ainsi que l'adhérence et la migration de leucocytes (pour une revue, voir (Pearson, 2000; Singh, Mengi *et al.*, 2002)). Un endothélium fonctionnel assure ainsi un équilibre entre propriétés anticoagulantes et pro-thrombotiques, vaso-constrictrices et vaso-dilatatrices et enfin anti- et pro-inflammatoires. Ainsi, le NO est un régulateur clef dans la fonction endothéliale. Produit de manière constitutive par la NO synthase endothéliale (eNOS), il agit comme vaso-relaxant. En conditions de stress oxydatif et en présence d'ion superoxyde, il est modifié en peroxynitrite, provoquant d'une part un stress nitrosatif aggravant le stress oxydatif pro-athérogène, et d'autre part, déplace l'équilibre en faveur de l'état thrombotique. En réduisant la disponibilité biologique du NO, le peroxynitrite favorise aussi la migration leucocytaire dans la paroi vasculaire et la prolifération des VSMCs, contribuant donc à la formation de la plaque athéromateuse (Schachinger et Zeiher, 2000).

Le troisième élément clef dans la formation de la pathologie est l'effet mécanique du **flux sanguin** sur l'endothélium. En effet, les forces de cisaillement générées par le flux sanguin, connues sous le nom de « shear stress », étant transduites de manière complexe dans les cellules endothéliales, peuvent exercer un rôle pro-athérogène ou anti-athérogène, et ceci en fonction de la direction, des modalités et de l'intensité du flux. Ce phénomène de « shear stress » est de plus en plus discuté dans la littérature comme étant impliqué dans l'athérogenèse, puisqu'un flux sanguin perturbé induit toute une série d'effets délétères contribuant au développement de la pathologie (pour une revue, voir (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007)).

1.5. Cholestérol, dyslipidémies et athérosclérose

1.5.1. Introduction au transport du cholestérol : les lipoprotéines

Le cholestérol, molécule stéroïdienne amphiphatique est d'abord un constituant indispensable des membranes biologiques et en particulier de la membrane plasmique dont il module la fluidité (pour une revue, voir (Brunham, Kruit *et al.*, 2006; Yokoyama, 2006)). Il est particulièrement abondant au niveau des « lipid rafts ». Au cholestérol est associé un système complexe de transport vers les cellules périphériques par le sang, ainsi qu'un transport inverse assurant le retour du cholestérol vers le foie où il peut être dégradé. La synthèse, le transport et le métabolisme du cholestérol sont repris dans la figure I-7. 20 à 25 % du cholestérol total corporel sont synthétisés par le foie via la HMG-CoA réductase (pour 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA réductase). L'expression de la HMG-CoA réductase, mais aussi celle du récepteur aux LDL natives, sont régulées par le cholestérol via les protéines régulatrices principales SREBP (sterol regulatory element-binding protein 1 et 2) (Tymoczko, 2002; Yokoyama, 2006; Espenshade et Hughes, 2007; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009)). Les SREBP sont des facteurs de transcription liant les SRE, ou Sterol Regulatory Element présent dans les promoteurs de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et de la synthèse des stérols. Les SREBP inactifs sont maintenus au niveau du réticulum endoplasmique. En cas de faible taux en stérols, les SREBP sont clivés et activés, permettant la transcription d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des stérols. Si ces derniers sont présents en haute concentration, le clivage des SREBP est inhibé, permettant ainsi une régulation négative (voir figure I-8) (Shimano, 2001; Bengoechea-Alonso et Ericsson, 2007; Espenshade et Hughes, 2007).

Le cholestérol présentant un domaine hydrophobe majeur, afin d'être transporté dans la circulation sanguine, il doit être incorporé à des particules de transport, appelées lipoprotéines, associant les lipides et des protéines appelées Apo-protéines. Dans le tableau I-3 sont repris les différentes Apo-protéines. Les Apo-protéines structurent les lipoprotéines

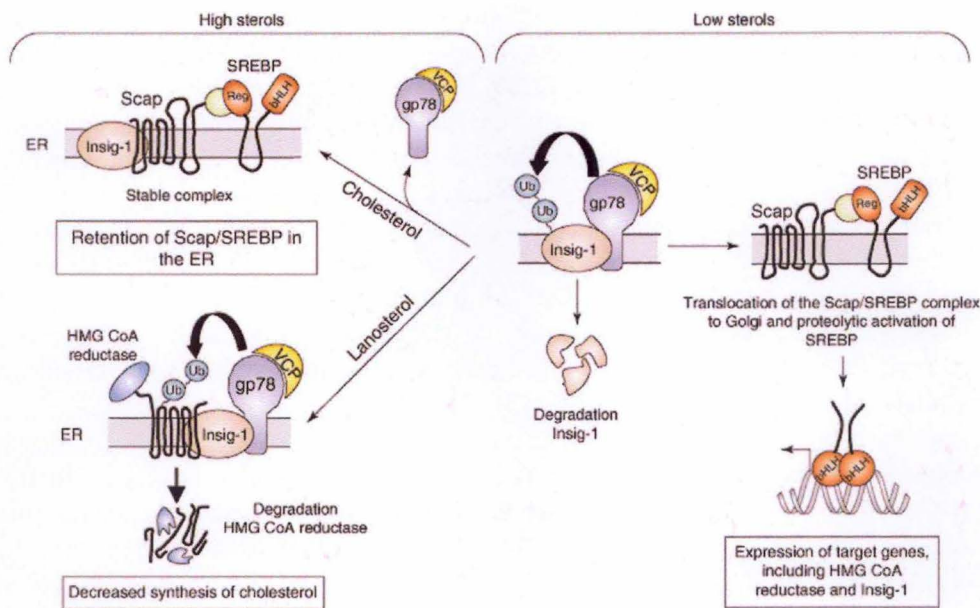
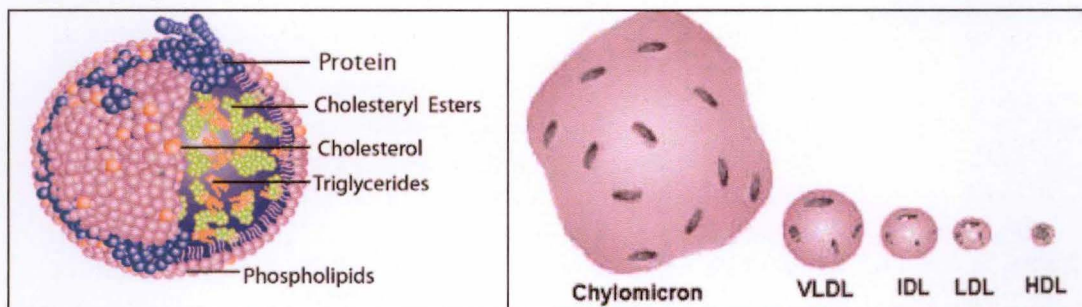


Figure I-8: Activation du facteur de transcription Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP). Dans les cellules déplétées en stérols, Insig-1 interagit avec gp 78/VCP, est ubiquitiné et dégradé. En présence de cholestérol, le complexe Scap/SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) quitte la membrane du réticulum endoplasmique et est activé, induisant la transcription de gènes cibles de SREBP, comme celui codant pour Insig-1 ou des enzymes impliquées dans la synthèse (HMG-CoA, par exemple) et la capture de cholestérol (LDLr). Quand les taux de cholestérol au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique augmentent, le cholestérol se lie à Scap ce qui promeut l'interaction SREBP/Scap avec Insig-1. Ainsi, Insig-1 est stabilisé et le complexe Scap/SREBP est maintenu dans le réticulum endoplasmique. L'activation de SREBP est ainsi bloquée. En parallèle, le lanostérol permet la liaison de l'HMG-CoA réductase à un pool d'Insig-1 associé à gp 78/VCP, ce qui déclenche l'ubiquitination de l'HMG-CoA réductase, sa dégradation et l'inhibition de la synthèse de cholestérol. Insig-1 est à la fois impliqué dans la synthèse et la dégradation du cholestérol (Bengoechea-Alonso and Ericsson 2007).



Particule	Taille (nm)	Densité	Protéines (%)	Triglycérides (%)	Phospholipides (%)	Cholestéryl esters (%)	Cholestérol (%)
VLDL	25-90	0,98	5-12	50-55	18-20	12-15	8-10
IDL	40	1,0	10-12	24-30	25-27	32-35	8-10
LDL	20-25	1,019-1,063	20-22	10-15	20-28	37-48	8-10
HDL	6-12,5	1,12	55	3-15	26-46	15-30	2-10

Figure I-9: Représentation schématique de la LDL et des autres lipoprotéines, avec leurs propriétés respectives (<http://www.scientificpsychic.com/health/lipoproteins-LDL-HDL.html>; (Badimon, Vilahur *et al.* 2009).

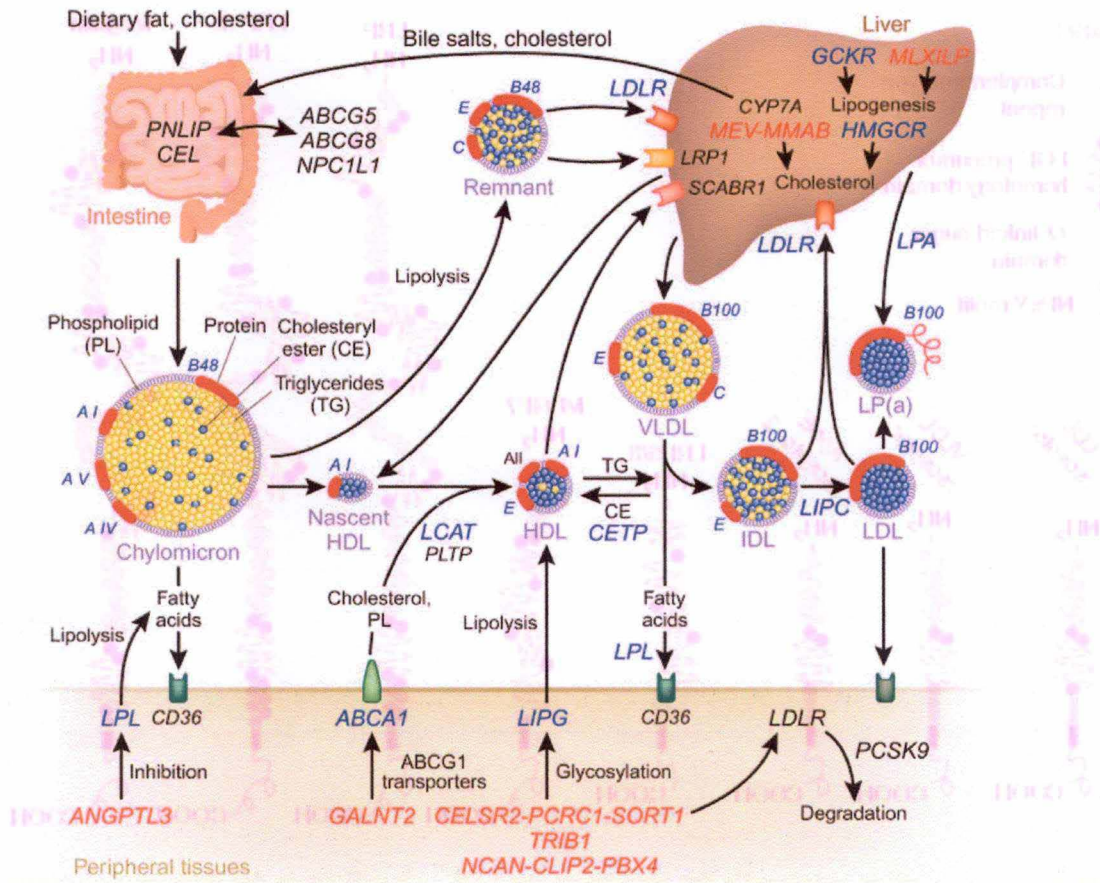


Figure I-10 : Vue générale du métabolisme du cholestérol, avec le rôle des différents types de lipoprotéines avec leur apo-protéines, des protéines de transport et des récepteurs aux lipoprotéines. Dans ce schéma est représenté le transport du cholestérol déjà décrit dans la figure I-7. Les différentes apo-protéines sont mentionnées, ainsi que leur localisation au niveau des différentes particules transportrices du cholestérol, et leurs récepteurs. Les gènes candidats dans le métabolisme des lipides sont également mentionnés. Une estérification du cholestérol a lieu lors du chargement des HDL en cholestérol, par la lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT). La cholesteryl ester transfer protein (CETP) et la phospholipid transfer protein (PLTP) interviennent dans le transfert de lipides entre les particules transportrices du cholestérol dans la circulation sanguine (Lusis and Pajukanta 2008).

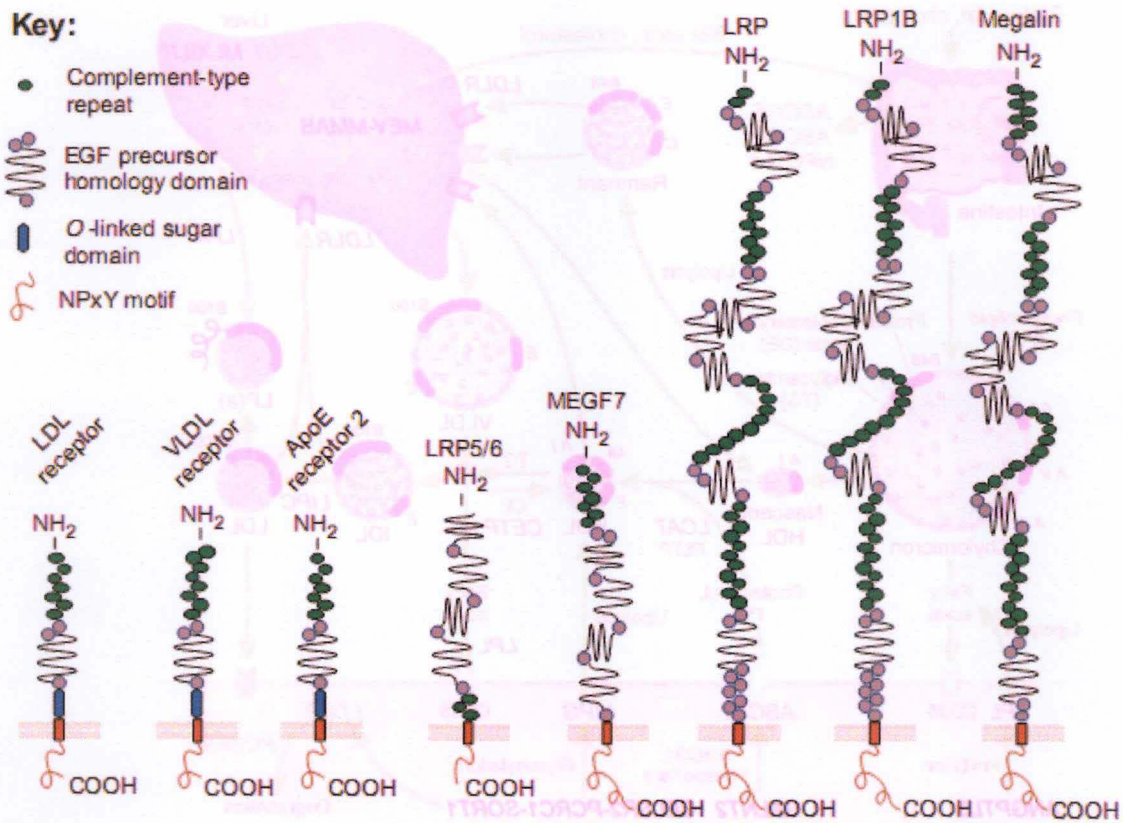


Figure I-11: Organisation structurale des récepteurs aux LDL : classification des différents récepteurs aux lipoprotéines selon la structure du domaine extracellulaire (Nykjaer and Willnow 2002).

(voir figure I-10) et servent de ligand pour divers récepteurs (pour une revue, voir (Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009)). Certaines Apo-protéines sont aussi des cofacteurs d'enzymes. Il existe 4 classes majeures de lipoprotéines, les chylomicrons, les VLDL (pour very low density lipoprotein), les LDL (pour low density lipoprotein) et les HDL (pour high density lipoprotein) (Tymoczko, 2002). Les compositions, tailles et densités des particules transportrices du cholestérol sont reprises dans la figure I-9.

Les **chylomicrons**, sont formés directement après l'absorption intestinale de cholestérol et des triglycérides au niveau du tube digestif. Les chylomicrons, qui constituent les particules transportrices de cholestérol les moins denses sont structurés par les protéines ApoB-48, ApoC et ApoE. Ces particules sont principalement impliquées dans le transport d'acides gras, notamment vers les muscles. Les chylomicrons résiduels dépletés en acides gras sous l'action de la lipoprotéine lipase, retournent au foie, qui exportera alors les **VLDL**. Ces dernières sont structurées par les protéines ApoB-100 et ApoE. Ces VLDL circulantes sont remodelées dans la circulation en **IDL** (pour intermediate low density lipoproteins) via le relargage d'acides gras au niveau du système circulatoire. Ces particules ont deux destins, soit être métabolisées au niveau du foie ou continuer à circuler dans la circulation et se transformer ainsi en **LDL**, particules qui possèdent la plus haute teneur en cholestérol et ce, en se chargeant d'esters de cholestérol à partir des HDL, principalement via la CETP (cholesteryl ester transfer protein) (Tymoczko, 2002). Les LDL sont une classe hétérogène de particules transportrices de cholestérol d'un diamètre de 20 à 25 nm et d'une densité de 1,019 à 1,063 g/ml. Elles sont structurées par l'ApoB-100, reconnue par les récepteurs aux LDL natives, exprimés en membrane cellulaire en particulier au niveau du foie. L'internalisation récepteur-dépendante des LDL, mène à une endocytose via des vésicules tapissées par de la clathrine, vésicules qui seront dirigées vers le lysosome. Les LDL seront dégradés et les acides gras et le cholestérol réutilisés par la cellule (Tymoczko, 2002; Badimon, Vilahur *et al.*, 2009). Les **HDL**, structurées par les ApoA-1, A-II, mais portant d'autres Apo-protéines dont l'ApoE (Tymoczko, 2002; Yokoyama, 2006), assurent le transport inverse du cholestérol des tissus au foie en récupérant celui-ci de la manière suivante : le chargement des HDL en cholestérol se fait grâce à une ATPase membranaire, l'ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) (Tymoczko, 2002; Brunham, Kruit *et al.*, 2006; Yokoyama, 2006; Espenshade et Hughes, 2007) (figure I-10). Les HDL cèdent les esters de cholestérol aux IDL et LDL, comme déjà mentionné.

1.5.2. Les récepteurs aux lipoprotéines

Les récepteurs aux lipoprotéines sont une famille conservée de récepteurs, connus d'abord pour médier l'endocytose des particules LDL (Brown et Goldstein, 1997; Nykjaer et Willnow, 2002), mais plus récemment impliqués dans une série de fonctions cellulaires, comme la transduction du signal. Une classification de ces récepteurs est proposée en figure I-11. Reconnaisant la fraction protéique des lipoprotéines, à savoir l'ApoB-100 et l'ApoE, ces récepteurs sont présents au niveau des puits recouverts de clathrine, impliqués dans l'endocytose médiée par récepteurs. Ce processus se produit majoritairement dans le foie, où environ 70 % du cholestérol (présent dans les LDL) est métabolisé. La vésicule tapissée par la clathrine est dirigée vers l'endosome tardif, où la variation de pH permet la libération de la particule LDL de son récepteur, recyclé ou non. Les produits de dégradation, cholestérol, acides gras et peptides sont alors métabolisés. A ce niveau, il est essentiel de faire un lien avec les SREBP, puisque qu'une haute concentration intracellulaire de cholestérol régule négativement la synthèse d'enzymes impliquées dans la production de stérols, ou encore la production de récepteurs aux LDL (Brown et Goldstein, 1997; Sakakura, Shimano *et al.*, 2001; Nykjaer et Willnow, 2002; Bengochea-Alonso et Ericsson, 2007) (figure I-8).

1.5.3. Marqueurs associés aux maladies cardiovasculaires : lipoprotéines et autres

A coté d'un rapport élevé LDL:HDL classiquement mentionné comme étant pro-athérogène (les concentrations à risque des HDL et LDL sont reprises dans le tableau I-3), ainsi que la présence de LDL modifiées, certaines protéines circulantes sont décrites comme étant des marqueurs des maladies cardiovasculaires telle l'athérosclérose. Ainsi, la C-Reactive Protein (qui appartient avec la pentraxine-3 (PTX-3) et la Serum Amyloid P component (SAP) à la famille des pentraxines, protéines dont le taux sanguin augmente en cas de réaction inflammatoire) est connue comme étant un facteur de risque indépendant pour ces pathologies et est capable d'activer le complément. D'ailleurs, il est bien connu qu'une des composantes du syndrome métabolique (qui augmente de manière significative le risque de développer des lésions athéromateuses) est un taux sanguin élevé de CRP combiné avec un faible taux de HDL (pour une revue, voir (Chait, Han *et al.*, 2005)). Un taux plasmatique élevé en serum Amyloid A (SAA), transportée principalement sur les HDL, est également considéré comme un marqueur d'inflammation. Deux protéines majeures présentes sur les HDL, l'ApoA1 et la protéine PON-1. PON-1 (ou paraoxonase-1) est une enzyme encore mal connue, mais reconnue pour atténuer les modifications oxydatives des protéines et est décrite comme diminuant en cas d'inflammation (Chait, Han *et al.*, 2005; Ng, Shih *et al.*, 2005). En cas d'inflammation, il a été montré que les HDL étaient enrichis en SAA et déplétés en PON-1 (Getz et Reardon, 2008). La clusterine, aussi connue sous le nom d'ApoJ, est également portée par les HDL. Son niveau augmente en réponse à un stimulus inflammatoire, et cette protéine, bien qu'elle reste peu connue, est localisée au niveau de lésions athéromateuses de la même manière que l'ApoA1 et l'ApoE, suggérant leur rôle possible dans la pathologie (Chait, Han *et al.*, 2005).

1.6. Rôle des modifications oxydatives dans l'athérosclérose

1.6.1. Introduction et acteurs principaux impliqués dans la génération d'oxydants

L'hypothèse de la modification oxydative des LDL dans le cadre de l'athérosclérose soutient que les LDL dans leur forme native sont peu athérogènes en tant que telles. Selon cette hypothèse, ce sont les modifications de type oxydatif qui rendent les LDL athérogènes. Les LDL une fois modifiées surtout au niveau de la fraction protéinique, ne sont plus reconnues par le récepteur aux LDL natives, mais par les récepteurs « scavengers » (Chait, Han *et al.*, 2005; Adachi et Tsujimoto, 2006; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007). Ainsi, une oxydation de la fraction lipidique des LDL menant elle même à la modification de l'ApoB-100 au niveau des lysines, favorise l'internalisation des ces LDL modifiées par les macrophages, se différenciant en cellules spumeuses au niveau de la lésion athéromateuse (pour une revue, voir (Stocker et Kearney, 2004; Stocker et Kearney, 2005)). Contrairement aux récepteurs aux LDL natives, les récepteurs « scavengers » ne sont pas régulés par le cholestérol. A côté de ce rôle évident dans la pathologie, d'autres implications des LDL oxydées (oxLDL), ont été démontrées, notamment sur le recrutement de cellules T ou de monocytes, sur la prolifération des VSMCs, dans la production d'anticorps dirigés contre ces oxLDL et dans la formation de complexes immuns facilitant l'internalisation des LDL par des macrophages (Stocker et Kearney, 2004; Stocker et Kearney, 2005). La définition de stress oxydatif et des réactions d'oxydo-réduction qui sont à la base du processus fait intervenir une notion de balance en faveur des oxydants et en défaveur des réducteurs. Un stress oxydatif peut aboutir à une série de réactions rédox menant à la formation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, lui même à la base de la formation d'oxydants secondaires, aboutissent à la formation de ROS (Wink, Cook *et al.*, 1997; Stocker et Kearney, 2004; Stocker et Kearney, 2005). Le stress nitrosatif a été également décrit, car une interaction complexe entre les ROS et RNS existe, générant tout un panel de réponses cellulaires. Les radicaux libres sont considérés comme les oxydants primaires et sont définis comme étant n'importe quelle espèce capable d'une existence indépendante et

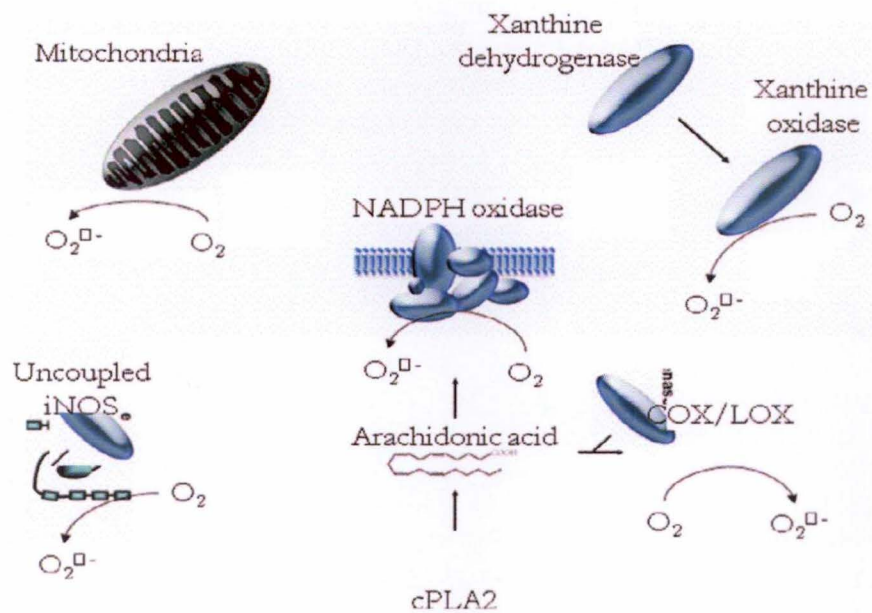


Figure I-12 : Les principaux systèmes de production de radicaux libres chez les macrophages (Calay D, communication personnelle).

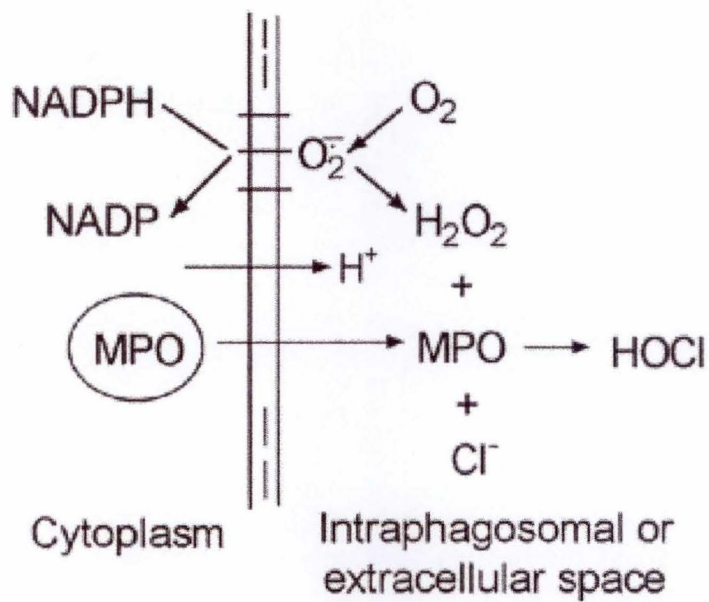


Figure I-13 : Mode d'action de la myéloperoxydase (Klebanoff 2005)

possédant un ou plusieurs électrons non appariés instables (Halliwell, 2007). Deux radicaux libres, oxydants par définition, sont capables de former un lien covalent et de perdre leur caractère radicalaire. Un exemple connu dans le cas du réseau vasculaire est la production de peroxy-nitrite à partir de $O_2^{\cdot-}$ et de NO^{\cdot} . D'autres oxydants, non radicalaires, sont capables de générer un stress oxydatif dans les vaisseaux sanguins, comme l' H_2O_2 , l'hypochlorite ou encore ce même peroxy-nitrite (Halliwell, 2007). Les principaux mécanismes de production de ROS chez les macrophages sont repris dans la figure I-12.

Plusieurs acteurs sont décrits comme pouvant générer des espèces radicalaires. La première source bien connue d'oxydants sont les **NAD(P)H oxydases**, complexes protéiniques membranaires présents dans de nombreux types cellulaires, comme les neutrophiles, les macrophages et les monocytes, mais également non leucocytaires. Ces enzymes sont capables de générer l'anion superoxyde (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005) et sont considérées comme étant la source majeure de ROS au niveau du réseau vasculaire (Pagano, Ito *et al.*, 1995). Les cellules endothéliales, fibroblastes et VSMCs montrent une activité basale de production d'anion superoxyde. Les cellules endothéliales peuvent activer la NAD(P)H oxydase via divers stimuli comme l'angiotensine II, la thrombine, le PGDF, l'IL-1 β , le TNF α , le VEGF et le « shear stress » (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005). Un second générateur de ROS est la xanthine oxydoréductase, une flavoprotéine multifonctionnelle présente dans les cellules endothéliales des capillaires sinusoides. La xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase sont deux formes interconvertibles de la même enzyme, à savoir la xanthine oxydo-réductase (XOR). L'enzyme est synthétisée sous la forme de déshydrogénase, mais elle est facilement convertie en oxydase par oxydation des groupements sulfhydryl ou par clivage. La XOR catalyse la formation de peroxyde d'hydrogène et d'acide urique à partir de xanthine, d'oxygène et d'eau, ou la formation de xanthine et de peroxyde d'hydrogène, à partir d'hypoxanthine, d'oxygène et d'eau. Lors de l'oxydation de la xanthine en acide urique ou de l'hypoxanthine en xanthine, la déshydrogénase intervenant dans ce processus rédox produit du NADH, alors que l'oxydase génère l'anion superoxyde. La formation de la xanthine oxydase, et donc la formation de $O_2^{\cdot-}$, est favorisée au sein des cellules endothéliales soumises à la présence d'un « shear stress » oscillatoire (pro-athérogène) (McNally, Davis *et al.*, 2003; Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005). Les **NO synthases**, ou NOS, sont un groupe d'enzymes catalysant la production de NO^{\cdot} en convertissant la L-arginine en L-citrulline. Ce NO^{\cdot} peut réagir avec l'anion superoxyde et voit alors son rôle protecteur et anti-athérogène modifié en rôle pro-athérogène. La **eNOS**, spécifiquement exprimée au niveau de l'endothélium peut être découplée en présence de ROS. Dans ce cas, l' $O_2^{\cdot-}$ agit comme substrat de la eNOS et sont convertis en anion superoxyde, qui peut lui même réagir avec le NO^{\cdot} présent et abolir son rôle protecteur (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005). La **myéloperoxydase (MPO)**, enzyme contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles, est également impliquée dans la production d'espèces oxydantes. Cette enzyme, impliquée dans la production d'acide hypochloreux (HOCl) à partir de peroxyde d'hydrogène par et de chlorure (Cl^-) (figure I-13) est responsable d'une série de modifications protéiques sur l'ApoB-100 des LDL par formation de chlorotyrosines, de dityrosines et de nitrotyrosines (Heinecke, 2003). Elle est également présente dans la circulation et au niveau des lésions athéromateuses, lui conférant un rôle possible dans la pathologie (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005; Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006). Les **cyclooxygénases** et les **lipoxygénases**, connues pour leur rôle dans la synthèse respectivement de prostaglandines/thromboxanes et leukotriènes, sont capables de catalyser l'insertion stéréospécifique d'une molécule d'oxygène dans un lipide polyinsaturé. Ces enzymes sont également une source de production d'espèces oxydantes, puisque la synthèse des lipides bioactifs mentionnés fait intervenir une réaction

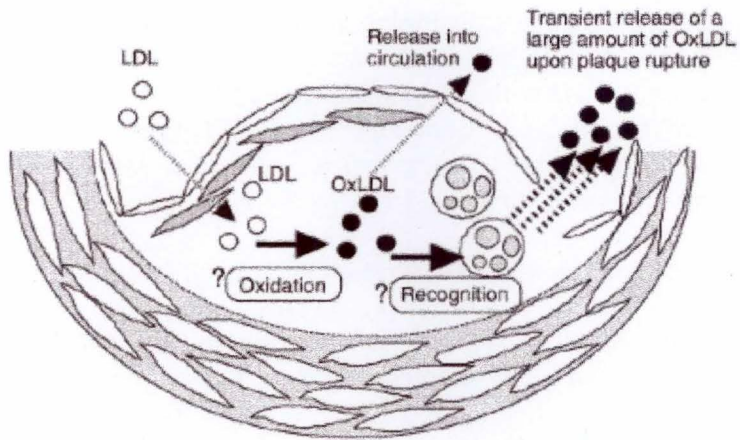


Figure I-14: Oxydation des LDL dans la plaque athéromateuse et relargage de ces dernières dans la circulation sanguine (Itabe 2003)

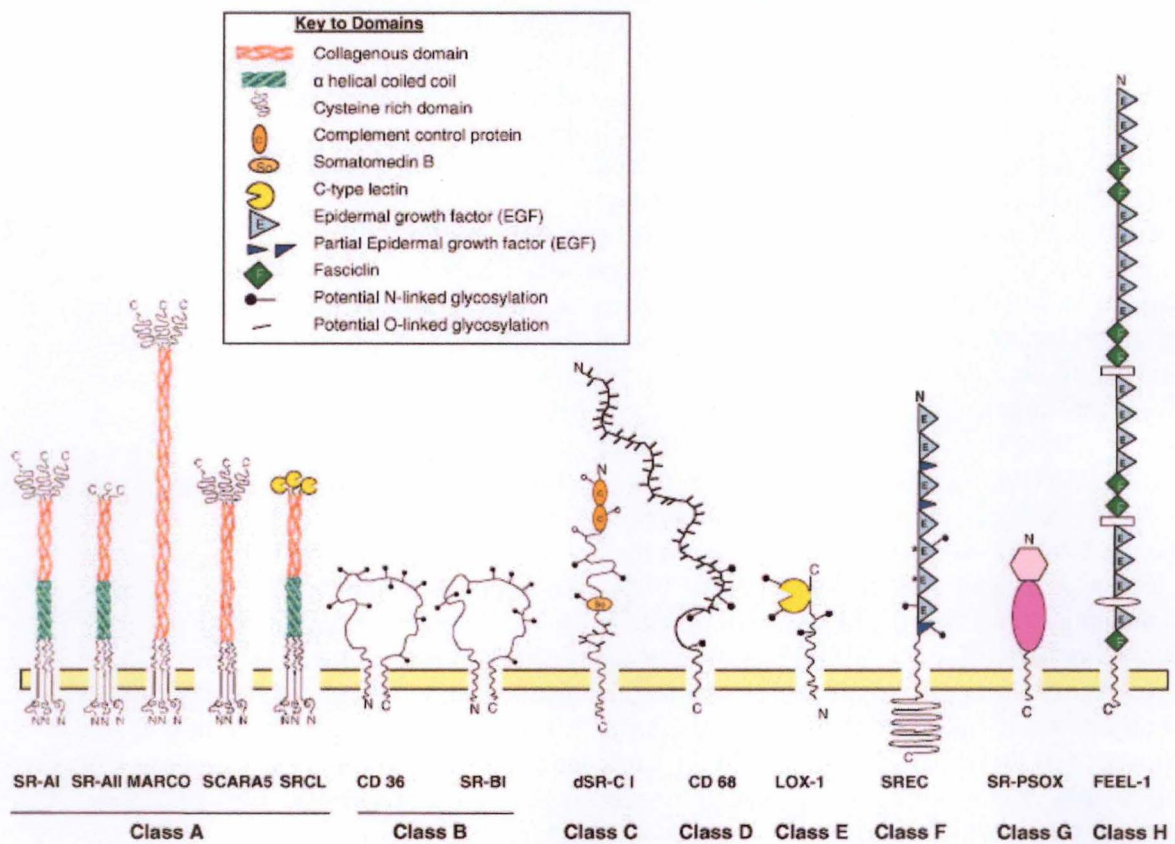


Figure I-15 : Les 8 familles de récepteurs « scavengers » et leurs domaines extracellulaires respectifs classés par homologie (Pluddemann, Neyen *et al.* 2007)

rédox. Enfin, la **respiration mitochondriale** est une source non négligeable de ROS. En effet, la respiration mitochondriale consiste en un transfert d'électrons entre complexes protéiques. Les électrons sont capables de quitter la chaîne de transferts d'électrons, principalement au niveau des complexes I et III et de former ainsi des radicaux libres, comme l'anion superoxyde. Ce dernier peut être neutralisé en peroxyde d'hydrogène par les superoxyde dismutases (SOD), qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde. Cette enzyme existe sous plusieurs formes, en fonction de l'ion métallique qui y est associé et sa localisation. Chez les humains, trois formes sont représentées, à savoir la SOD1 cytoplasmique, la SOD2 mitochondriale et la SOD3 extracellulaire (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005).

1.6.2. Hypothèse des modifications oxydatives dans l'athérosclérose

En accord avec l'hypothèse des modifications oxydatives dans l'athérosclérose, il est décrit que les oxLDL contribuent à l'athérogenèse en facilitant le recrutement de monocytes circulants au niveau de l'intima des vaisseaux, en inhibant la capacité des macrophages à quitter l'intima, en permettant l'augmentation du taux d'internalisation de lipides dans les macrophages favorisant la formation de macrophages spumeux (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005).

1.6.2.1. Oxydation des lipides et des protéines

Les processus d'oxydation touchant les LDL peuvent se produire sur les deux fractions, à savoir la fraction lipidique et la fraction protéique. La fraction lipidique peut elle-même être oxydée à deux niveaux (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005). Les acides gras peuvent subir des modifications, et il a été rapporté que des produits d'oxydation des acides gras étaient présents au niveau des lésions athéromateuses. Des produits hydroxylés de l'acide linoléique ou des HODEs (acides hydroxyoctadécaénoïques) sont les lipides oxydés majoritairement présents au niveau des lésions. Parmi les acteurs possibles intervenant dans leur formation, on évoque souvent les lipoxygénases, qui pourraient directement agir sur la fraction lipidique des LDL (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005; Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006). Des oxystérols, dont la formation dépend de réactions enzymatiques (par exemple le 27-hydroxycholestérol est formé par l'enzyme mitochondriale 27-hydroxylase) ou non-enzymatiques, sont également détectés au niveau des lésions athéromateuses (Bjorkhem, Andersson *et al.*, 1994). Certains oxystérols sont considérés cytotoxiques, comme le 7 β -hydroperoxycholestérol, et peuvent s'accumuler dans les macrophages spumeux (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005).

Des oxydations sur la fraction protéique des LDL peuvent également avoir lieu, principalement au niveau de l'ApoB-100 (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005). Un des modèles développés afin de mimer le processus endogène d'oxydation des LDL a été l'oxydation chimique des LDL par l'ion Cu²⁺ (pour une revue, voir (Burkitt, 2001)). L'ajout de cet ion à des particules LDL génère spontanément des réactions de peroxydation lipidique en chaînes au niveau des acides gras polyinsaturés. Un des sous-produits générés par cette peroxydation lipidique est le malondialdéhyde (MDA), qui constitue d'ailleurs un marqueur *in vivo* présent en quantité chez des patients souffrant de syndrome coronarien aigu (Holvoet, Vanhaecke *et al.*, 1998). Le MDA et les molécules radicalaires produites lors des réactions rédox finissent par attaquer l'ApoB-100. *In vivo*, les mécanismes d'oxydation des LDL restent controversés, et son repris dans la figure I-14 (Itabe, 2003). Un des acteurs capables d'oxyder l'ApoB-100 en conditions patho-physiologiques, est la myéloperoxydase (MPO) (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005), qui a été colocalisée au niveau des lésions athéromateuses avec des LDL modifiées et dont la présence a été montrée dans la

Ligand	Class A		Class B			Class D	Class E	Class F	Class G	Class H
	SR-A	MARCO	SRCL	CD36	SR-BI	CD68	LOX1	SRECI/II	SR-PSOX	FEEL-1/II
AeLDL	+	+/-	-	+	+	ND	-	+	-	+
OxLDL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HDL	-	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	-
LDL	-	ND	ND	+	+	ND	ND	-	-	-
VLDL	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
β -Amyloid	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
Molecular chaperones	Calreticulin gp96	-	ND	ND	-	ND	Hsp70	Calreticulin gp96 Hsp70	ND	Hsp70
ECM	Biglycan Decorin modified collagen type I, III and IV	ND	ND	Thrombospondin collagen type I	ND	ND	Fibronectin	ND	ND	SPARC Hyaluronic acid
AGE	+	ND	ND	+	+	ND	+	-	ND	+/-
Apoptotic cells	+	+	ND	+	+	ND	+	+?	+	ND
Other	Activated B-cells	B-cells of spleen marginal zone UGRP1	Desialylated glycoproteins	Hexarelin long-chain fatty acids		PS-rich liposomes	Pancreatic bile salt-dependent lipase		CXCR6	SI-CLP

ND, not determined.

Abbreviations: AeLDL, acetylated low density lipoprotein; AGE, advanced glycation end product; CXCR6, CXC chemokine receptor 6; ECM, extracellular matrix; HDL, high density lipoprotein; OxLDL, oxidised low density lipoprotein; PS, phosphatidylserine; SI-CLP, stabilin-1 interacting chitinase-like protein; SPARC, secreted protein acidic and rich in cysteine; UGRP1, uteroglobin-related protein-1 on bronchial epithelial cells; VLDL, very low density lipoprotein.

Tableau I-4: Tableau récapitulatif reprenant les différents ligands aux « récepteurs scavenger » (Pluddemann, Neyen *et al.* 2007).

Favorisation de	La formation de macrophages spumeux
	La prolifération des VSMCs et des macrophages
	L'expression des récepteurs « scavengers » sur les macrophages
Action des produits dérivés des LDL oxydées	Cytotoxiques et pro-apoptotiques
	Chémoattractants pour les monocytes et cellules T
	Chémostatiques pour les macrophages
	Délétères pour l'activité du NO
Altération de l'expression génique	Altération de l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les VSMCs
	Par son rôle immunogène, favorise la formation d'auto-anticorps et active les cellules T
Autres rôles des LDL oxydées	Liaison à la CRP
	Activation du complément

Tableau I-5: Rôles pro-athérogènes des LDL oxydées (Stocker and Keane 2004).

circulation sanguine (Moguilevsky, Zouaoui Boudjeltia *et al.*, 2004; Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005; Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006). La MPO est capable de chloriner protéique au niveau des tyrosines de l'ApoB-100 sans qu'il n'y ait oxydation préalable des lipides, même si elle peut dans certaines conditions, dépendant entre autres de sa concentration et du pH, s'attaquer également à la fraction lipidique (Moguilevsky, Zouaoui Boudjeltia *et al.*, 2004; Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005; Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006; Van Antwerpen, Legssyer *et al.*, 2006). Les modifications oxydatives de l'ApoB-100 affectent la reconnaissance des LDL par le récepteur aux LDL natives et c'est une autre catégorie de récepteurs qui va internaliser les LDL modifiées, les récepteurs « scavengers ».

1.6.2.2. Récepteurs « scavengers » aux lipoprotéines

Comme mentionné précédemment, un des facteurs de risque pour l'athérosclérose est la concentration plasmatique excessive en LDL, celles-ci s'accumulant et se modifiant dans l'intima. Un des mécanismes intervenant dans le développement de la maladie est l'internalisation de ces LDL modifiées par les récepteurs « scavenger », exprimés sur divers types cellulaires. Les récepteurs « scavenger » ont été découverts par Brown et Goldstein dans le cadre d'une étude portant sur la manière dont le cholestérol issu des lipoprotéines s'accumulait dans les lésions athéromateuses chez des patients hyperlipidémiques n'exprimant pas le récepteur aux LDL natives (pour une revue, voir (Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007)). Goldstein décrit des récepteurs capables de lier des LDL modifiées, comme par exemple des LDL acétylées (AcLDL), oxydées (oxLDL), mais pas des LDL natives. Depuis, un grand nombre de récepteurs ont été découverts liant les LDL modifiées en général, mais aussi des ligands polyanioniques, des lipides ou polysaccharides ou les complexes haptoglobine:hémoglobine, voire même des structures bactériennes (Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007) (Tableau I-4). Ces récepteurs sont classés selon leur domaine extracellulaire et sont ainsi répartis en 8 classes différentes (de A à H) (figure I-15). Bien que l'expression de nombreux récepteurs « scavenger » soit limitée aux cellules de la lignée myéloïde et de certaines cellules endothéliales, certaines cellules épithéliales sont également capables d'en exprimer (Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007).

Les macrophages expriment toute une série de récepteurs « scavenger ». Un des plus décrits est sans doute le récepteur SR-A appartenant à la classe A, liant une série de molécules comme les oxLDL ou AcLDL (Adachi et Tsujimoto, 2006; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007) (Tableau I-4). SR-A, capable de reconnaître ces lipoprotéines au niveau de la partie lipidique modifiée plus qu'au niveau de la fraction protéique, intervient dans la formation des cellules spumeuses à partir de macrophages, et donc dans le processus athéromateux. SR-A médie également l'adhérence des macrophages à la matrice extracellulaire produite par les VSMCs au niveau de la lésion (Adachi et Tsujimoto, 2006; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007). D'autres récepteurs, de classe B, comme le CD36 et le SR-B1 sont également décrits. Le CD36 est impliqué dans l'internalisation des oxLDL et est exprimé principalement par les macrophages, mais aussi par les plaquettes, les adipocytes et certaines cellules endothéliales ou épithéliales. Le SR-B1 (dont l'homologue humain est connu sous le nom de CLA-1) est lui impliqué dans la liaison des HDL non modifiées et l'efflux de cholestérol, et est exprimé par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (Adachi et Tsujimoto, 2006; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007). A côté des ligands classiquement décrits, il a été montré que CD36 lie les AcLDL, les VLDL et les HDL. SR-B1 est également capable de lier les AcLDL avec une plus grande affinité que CD36. Il est aussi capable de reconnaître les oxLDL, les VLDL et les LDL natives avec une bonne affinité. De nombreuses données appuient l'implication des récepteurs de classe A et B dans la pathologie de l'athérosclérose.

Alors que les récepteurs de classe C et D sont relativement moins bien décrits, le seul récepteur « scavenger » de classe E, le LOX-1 est connu comme étant le récepteur majeur aux oxLDL exprimé par les cellules endothéliales. Il est également exprimé par les macrophages et les VSMCs sous différentes conditions (pour une revue, voir (Adachi et Tsujimoto, 2006; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007)). La reconnaissance des oxLDL par le LOX-1 s'opère via la partie protéique puisque des oxLDL délipidées lient également à ce récepteur avec la même affinité. Certains récepteurs de classe F, comme le SREC-I, d'abord décrit comme un récepteur endothélial puis ensuite découvert aussi sur les macrophages, est également capable de lier les oxLDL et les AcLDL. Enfin, le récepteur de classe G SR-PSOX est exprimé par les macrophages et est connu pour lier les oxLDL et le CR-6 exprimé par les cellules dendritiques, les « natural killers » (NK) et les cellules T. Enfin, un récepteur de classe H est connu pour ne lier que les AcLDL, le récepteur FEEL-1 (Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007).

1.6.2.3. Lipoprotéines oxydées : présence au niveau des lésions athéromateuses et dans la circulation

Si l'oxydation des LDL est une condition requise pour le développement de la pathologie, le site d'oxydation reste toujours controversé (figure I-14). Classiquement, le site majeur d'oxydation généralement admis des LDL est l'intima et il est donc logique de rechercher des LDL oxydées au niveau des lésions athéromateuses. Mais il est clair qu'on détecte aussi des oxLDL circulantes. Une des approches majeures démontrant directement la présence d'oxLDL est l'utilisation d'anticorps reconnaissant des épitopes présents sur les LDL oxydées et pas sur les LDL dans leur forme native et non oxydée (Stocker et Keaney, 2004; Stocker et Keaney, 2005). Un des moyens de générer des anticorps contre des oxLDL est d'immuniser des souris BALB/C avec des fractions de LDL oxydées (Moguilevsky, Zouaoui Boudjeltia *et al.*, 2004). Les épitopes reconnus par les anticorps sont étudiés par radioimmunoassai (RIA) et leur affinité peut être ainsi évaluée. Ces approches ont été concluantes, et il a été montré que ces épitopes se colocalisaient largement avec les macrophages au niveau des lésions (Stocker et Keaney, 2004). D'autre part, il a été montré que les LDL isolées à partir de lésions athéromateuses humaines montraient des taux élevés de chlorotyrosines, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle la MPO serait capable d'oxyder les LDL *in vivo*. Une autre étude soutient également cette hypothèse (Van Antwerpen, Legssyer *et al.*, 2006). En effet, en utilisant des anticorps dirigés contre des LDL modifiés par la MPO, il a été montré qu'ils ne réagissaient ni avec les LDL dans leur forme native, ni avec les VLDL, ni avec les LDL oxydées chimiquement avec du sulfate de cuivre ou par du peroxyde d'hydrogène. Cette équipe a aussi démontré que ces anticorps réagissaient uniquement au niveau des lésions athéromateuses et non au niveau des artères saines.

On trouve également un peu d'oxLDL plasmatiques. En effet, il a été rapporté via des analyses chimiques qu'une proportion non négligeable de LDL circulantes possèdent une fraction lipidique oxydée (Stocker et Keaney, 2004). L'origine de ces oxLDL reste controversée. Puisque les LDL peuvent traverser l'endothélium, on peut s'attendre à ce qu'une partie des LDL oxydées dans l'intima retourne dans le plasma sanguin (Itabe, 2003) (figure I-14). Mais on n'exclue plus que dans certaines conditions localement, une partie des LDL puissent s'oxyder dans le plasma, bien que dernier contienne des antioxydants qui fournissent en principe une protection contre l'oxydation. Cette oxydation pourrait se dérouler localement par exemple dans des zones endothéliales dysfonctionnelles, en conditions pro-inflammatoires où les LDL et la MPO seraient piégées dans les protéoglycans et le glycocalyx, permettant ainsi leur oxydation extracellulaire.

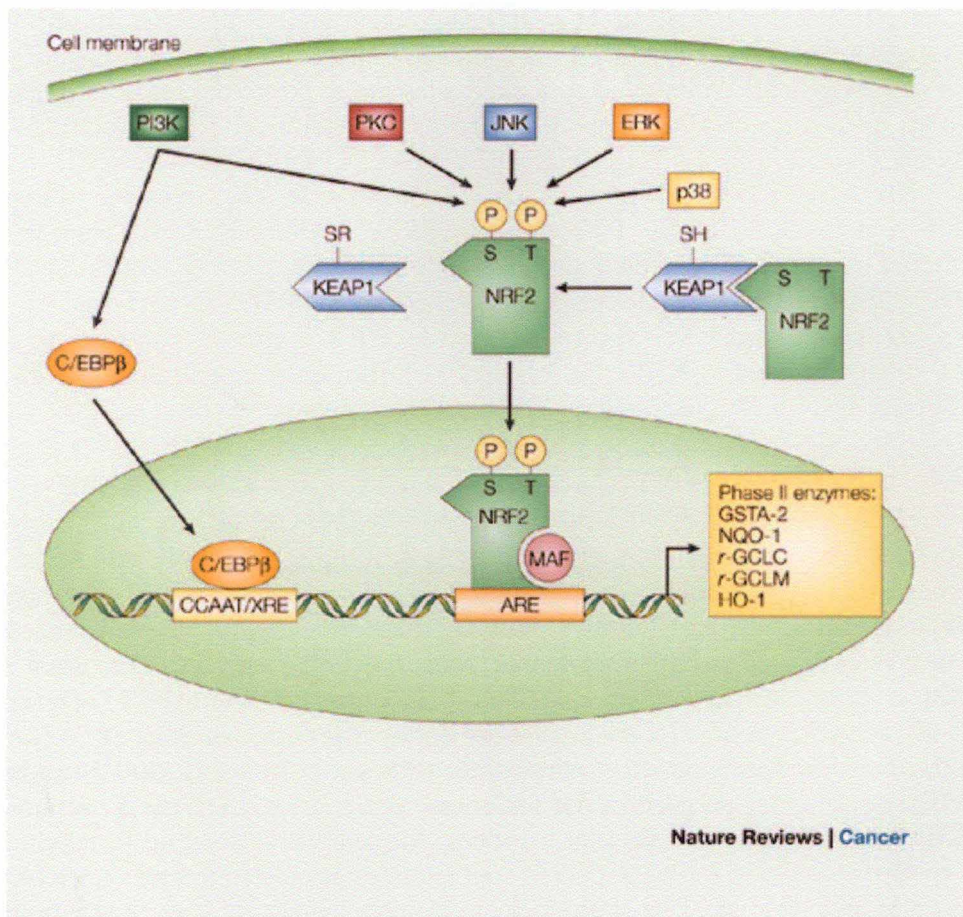


Figure I-16: Vue d'ensemble de la voie Nrf2, adapté à partir de (Surh 2003)

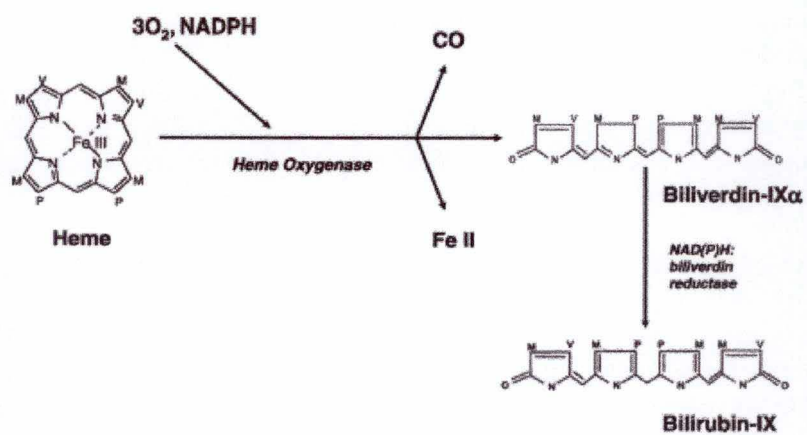


Figure I-17: Activité de l'hème oxygénase-1 : réaction de dégradation des groupements hémiques (Ryter, Alam *et al.* 2006)

Si les sites d'oxydation des LDL restent à confirmer, tout le monde s'accorde pour attribuer une série d'activités pro-athérogènes aux LDL oxydées comme résumé dans le Tableau I-5. Enfin, les LDL oxydées seraient capables d'induire un stress oxydatif. Dans le paragraphe suivant nous aborderons donc un facteur de transcription qui permet aux cellules de réagir face à un stress oxydatif.

1.6.2.4. Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la perception des modifications oxydatives

1.6.2.4.1. Nrf2 et la réponse antioxydante

Les ROS à fortes concentrations, sont clairement délétères et causent notamment des dommages à l'ADN et à diverses molécules. Les conditions pathologiques liées au stress oxydatif sont typiquement les maladies neurodégénératives, l'arthrite ou encore l'athérosclérose (pour une revue, voir (Niture, Kaspar *et al.*, 2009)). Face à un stress oxydatif modéré, un grand nombre de facteurs ont été mis en place dans la cellule, permettant de moduler l'expression génique pour mieux faire face à ce stress oxydatif. Parmi ces facteurs, signalons la « Heat Shock Response Activator Protein-1 », Nrf2 (pour « NF-E2 related factor 2 »), des protéines de la voie des MAPK (ERK1/2), la protéine kinase B (Akt) et NFκB. Ces facteurs favorisent la survie cellulaire, alors qu'une activation prolongée de c-Jun, des N-terminal kinases (JNK) ou encore de la kinase p38 mène à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose (Halliwell, 2007; Niture, Kaspar *et al.*, 2009).

La voie dépendante de Nrf2 est toutefois la plus importante dans la réponse aux stress oxydatifs modérés, générés par exemple par une exposition aux métaux, aux radiations ou encore aux agents chimiques endogènes ou exogènes (Dhakshinamoorthy, Long *et al.*, 2000; Niture, Kaspar *et al.*, 2009). La voie Nrf2, détaillée dans la figure I-16, est responsable de la transcription d'une série de gènes encodant des enzymes de détoxification, comme la NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO1), la glutathione S-transférase (GST), l'hème oxygénase-1 (HO-1), la sous-unité régulatrice de la glutamate cystéine ligase (GCL également connue sous l'acronyme GCS pour gamma-glutamyl cystéinyl synthétase)(GCL modifier subunit ou GCLM), ou encore des gènes codant pour des antioxydants et des protéines possédant cette fonction, comme des thiorédoxines, ou la catalase (CAT) (Dhakshinamoorthy, Long *et al.*, 2000; Niture, Kaspar *et al.*, 2009). La NQO1 est une flavoprotéine agissant en compétition avec les cytochrome P450 réductases et qui catalyse la réduction et la détoxification de quinones ou d'autres complexes rédox. La GST, quant à elle, conjugue des électrophiles hydrophobes avec le glutathion, favorisant leur excrétion. La HO-1 catalyse la première étape, limitante, dans le catabolisme des noyaux hèmes (figure I-17). La HO-1 sera plus amplement discutée dans le point suivant, car elle se caractérise par une régulation complexe. La GCS intervient elle au niveau de l'étape limitante de la synthèse du glutathion, molécule clef dans le contrôle du statut rédox de la cellule (rapport GSH/GSSG) (Dhakshinamoorthy, Long *et al.*, 2000; Niture, Kaspar *et al.*, 2009)

Des expériences de mutagenèse dirigée ou de transfection ont montré un élément présent au niveau des promoteurs des gènes cibles de Nrf2, une séquence consensus nommée ARE pour « Antioxidant Response Element », intervenant dans la régulation et l'expression coordonnée de ces gènes en réponse à des antioxydants ou des xénobiotiques. La séquence GCT GAGTCA est connue pour être le cœur de la séquence ARE (Itoh, Chiba *et al.*, 1997; Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2000; Dhakshinamoorthy, Long *et al.*, 2000; Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2001; Jaiswal, 2004; Niture, Kaspar *et al.*, 2009). Nrf2 possède un homologue Nrf1, mais Nrf2 reste le plus efficace dans la transcription de gènes possédant la séquence ARE dans leur promoteur. Il existe un autre homologue de Nrf2, Nrf3. Il a été

montré que ce dernier possède un rôle antagoniste à celui de Nrf2, puisqu'il régule négativement l'expression de la NQO1 (Sankaranarayanan et Jaiswal, 2004).

En conditions basales, Nrf2 est maintenu dans le cytoplasme par son inhibiteur KEAP-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, également connu sous le terme INrf2) (Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2001; Niture, Kaspar *et al.*, 2009). Cette liaison de KEAP-1 à Nrf2 dans le cytoplasme mène à l'ubiquitination de Nrf2 et à sa dégradation par le protéasome (voir figure I-16). Un traitement de la cellule avec des oxydants ou des xénobiotiques induit des modifications rédox sur KEAP-1 permettant le relargage de Nrf2 de son inhibiteur. Nrf2 est alors capable de migrer dans le noyau, de dimériser avec une petite protéine Maf et d'induire l'expression des gènes mentionnés ci-dessus (Itoh, Chiba *et al.*, 1997; Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2001; Jaiswal, 2004; Kensler, Wakabayashi *et al.*, 2007; Niture, Kaspar *et al.*, 2009). Des analyses de la séquence en acides aminés de KEAP-1 révèlent un domaine BTB/POZ BTB (broad complex, tramtrack, bric-a-brac)/POZ (poxvirus, zinc finger) et un domaine Kelch-like (Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2001; Jaiswal, 2004). Le domaine BTB/POZ est impliqué dans des interactions protéines/protéines à la base de la liaison entre Nrf2 et son inhibiteur. De nombreuses kinases sont également impliquées dans l'activation de Nrf2. La PKC (protéine kinase C) peut phosphoryler Nrf2 sur sa sérine 40 et ainsi induire une localisation nucléaire (Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2001; Bloom et Jaiswal, 2003; Jaiswal, 2004; Kensler, Wakabayashi *et al.*, 2007). La PI3K est également impliquée dans l'activation de Nrf2, et ceci suite à un « shear stress » athéro-protecteur (point 1.8.2 sur le « shear stress ») et via la production de ROS (Bloom et Jaiswal, 2003). Cullinan *et al.* ont montré une interaction directe entre Nrf2 et PERK, cette dernière kinase jouant un rôle clef dans la réponse au stress du réticulum ou UPR (pour « unfolded protein response ») (Cullinan, Zhang *et al.*, 2003). Une phosphorylation par PERK améliorerait la translocation nucléaire de Nrf2 (Bloom et Jaiswal, 2003).

Dans le cadre de l'athérosclérose, présentant à la fois une composante oxydative (ROS) et une composante inflammatoire, il est intéressant de se pencher sur les « cross-talks » entre la voie NFκB et la voie Nrf2. Des études (Jin, Wang *et al.*, 2008; Jin, Zhu *et al.*, 2008) ont montré une relation entre ces deux voies. En effet, en utilisant un modèle de souris Nrf2^{-/-} soumise à un dommage traumatique au cerveau, les auteurs ont montré un rôle protecteur de Nrf2 ; ces auteurs montrent que ces souris KO étaient plus sensibles à l'activation de NFκB et que l'expression et la production des cytokines inflammatoires comme le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6, ou encore l'expression d'ICAM-1 sont augmentés.

1.6.2.4.2. Les hèmes oxygénases

Les hèmes oxygénases, représentées par des isozymes inductibles et constitutives (HO-2 codé par *hmox-2* et HO-1 codé par *hmox-1* respectivement) catalysent la première étape (limitante) de la dégradation oxydative des groupements hèmes en biliverdine, un pigment biliaire, et en CO intracellulaire (figure I-17). La biliverdine est reprise par la biliverdine réductase, qui catalyse sa conversion en bilirubine (pour une revue, voir (Ryter, Alam *et al.*, 2006)). La distribution tissulaire des deux isozymes est assez différente. En effet, alors que HO-1 est exprimée de manière plus ubiquiste, dans le système nerveux, le système vasculaire, le foie, les reins et le système digestif, HO-2 est quant à elle principalement détectée dans la rate, le foie et la moëlle osseuse. Les deux isozymes présentent une localisation cellulaire similaire, à savoir au niveau du réticulum endoplasmique. Il a été montré que l'HO-1 pouvait également se localiser dans le noyau et au niveau de la membrane plasmique, notamment au niveau des cavéoles des cellules endothéliales (Ryter, Alam *et al.*, 2006). HO-1 possède une régulation remarquablement complexe, sa transcription étant modulée par une série de stress chimiques

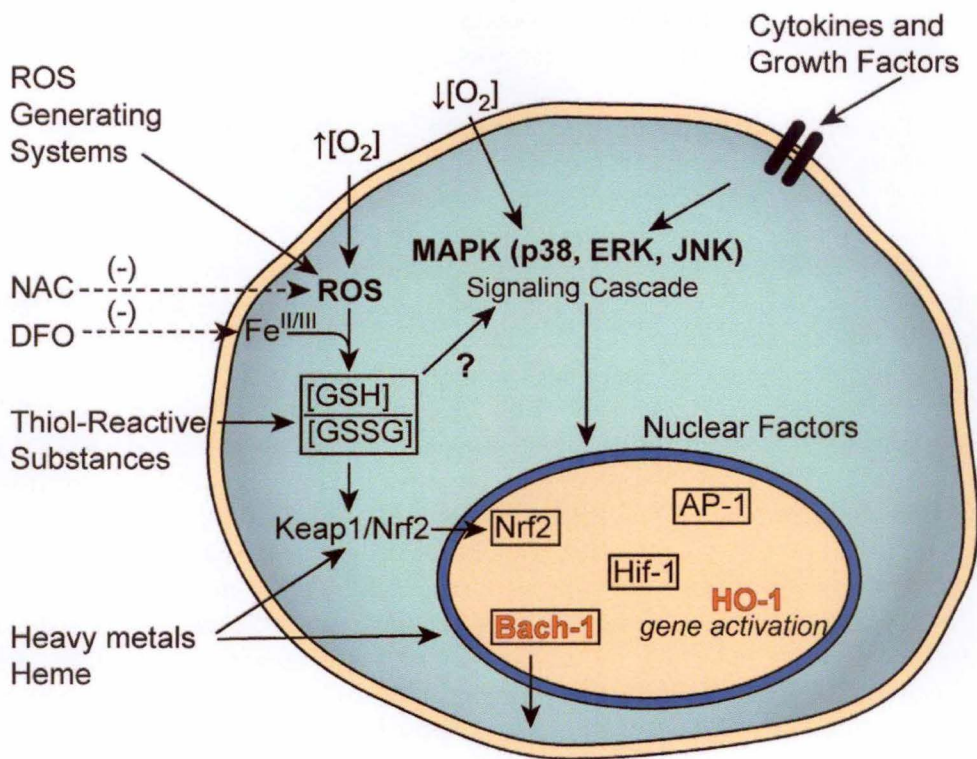


Figure I-18 : Transduction du signal associée à l'activation de *ho-1* (Ryter, Alam *et al.* 2006).

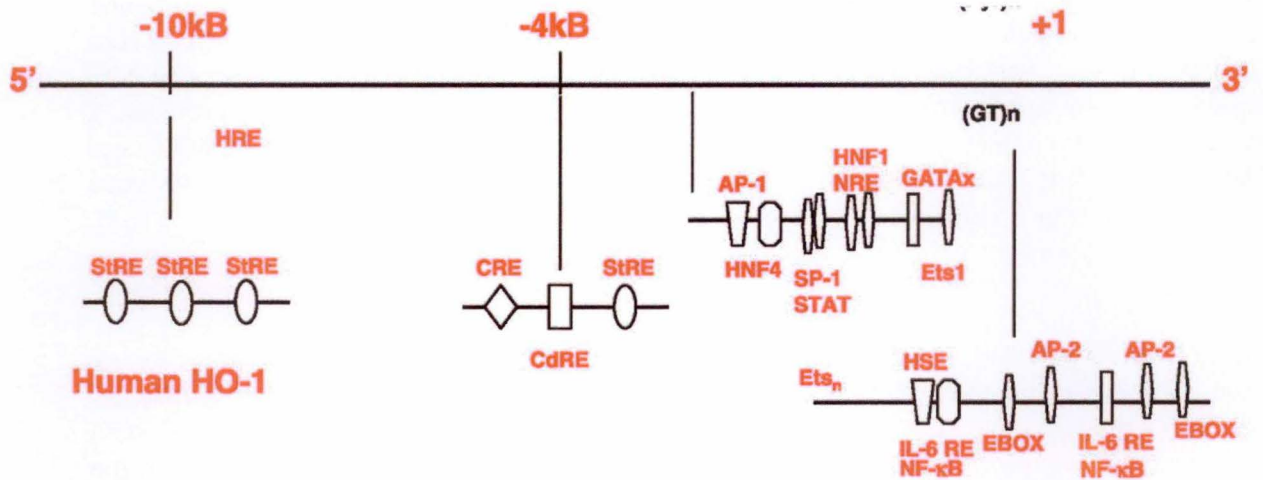


Figure I-19: Structure du promoteur humain d'*ho-1* (Ryter, Alam *et al.* 2006).

ou physiques. La transduction du signal associée à sa régulation est également complexe. En effet, la voie des MAPK ainsi que celles impliquant la PI3K, des tyrosines kinases et les PKA, C et G semblent jouer un rôle dans la transcription de *ho-1* (Elbirt et Bonkovsky, 1999; Immenschuh et Ramadori, 2000; Ryter, Alam *et al.*, 2006) (figure I-18). L'analyse des régions distales du gène *ho-1* humain révèle une région « enhancer » située entre -3500 et -4500 pb (figure I-19). Cette région est capable de provoquer l'induction de *ho-1* par exemple suite à une induction par les groupements hémiques ou en présence de cadmium, aussi bien que suite à un « shear stress » et à la présence de divers oxydants comme, par exemple, les phospholipides oxydés (Ryter, Alam *et al.*, 2006). Le gène humain de l'*ho-1* possède également dans ses régions distales des sites consensus pour AP-1 (liant donc c-fos/c-jun, cet hétérodimère étant en aval de la voie des MAPK) et un site de liaison pour NFκB existe de -156 à -166 pb, se superposant à des sites putatifs pour l'IL-6. Cependant, la médiation de la réponse antioxydante par NFκB et l'induction de *ho-1* dans ce cas là n'a pas encore été démontrée. En plus des sites AP-1 et NFκB clairement identifiés, des sites putatifs pour STAT-3, ainsi que des IL-6 RE (IL-6 Responsive Elements) (Ryter, Alam *et al.*, 2006). La régulation d'*ho-1* est donc très complexe et même si la voie canonique de son induction par Nrf2 est bien décrite, il reste encore à évaluer la part que joue NFκB dans cette induction.

1.7. La NO[•] synthase endothéliale et le dysfonctionnement endothélial

La tonicité vasculaire est modulée principalement via la prostacycline (PGI₂) et via l'oxyde nitrique (NO[•]), molécule décrite comme étant le vasodilatateur le plus importante exerçant un rôle protecteur dans le système vasculaire (Tai, Robb *et al.*, 2004; Forstermann et Munzel, 2006; Bonaventura, Lunardi *et al.*, 2009). Le NO[•] a été nommé molécule de l'année en 1992 (Tai, Robb *et al.*, 2004; Forstermann et Munzel, 2006). La synthèse d'oxyde nitrique (NO[•]) est assurée par les NO synthases (NOS) en catalysant la conversion d'une molécule de L-arginine en L-citrulline (figure I-20 et I-21) (Tai, Robb *et al.*, 2004; Forstermann et Munzel, 2006; Bonaventura, Lunardi *et al.*, 2009). La production de NO[•] vasculaire est principalement assurée par la eNOS. Le mécanisme protecteur généré par le NO[•] passe par la stimulation de la guanyll cyclase et l'augmentation de la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) dans les VSMCs induisant la vasorelaxation (Forstermann et Munzel, 2006). Le NO[•] est également un inhibiteur puissant de l'agrégation plaquettaire et peut diminuer l'adhésion leucocytaire sur les membranes des cellules endothéliales en diminuant l'expression des molécules d'adhérence. Enfin, le NO[•] peut diminuer la prolifération des VSMCs (Forstermann et Munzel, 2006). Tous ces rôles sont décrits comme étant anti-athérogènes.

La synthèse du NO[•] vasculaire passe par la eNOS, enzyme homodimérique, comportant un noyau hémique par sous-unité. Les noyaux hémiques sont requis pour la dimérisation. Chaque sous-unité comporte un domaine oxygénase N-terminal et un domaine réductase à l'extrémité C-terminale, avec différents domaines de liaison pour l'arginine, l'hème et le BH₄ (cofacteur tetrabioptérine) au niveau du domaine oxygénase et pour les FMN, NADPH et FAD au niveau du domaine réductase. L'enzyme est également régulée par le calcium de manière calmoduline-dépendante. La structure de l'enzyme et la synthèse du NO[•] sont elles détaillées dans la figure I-22. La production de NO[•] et de L-citrulline par la eNOS endothéliale est intimement liée à la concentration intracellulaire du cofacteur BH₄ et requiert également des concentrations suffisantes en arginine. Mais la eNOS peut se convertir en un système producteur d'ions O₂⁻ quand elle est sous forme monomérique (figure I-23A) ou quand l'arginine n'est pas assez abondante (figure I-23B). La synthèse de O₂⁻ a aussi été attribuée au découplage de l'enzyme en cas de stress oxydatif qui altère le BH₄ (figure I-23C) et déstabilise l'enzyme (figure I-23D) (Tai, Robb *et al.*, 2004; Forstermann et Munzel, 2006; Bonaventura, Lunardi *et al.*, 2009). Une supplémentation en BH₄ diminue la production d'O₂⁻

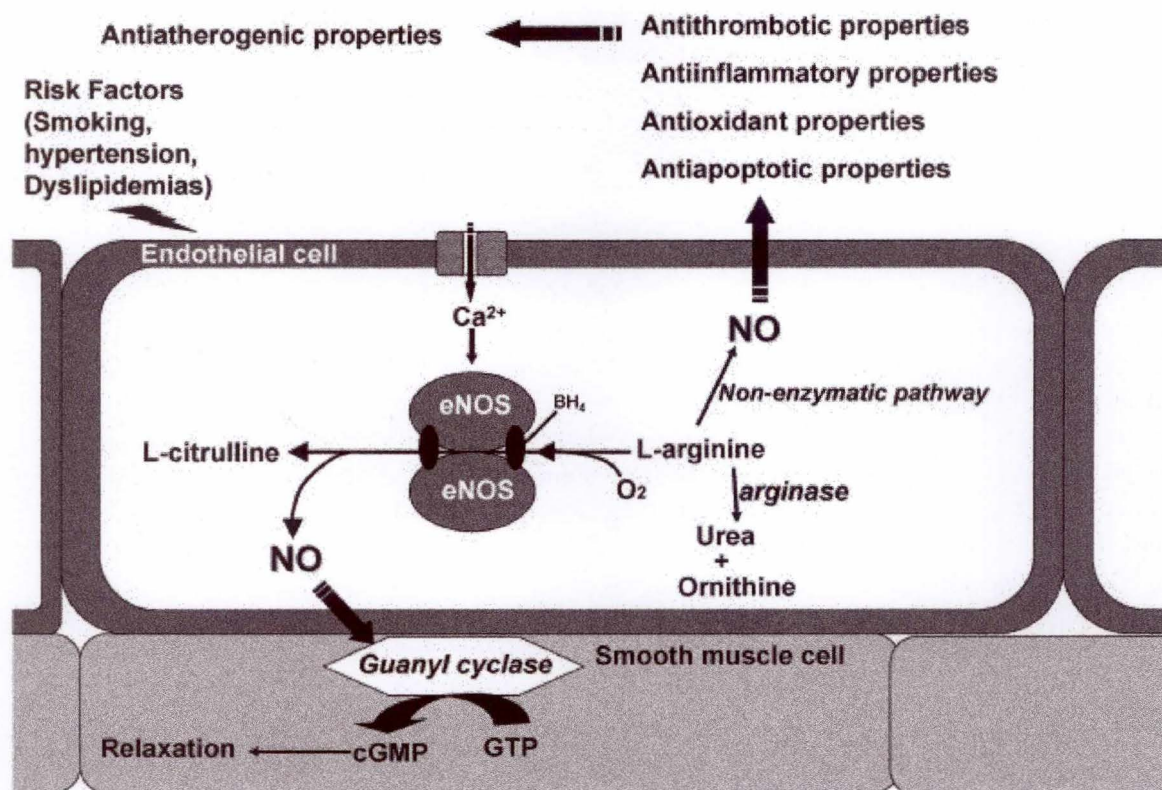


Figure I-20: Synthèse et rôle du NO[•] dans le réseau vasculaire. La voie de production de l'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine génère de la L-citrulline et de l'oxyde nitrique. Cette réaction, catalysée par les eNOS (NO synthases endothéliales) requiert des groupements nucléotidiques pyrimidines qui seront réduits, des groupements biotéridines et de la calmoduline. La L-citrulline est recyclée en L-arginine. Une deuxième voie de production du NO[•], non enzymatique, est hypothétiquement activée en cas de stress oxydatif (BH_4 : tetrahydrobioptérine) (Siasos, Tousoulis *et al.* 2007).

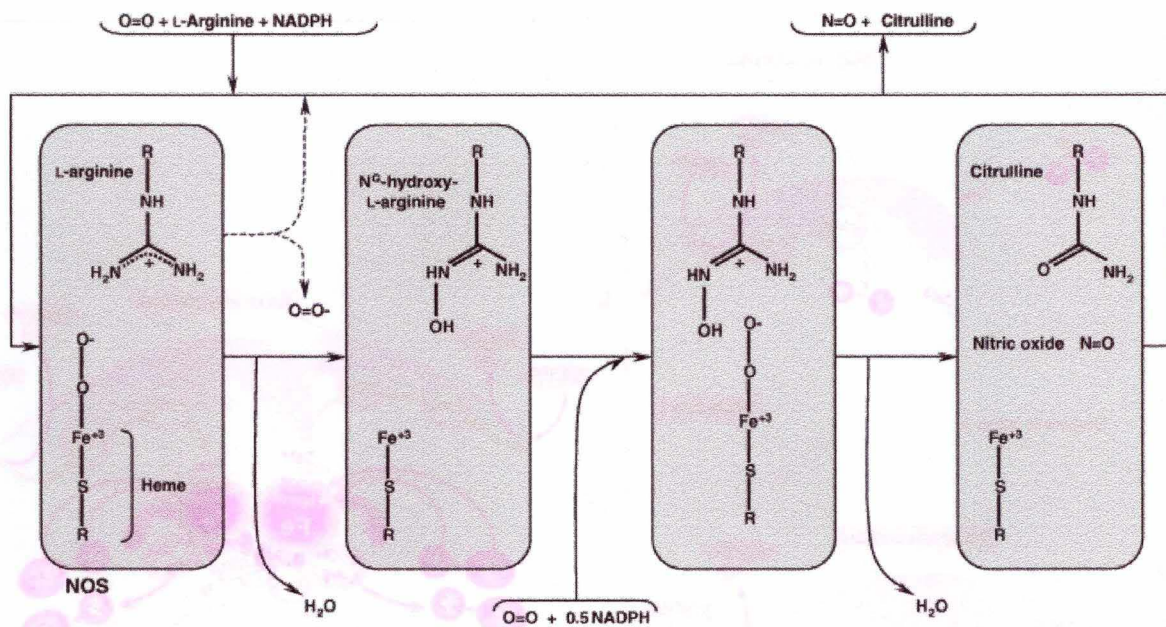


Figure I-21: Vue schématique des réactions chimiques s'opérant aux sites catalytique de la eNOS. Schéma de l'extrémité N-terminale de la eNOS, contenant des domaines oxygénases. Le schéma décrit de manière simplifiée les mécanismes réactionnels en présence de suffisamment (lignes pleines) ou de peu de substrat et/ou de cofacteurs cruciaux (lignes discontinues) (Mungrue, Bredt *et al.* 2003).

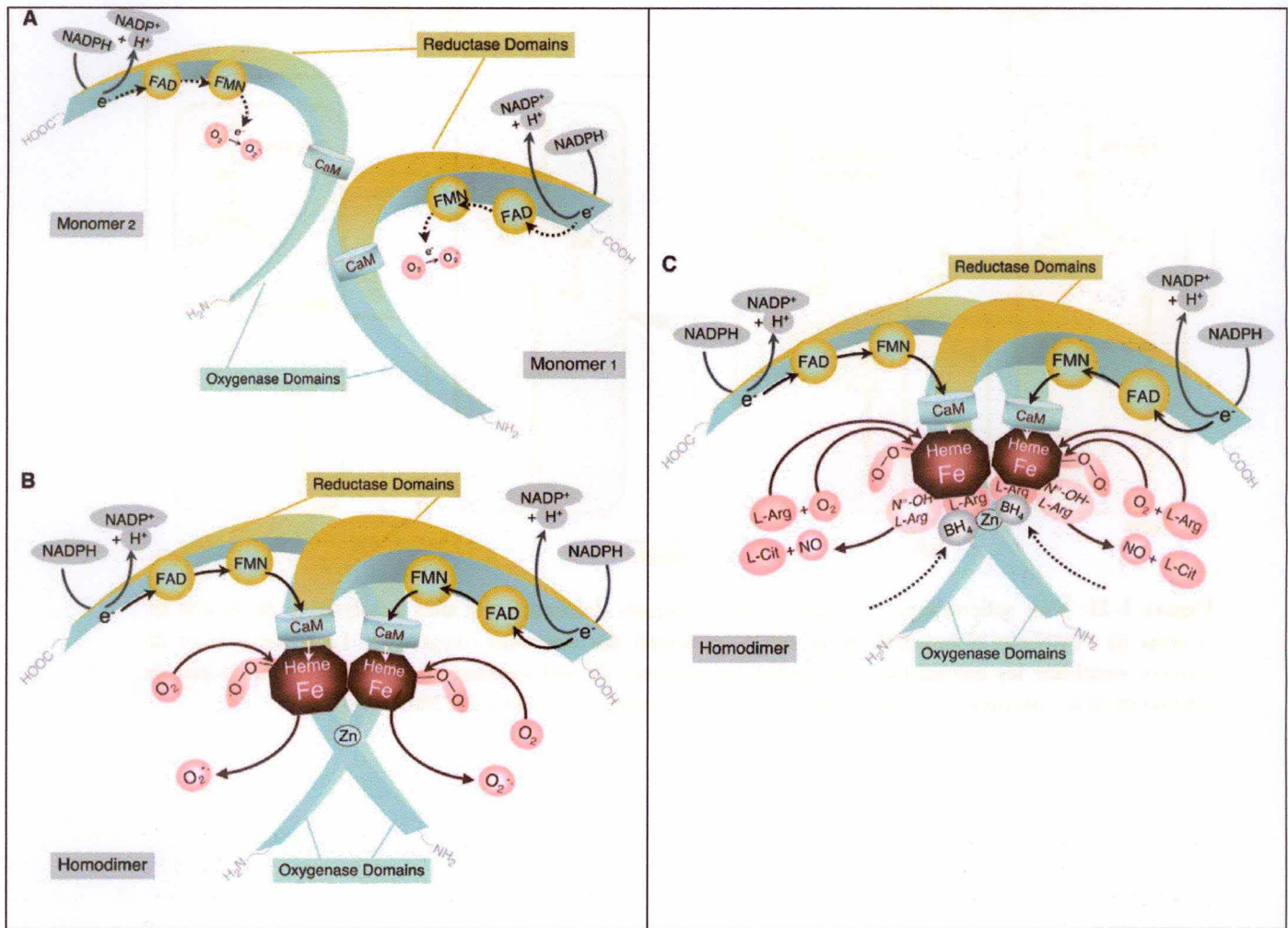


Figure I-22: Structure de la eNOS et mécanisme de synthèse du NO[•]. En figure A est représentée la structure basique de la eNOS et le mécanisme général de la catalyse par les NOS. Toutes les NOS sont synthétisées à l'état de monomères. Chaque monomère consiste en un domaine réductase et un domaine oxygénase. Les monomères, et même les domaines réductases isolés, sont capables de transférer des électrons du NADPH aux groupements flavine FAD et FMN. Les monomères ou les domaines réductases isolés peuvent lier la calmoduline (CaM), stimulant ainsi le transfert d'électrons à l'intérieur du domaine réductase. Cependant, les monomères seuls ne peuvent lier le cofacteur BH₄ (tetrabioptérine) ou le substrat (L-arginine) et donc synthétiser le NO[•]. Dans la figure B, nous pouvons voir qu'en présence de groupements hèmes, les NOS dimérisent. En réalité, les groupements hèmes sont les seuls cofacteurs absolument requis pour la formation d'un dimère actif de NOS. Ces groupements sont également nécessaires pour l'interaction entre les domaines réductase et oxygénase et pour le transfert d'électrons interdomaine entre les flavines et le groupement hème du deuxième monomère. En C: en présence de suffisamment de substrat L-arginine et du cofacteur BH₄, les dimères de NOS couplent leur groupements hémiques et la réduction de l'oxygène moléculaire pour former l'oxyde nitrique. La L-citrulline est un produit secondaire, et la N-hydroxy-L-arginine est un intermédiaire de réaction (Forstermann and Munzel 2006).

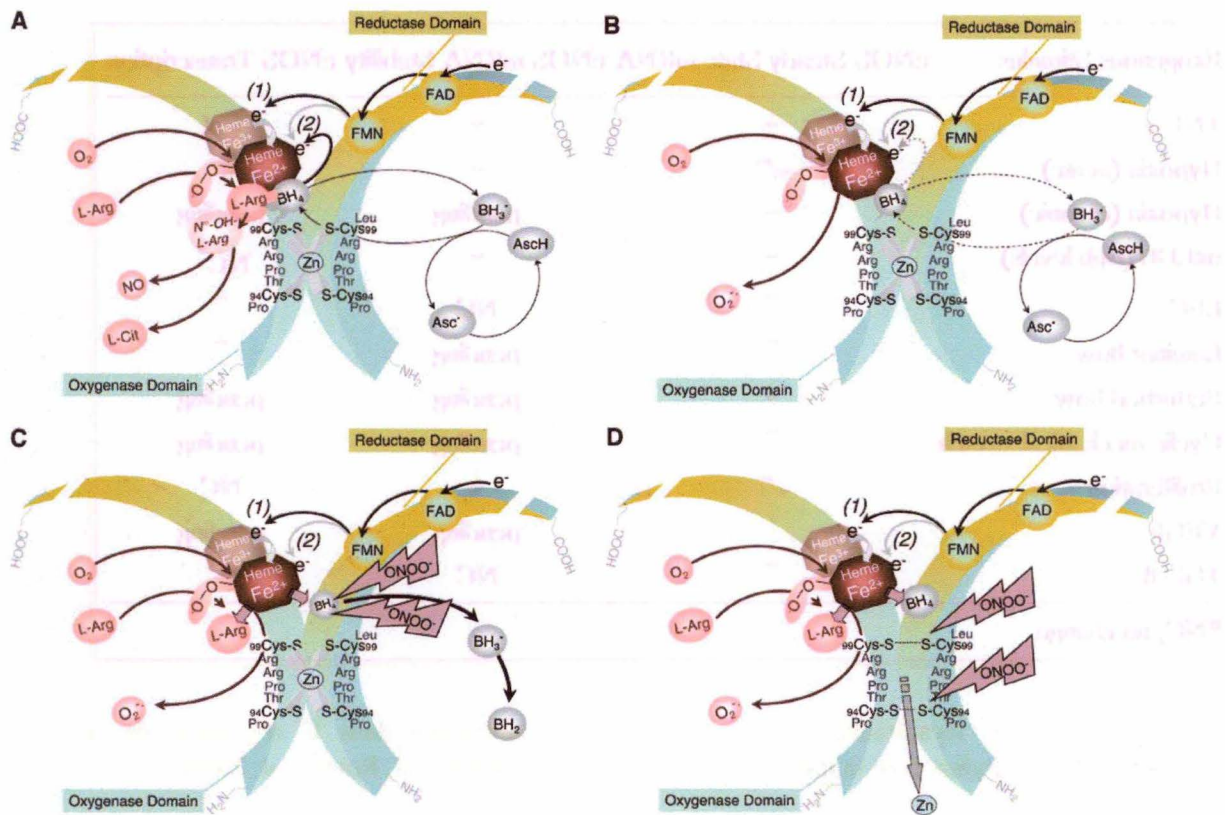


Figure I-23: dimérisation et fonctionnement de l'eNOS. En A, une vue plus précise de l'interface entre le dimère de eNOS. Tous les isoformes des NOS contiennent un cluster Zinc-Thiolate formé par un ion zinc coordonné dans une conformation tétraédrique avec deux motifs CXXXXC à l'interface des dimères. Ce site ne lie pas seulement le zinc, mais aussi le cofacteur BH₄ et la L-arginine. Dans les eNOS humaines, la cystéine 99 est essentielle pour la liaison du BH₄, et une mutation de cet acide aminé réduit la liaison du BH₄ de 90 % et diminue l'activité catalytique de 80 %. Le domaine réductase (1) permet le groupement hème ferrique (Fe³⁺) de la NOS de l'oxygène moléculaire et de former le Fe²⁺-dioxy. Cette dernière molécule peut recevoir un deuxième électron, du BH₄ ou du domaine réductase. Ceci active l'oxygène moléculaire et permet la catalyse de l'hydroxylation de la L-arginine. Des observations récentes suggèrent dans ce sens que le BH₄ agit comme un donneur d'un électron durant la réduction de l'oxygène moléculaire et l'activation de la eNOS, plutôt qu'un activateur allostérique. En B, une production significative d'O₂⁻ quand la concentration de L-arginine chute en dessous des niveaux requis pour saturer l'enzyme. Dans ces circonstances, la eNOS catalyse la réduction découplée de l'O₂, menant à la production d'anion superoxyde et/ou de peroxyde d'hydrogène. En C, le stress oxydatif est associé à un dysfonctionnement endothélial. En effet, une déplétion en BH₄ dans des artères de rats isolées ont montré in vivo un dysfonctionnement endothélial durant une certaine période. A contrario, le BH₄ est efficace dans la restauration de la fonction endothéliale. Mécanistiquement parlant, l'anion superoxyde formé peut se combiner avec le NO, menant à la formation de peroxynitrite. De plus, ce dernier est capable d'oxyder le BH₄ en BH₃⁺ (inactif) ou en 6,7-[8H]-H₂-bioptérine (BH₂), menant à un découplage de la NOS. En D, en plus de la déficience de BH₄, un autre mécanisme est décrit comme intervenant dans la production de peroxynitrite et au dysfonctionnement de la eNOS. L'oxydation du cluster Zinc-Thiolate mène à la perte de l'ion zinc et à la déstabilisation potentielle du dimère, menant alors à la formation d'anion superoxyde.

Exogenous Stimulus	eNOS Steady State mRNA	eNOS mRNA Stability	eNOS Transcription
TNF- α	↓	↓	↓ H
Hypoxia (acute)	↓/↑	↓	↓/↑
Hypoxia (chronic)	↓	pending	pending
oxLDL (high levels)	↓	↓	NC*
LPC	↑	NC	↑
Laminar flow	↑	pending	↑
Perturbed flow	↓	pending	pending
Cyclic mechanical stretch	↑	pending	pending
Proliferation	↓/↑	↓	NC
VEGF	↑	pending	pending
TGF- β	↑	NC	↑

*NC, no change

Tableau I-6: Tableau récapitulatif des acteurs exogènes intervenant dans la régulation de la transcription du gène codant pour la eNOS et la stabilité de son mRNA (Tai, Robb *et al.* 2004).

eNOS-dépendante (Bonaventura, Lunardi *et al.*, 2009). Le dysfonctionnement endothélial est lui lié à cette production d'anion superoxyde, capable de réagir avec le NO[•] pour former du peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Tai, Robb *et al.*, 2004; Forstermann et Munzel, 2006; Bonaventura, Lunardi *et al.*, 2009). Une supplémentation en BH₄ permet de contrecarrer le dysfonctionnement endothélial. Le cofacteur BH₄ est un des agents réducteurs naturels le plus puissant. Dans ce sens, il est possible de penser qu'une déplétion en BH₄ mène non seulement à un découplage de la eNOS, mais aussi à un processus oxydatif accéléré (Bonaventura, Lunardi *et al.*, 2009)

La régulation au niveau transcriptionnel de la synthèse de l'enzyme peut se faire par une batterie de facteurs exogènes, détaillés dans le Tableau I-6. Cette régulation au niveau transcriptionnel dépend notamment du type de « shear stress », puisque les flux laminaires favorisent l'expression de la eNOS, tandis que les flux perturbés la diminuent. Vu l'importance du « shear stress » dans le contexte de l'athérosclérose, nous terminerons cette introduction par un chapitre consacré aux forces hémodynamiques et au « shear stress » (Tai, Robb *et al.*, 2004).

1.8. Rôle du « shear stress » dans l'athérosclérose

Bien que la patho-biologie de l'athérosclérose dépende d'une multitude de facteurs, le « shear stress » induit par le flux sanguin est de plus en plus décrit comme étant une composante essentielle de la maladie encore trop souvent négligée (pour une revue, voir (Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Boon et Horrevoets, 2009; Hahn et Schwartz, 2009)). La force parallèle et frictionnelle induite sur la paroi vasculaire par le flux sanguin est mécano-transduite en signaux biochimiques résultant en modifications du comportement vasculaire. Le maintien d'un « shear stress » physiologique et laminaire, décrit comme athéro-protecteur, est crucial au fonctionnement normal du système vasculaire, ceci incluant la régulation du diamètre vasculaire ainsi que le maintien d'un contexte anti-inflammatoire et anti-thrombotique (Cunningham et Gotlieb, 2005; Dardik, Chen *et al.*, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Boon et Horrevoets, 2009; Hahn et Schwartz, 2009). A la différence des facteurs de risque bien décrits, exerçant des effets sur l'entière du réseau vasculaire, la géométrie locale du système vasculaire semble constituer un facteur de risque, puisque les lésions athérosclérotiques se forment à des endroits spécifiques. Les branchements artériels et les zones incurvées sont décrits comme des zones particulièrement propices au développement de la maladie. Ces zones sont soumises à un « shear stress » faible et/ou perturbé (Traub et Berk, 1998; Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). Impliqué à la fois dans le maintien de la physiologie normale de la paroi vasculaire et le développement de la maladie, le « shear stress » est abordé dans les points suivants pour mieux comprendre comment il peut, selon les conditions de flux, se montrer vaso-protecteur ou au contraire athérogène.

1.8.1. Définition du « shear stress » et des patterns de flux sanguins observés *in vivo*

Le « shear stress » endothélial (ESS pour Endothelial Shear Stress) est la force tangentielle dérivée de la friction du sang sur la surface endothéliale de la paroi vasculaire et est exprimée en unités de force par unité de surface (N/m² ou dynes/m²) (Slager, Wentzel *et al.*, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Katritsis, Kaiktsis *et al.*, 2007). L'ESS endothélial est proportionnel au produit de la viscosité du sang (μ) par le gradient spatial de la vitesse du sang au niveau de la paroi vasculaire ($ESS = \mu \times dv/dy$) (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007) (figure I-24). Les différents termes utilisés en hémodynamique artérielle sont décrits dans le Tableau I-7.

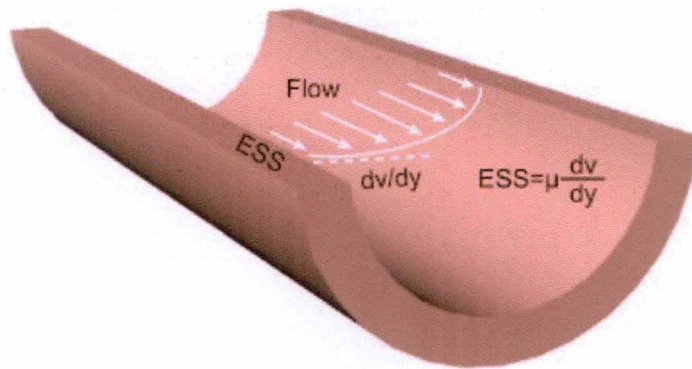


Figure I-24: définition mathématique du « shear stress » (Chatzizisis, Coskun *et al.* 2007).

Term	Definition
Endothelial shear stress (ESS)	The tangential force derived by the friction of the flowing blood on the endothelial surface. It is the product of the shear rate at the wall and the blood viscosity (μ).
Shear rate	The spatial gradient of blood velocity, which describes how fast the blood velocity increases from areas at the arterial wall toward areas at the center of the lumen (i.e., dv/dy , where dv is change in flow velocity unit and dy is change in unit of radial distance from the wall). Physiologically, the shear rate decreases at the center of the lumen and gradually increases toward the wall.
Blood viscosity	A principal property of blood related to its internal friction that causes blood to resist flow. Hematocrit is the major determinant of blood viscosity.
Newtonian blood behavior	Constant blood viscosity independent of shear rate. In large-sized arteries (e.g., aorta) blood behaves largely in a Newtonian fashion.
Non-Newtonian blood behavior	Non-constant blood viscosity inversely related to shear rate. Blood has non-Newtonian properties, especially in veins, small-sized arteries, and in the microcirculation.
Laminar flow	Smooth, streamlined blood flow where viscous forces prevail against inertial forces.
Undisturbed laminar blood flow	Smooth streamlined flow characterized by concentric layers of blood moving in parallel along the course of the artery. The highest velocity is found at the centre of the lumen, whereas the lowest velocity occurs along the wall. Uniform laminar blood flow primarily occurs in relatively straight arterial segments.
Disturbed laminar flow	Disturbed laminar flow characterized by reversed flow (i.e., flow separation, recirculation, and reattachment to

	forward flow). Disturbed laminar blood flow occurs in arterial segments with geometric irregularities (e.g., curvatures, branches, bifurcations), or upstream and downstream of stenoses.
Turbulent blood flow	Flow in which the blood velocity at any given point varies continuously over time, even though the overall flow is steady. In turbulent flow the inertial forces are more significant than viscous forces. Turbulent blood flow rarely occurs but has been described in human aorta at peak systole, during heavy exercise in much of the central arterial system, distal to severe stenoses (>75%), and in aneurysms.
Reynolds number (Re)	The ratio of blood inertial forces to viscous forces. For a given geometry, whether the flow will be laminar or turbulent is determined by its Reynolds number. For low Re values blood flow is laminar, whereas for high Re values (typically, above 2,000) blood flow is turbulent.
Steady blood flow	Blood flow in which velocity does not vary with time. This type of flow does not occur in vivo; however, it has been largely used in computational fluid dynamic studies.
Pulsatile (unsteady) blood flow	Blood flow with periodically changing velocity during the cardiac cycle.
Steady ESS	ESS that does not vary with time (i.e., constant direction and magnitude).
Pulsatile ESS	Unidirectional ESS with a magnitude varying, typically, within a range of 15 to 70 dyne/cm ² over the cardiac cycle, yielding a positive time-average.
Low ESS	Unidirectional ESS with a periodically varying magnitude over the cardiac cycle, yielding a significantly low time-average (<10 to 12 dyne/cm ²).
Oscillatory ESS	Bidirectional ESS with a periodically varying magnitude over the cardiac cycle, yielding a very low time-average, usually close to 0.
ESS spatial gradient	ESS variations over short distances. High ESS spatial gradients occur primarily in geometrically irregular arterial regions.

Tableau I-7: terminologie utilisée en hémodynamique (Chatzizisis, Coskun *et al.* 2007)

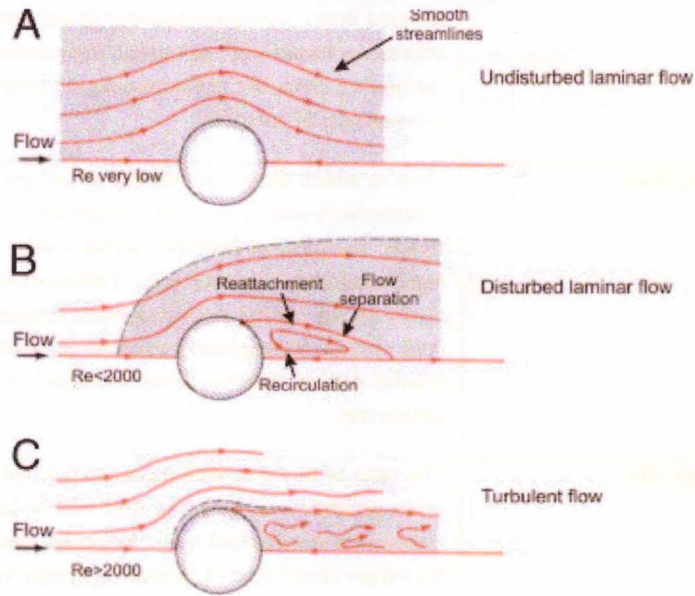


Figure I-25: Les différentes natures de flux observées lors d'une modification de la configuration géométrique (Chatzizisis, Coskun *et al.* 2007).

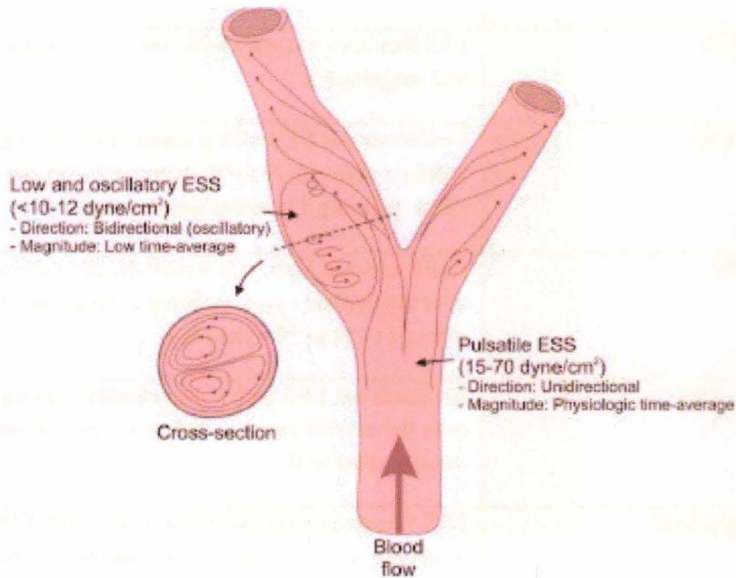


Figure I-26 : Répartition du flux oscillatoire et pulsatile en cas de branchement artériel (Chatzizisis, Coskun *et al.* 2007)

Le flux sanguin peut être laminaire ou turbulent, ceci en fonction de la géométrie du vaisseau et de la vélocité du flux, comme décrit par les lois de la dynamique des fluides. Un flux dit laminaire se réfère à un flux décomposable en lignes de flux alignées parallèlement (figure I-25A), alors qu'un flux turbulent – ou perturbé –, est caractérisé par des zones montrant un flux inverse (figure I-25B). Pour une géométrie donnée, le nombre de Reynolds (Re) détermine la nature laminaire ou turbulente du flux: un nombre de Reynolds faible est associé un flux laminaire tandis qu'un nombre de Reynolds élevé (typiquement plus de 2000) correspond à un flux turbulent (Slager, Wentzel *et al.*, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Katritsis, Kiktsis *et al.*, 2007) (figure I-25C). Il a été également décrit que la nature pulsatile (non continue) du flux sanguin artériel combinée à la géométrie du système vasculaire détermine les patterns d'ESS (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007).

Dans les segments artériels droits, l'ESS est pulsatile et unidirectionnel, variant en amplitude entre 15 et 70 dynes/cm², alors que les régions plus irrégulières géométriquement génèrent des ESS faibles et/ou oscillatoires (figure I-26). Un ESS faible est un ESS unidirectionnel mais dont les fluctuations d'amplitude au cours du temps génèrent une moyenne d'approximativement 10 à 12 dynes/cm² (figure I-26) (Malek, Alper *et al.*, 1999; Gimbrone, Topper *et al.*, 2000; Stone, Coskun *et al.*, 2003; Stone, Coskun *et al.*, 2003; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). L'aspect géométrique est également à prendre en compte lors du rétrécissement du diamètre des artères dans le cas de la pathologie, en aval de lésions obstructives et à proximité de bifurcations, ces endroits étant soumis à un ESS faible ou oscillatoire (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007) (figure I-26). Les ESS faibles ou oscillatoires sont bien décrits comme étant athérogènes (Chen, Varner *et al.*, 2003; Cunningham et Gotlieb, 2005; Dardik, Chen *et al.*, 2005; Cheng, Tempel *et al.*, 2006; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Cai et Schaper, 2008; Boon et Horrevoets, 2009; Hahn et Schwartz, 2009). La question de la transmission de la force s'exerçant sur la paroi vasculaire, et plus précisément sur les cellules endothéliales, pour mener à des réponses complexes comme celles impliquées dans l'athérogenèse se pose alors.

1.8.2. Mécano-réception du « shear stress », récepteurs, acteurs potentiels et transduction du signal

Les vaisseaux sanguins sont continuellement exposés aux forces hémodynamiques générant des dilatations cycliques des artères et du « shear stress » à la surface de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales sont capables de percevoir le « shear stress » via une série de récepteurs exprimés en membranes apicale (luminale), latérale et basale (Traub et Berk, 1998; Lehoux, Castier *et al.*, 2006; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009). Après activation de ces mécano-récepteurs, des voies de signalisations intracellulaires sont déclenchées. Ce processus, connu sous le terme de « mécano-transduction » (Davies, Barbee *et al.*, 1997; Traub et Berk, 1998; Tzima, del Pozo *et al.*, 2001; Shyy et Chien, 2002; Tzima, Irani-Tehrani *et al.*, 2005; Cheng, Tempel *et al.*, 2006; Lehoux, Castier *et al.*, 2006; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009) est capable d'affecter des fonctions comme la prolifération, la migration, la perméabilité cellulaire, ainsi que remodelage tissulaire et l'apoptose, tout comme l'expression génique (Traub et Berk, 1998) (figure I-27). Ces voies de signalisation sont affectées de manière simultanée et sont imbriquées les unes dans les autres. La plupart d'entre elles convergent vers l'activation de la cascade des MAPKs à plusieurs niveaux et ce via l'activation de Ras, ERK et JNK (Cunningham et Gotlieb, 2005), suggérant le rôle crucial de ces dernières dans la mécano-transduction du ESS (Traub et Berk, 1998; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009). Les voies de signalisation mènent également à la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription, liant les SSRE (ou Shear Stress Responsive Elements), modulant positivement ou négativement la réponse au

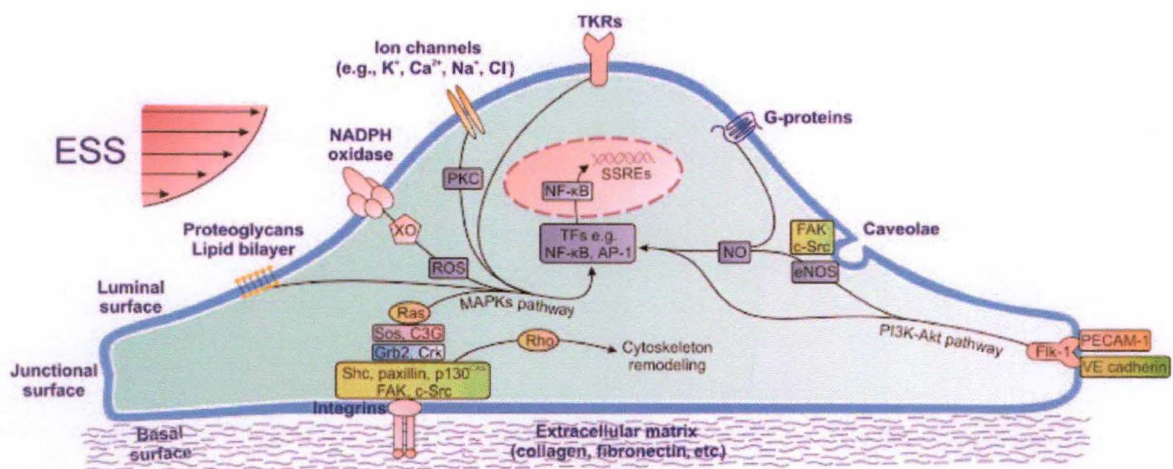


Figure I-27: Mécano-transduction associée à la perception du signal “shear stress” à la surface des cellules endothéliales. Les ESS locaux sont perçus par des mécano-récepteurs au niveau de la membrane luminaire des cellules endothéliales, tels que des canaux ioniques (K⁺, Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻), des récepteurs couplés à des protéines G, les cavéoles, des récepteurs à tyrosine Kinase, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (XO), ou même la bicouche lipidique et l’héparan sulfate. Le signal ESS est transmis via certaines intégrines ou le complexe PECAM-1/Fli1 et active les kinases en aval. Les intégrines phosphorylent et activent une série de complexes de tyrosines kinases (FAK, s-Src, Shc, Paxilline ...), des protéines adaptatrices (Grb2, Crk), des GEF (guanine nucleotide exchange factors) comme Sos ou C3G. Ainsi, la famille des GTPases Ras est activée, elle-même considérée comme un élément crucial de la mécano-transduction, activant enfin les MAPK. A côté de cette voie médiée par l’activation des intégrines, les ESS peuvent également activer des mécano-récepteurs luminaux ou jonctionaux. De ces récepteurs découlent la production de ROS par la NADPH oxydase et la XO, l’activation de la PKC ou des Rho GTPases (impliquées dans le remodellement du cytosquelette), la libération d’oxyde nitrique (NO) par les eNOS, ou encore l’activation de la voie PI3K/Akt. Toutes ces voies convergent vers l’activation de NFκB ou d’AP-1. Ces facteurs de transcription se lient à des SSREs (shear stress responsive elements) positifs ou négatifs, dans les promoteurs des gènes impliqués dans la réponse aux ESS (Chatzizisis, Coskun *et al.* 2007).

« shear stress » au niveau de gènes mécano-sensibles et, à terme, jouant sur la fonction et la morphologie cellulaire (Tzima, del Pozo *et al.*, 2001; Tzima, Irani-Tehrani *et al.*, 2005; Lehoux, Castier *et al.*, 2006; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009). De cette manière, un flux continu et laminaire induira l'expression de gènes athéro-protecteurs et préviendra l'expression de gènes pro-athérogènes, au contraire d'un faible ESS (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007).

Beaucoup de mécano-transducteurs putatifs ont été proposés, comme des canaux ioniques, certaines intégrines, des récepteurs à tyrosine kinase, le glycocalyx apical, les cils primaires, des récepteurs couplés à des protéines G, le « platelet-endothelial-cell adhesion molecule 1 » (PECAM-1) et la VE-cadhérine (« Vascular Endothelium Cadherin ») (Shyy et Chien, 2002; Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009). Le cytosquelette semble également jouer un rôle très important dans la réponse des cellules endothéliales au « shear stress » en offrant un « échafaudage » pour la formation ou la translocation de diverses molécules et en établissant un lien physique entre la membrane luminaire où le « shear stress » est imposé et la membrane basale (Hahn et Schwartz, 2009). Cette idée de transmission du signal vers les structures latérales de la cellule est appuyée par la présence de complexes protéiques au niveau des jonctions cellules-cellules composés de PECAM-1, la VE-cadhérine et le récepteur tyrosine kinase au VEGF connu sous l'acronyme de Flk-1. Ces complexes protéiques sont connus pour médier diverses réponses au flux (Tzima, Irani-Tehrani *et al.*, 2005; Lehoux, Castier *et al.*, 2006; Hahn et Schwartz, 2009). PECAM-1 est une protéine d'adhérence à domaine immunoglobuline, transmembranaire, participant à des interactions homophiles au niveau des jonctions intercellulaires et est également connue pour activer des kinases de la famille Src en réponse au « shear stress » (Hahn et Schwartz, 2009). La VE-cadhérine, cadhérine spécifique aux cellules endothéliales, est requise pour la mécano-transduction, mais ne nécessite pas de liaison aux autres cadhérines. Fonctionnant à la manière d'un adaptateur pour Flk-1, la VE-cadhérine s'associe à Flk-1 et le rapproche de PECAM-1, facilitant ainsi l'activation de Flk-1 par les kinases Src actives (Hahn et Schwartz, 2009). L'activation de Flk-1 mène à l'activation de la voie PI3K-Akt, connue elle-même pour activer la production de NO[•] via les NO synthases, menant ainsi à une relaxation du vaisseau sanguin (Hahn et Schwartz, 2009). L'activation de la voie PI3K mène également à une activation conformationnelle d'intégrines sur la face basale des cellules endothéliales. Cet événement déclenche l'activation des petites protéines G Rac, Rho et Cdc42, connues pour intervenir dans le réarrangement cellulaire le long des lignes de flux en agissant sur le cytosquelette (Hahn et Schwartz, 2009). Les intégrines sont également connues pour converger vers la voie des MAPK via l'activation de la « Focal Adhesion Kinase » (FAK) et Shc (Lan, Mercurius *et al.*, 1994). Enfin, l'activation de Rac par les intégrines peut aussi mener à une activation de NFκB, connu pour intervenir dans la pathologie (Cunningham et Gotlieb, 2005; Hahn et Schwartz, 2009). La contribution exacte du glycocalyx apical dans la réponse au « shear stress » est encore incertaine, mais il apparaît que ce dernier, épais de plusieurs centaines de microns à la surface des cellules endothéliales (Shyy et Chien, 2002; Cunningham et Gotlieb, 2005) servirait plutôt d'intermédiaire transmettant le signal « shear stress » à la membrane plasmique. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des héparinases ou des chondroitinases (capables de digérer les protéoglycans composant le glycocalyx) peuvent inhiber la réponse des cellules endothéliales au « shear stress ». D'autres intervenants dans la mécano-transduction ont été étudiés et identifiés, comme la dystrophine, les cavéoles et les « gap junctions » (Shyy et Chien, 2002; Cunningham et Gotlieb, 2005)

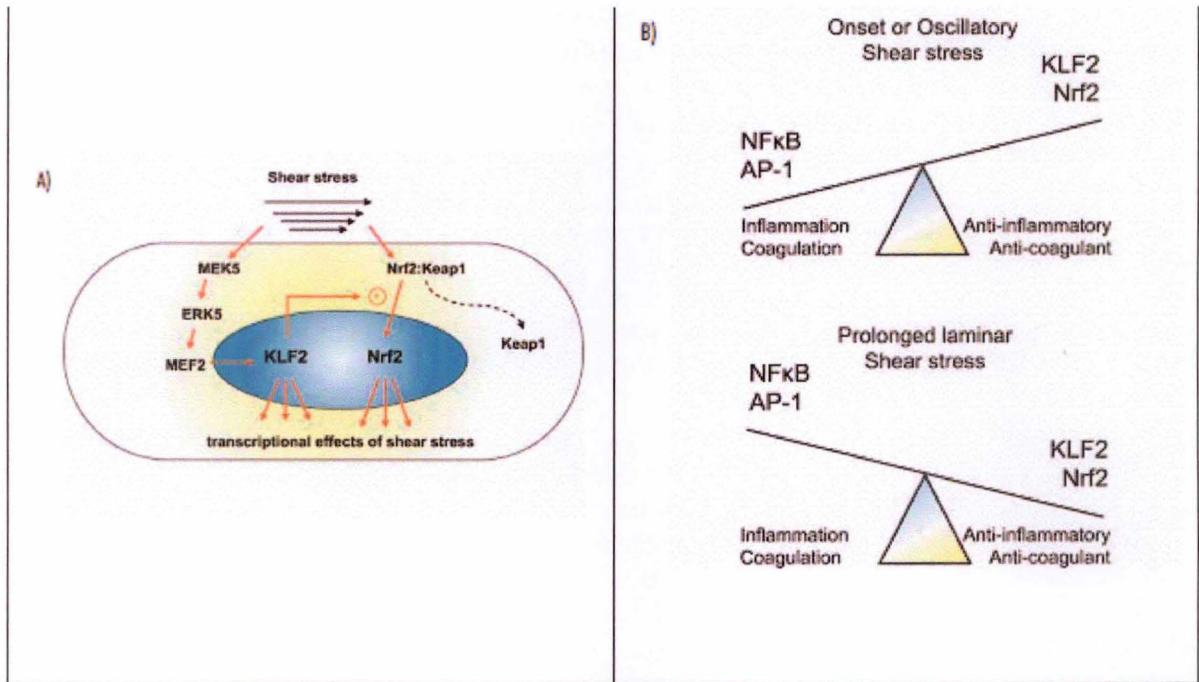


Figure I-28: KLF2 et Nrf2 sont impliqués dans la réponse au « shear stress » : balance entre état pro-inflammatoire, pro-coagulant et état anti-inflammatoire, anti-coagulant (Boon and Horrevoets 2009).

1.8.3. Régulateurs transcriptionnels clefs de l'effet vasoprotecteur du « shear stress »

Il est essentiel de distinguer dans un cadre expérimental une courte exposition au « shear stress » (moins de 24 h) et une exposition à plus long terme (plus de 24 h). En effet, une exposition des cellules endothéliales à un « shear stress » de courte durée a permis, *in vitro*, de dévoiler le complexe VE-cadhérine/PECAM-1 (Davies, Barbee *et al.*, 1997) au niveau des jonctions cellulaires, complexe capable de détecter des changements aigus d'amplitude de « shear stress ». Les modifications transcriptionnelles causées par ces derniers sont principalement médiées par « l'Activator Protein-1 » (AP-1) et NFκB (Dekker, van Soest *et al.*, 2002). Ainsi, les changements aigus de « shear stress » induisent généralement une réponse pro-inflammatoire et pro-coagulante, ceci étant à l'opposé des effets vasoprotecteurs décrits pour le « shear stress » *in vivo*. En effet, il existe des séquences de liaison de NFκB dans les promoteurs des gènes connus pour être exprimés dans des cellules endothéliales en condition pro-inflammatoire, comme le « Facteur Tissulaire » (TF), MCP-1, la E-sélectine ou encore ICAM-1. Au contraire d'une exposition de courte durée au « shear stress », une exposition de plus de 24 heures promeut les propriétés anti-inflammatoires et anti-coagulantes (Hahn et Schwartz, 2009) : la eNOS et la thrombomoduline (TM) sont en grande partie impliquées dans le maintien de ces propriétés dans un endothélium sain. Deux facteurs de transcription clefs sont connus pour jouer un rôle antagoniste à l'action de NFκB et AP-1, à savoir Nrf2 et KLF2 (pour « Krüppel-Like Factor 2 », identifié pour la première fois par une approche génomique sur des aortes porcines saines et connu pour être activé par un flux laminaire (van Thienen, Fledderus *et al.*, 2006)). Il a été également montré plus récemment que KLF2 favorise la localisation nucléaire de Nrf2, et que l'action combinée de ces deux facteurs de transcription est responsable d'une majorité des changements d'expression génique causée par le « shear stress » (Boon et Horrevoets, 2009; Hahn et Schwartz, 2009) (figure I-28).

Le « shear stress » exerce une action directe sur Nrf2 : en effet, sa translocation nucléaire est favorisée par une exposition des cellules endothéliales à un flux laminaire (Qiu et Tarbell, 2000). De plus, la même étude a montré qu'une inhibition de la PI3K comme de la PKC, et l'utilisation d'un antioxydant prévenait cette translocation nucléaire suite à la stimulation par un flux laminaire. Alors que l'activation de Nrf2 s'opère de deux manières différentes, via des stress oxydatifs ou par la phosphorylation par des kinases en amont, KLF2 voit son abondance augmenter entre autres suite à une stabilisation de son ARN messager (van Thienen, Fledderus *et al.*, 2006). Le promoteur du gène *klf2* possède un site de liaison conservé pour le facteur de transcription Mef2, suggérant que celui-ci est impliqué dans l'expression de KLF2. Mef2 est lui-même activé par la voie des MAPK, précédemment décrite pour se trouver à la convergence de la mécano-transduction du signal liée au « shear stress » (Hahn et Schwartz, 2009). La thrombomoduline et la eNOS sont elles-mêmes des cibles directes de KLF2 (Fledderus, van Thienen *et al.*, 2007; Fledderus, Boon *et al.*, 2008), et une surexpression de *KLF2* permet également de réduire indirectement l'expression du « Plasminogen Activator inhibitor-1 » (PAI-1). De plus, cette même surexpression est aussi capable d'inhiber l'induction du facteur tissulaire médiée par les cytokines (Fledderus, van Thienen *et al.*, 2007; Fledderus, Boon *et al.*, 2008; Hahn et Schwartz, 2009). Les propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques de KLF2 ne sont pas seulement à imputer à ses actions sur la eNOS, la TM, le TF et le PAI-1, mais aussi par une action indirecte d'inhibition de NFκB: KLF2 est capable de recruter CBP/p300, mobilisant le pool des co-activateurs aux dépens de l'activation de NFκB. Un autre mécanisme important par lequel KLF2 exercerait son activité anti-inflammatoire est par interférence avec la voie des MAPK et en inhibant la localisation nucléaire d'ATF2. Une diminution de l'abondance du taux de messager de certains gènes pro-inflammatoires, comme VCAM-1 et CCL2 ont été observés lors d'une incubation de cellules

endothéliales à un « shear stress », ceci permettant de supposer qu'il existe un effet de KLF2 sur l'activité d'ATF2 (Fledderus, van Thienen *et al.*, 2007; Fledderus, Boon *et al.*, 2008; Hahn et Schwartz, 2009).

1.8.4. Implication d'un faible « shear stress » endothélial à différents niveaux moléculaires de la pathologie

Alors que l'effet vasoprotecteur d'un « shear stress » prolongé et laminaire vient d'être décrit comme dépendant en grande partie de l'action combinée de KLF2 et Nrf2, un « shear stress » non-laminaire ou faible exerce toute une série d'effets directs favorisant le développement de la pathologie. Un faible ESS abolit la protection par le NO[•] en diminuant la transcription du gène codant pour la eNOS et l'expression de cette protéine (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). De plus, un faible ESS est également capable de réguler négativement la production de prostacycline, connue pour ses fonctions vasodilatatrices ainsi que d'augmenter la production d'endothéline-1, mitogène des VSMCs et favorisant donc à terme l'évolution de la pathologie (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Fledderus, van Thienen *et al.*, 2007; Fledderus, Boon *et al.*, 2008). Les faibles ESS ont également un effet sur le métabolisme du cholestérol, puisque qu'ils sont capables de promouvoir l'internalisation des LDL et leur synthèse en favorisant l'activation des SREBPs (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). La perméabilité de l'endothélium à cette lipoprotéine est également favorisée : les « gaps » apparaissant entre les cellules combinés avec le faible flux constitueraient un facteur pro-athéromateux non négligeable (Chien, 2003; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). L'activation des SREBPs semble également avoir un rôle dans l'activation transcriptionnelle de l'IL-8, ainsi que le taux de cholestérol intracellulaire (Yeh, Cole *et al.*, 2004). Les faibles ESS semblent également faciliter l'oxydation des LDL infiltrant l'intima, puisqu'ils favorisent l'expression membranaire de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase, enzymes majoritairement impliquées dans la production de ROS et diminuent la production de « scavengers » intracellulaires de ROS tels que la SOD au manganèse ou le glutathione (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). Le rôle des faibles ESS dans l'inflammation est lié à l'activation de NFκB et de manière subséquente à l'activation de la transcription de gènes codant des protéines telles que le MCP-1, les E-sélectines, ICAM-1, VCAM-1, le TNFα, l'IFN-γ, ou encore l'IL-1β, toutes impliquées dans la réponse inflammatoire (Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009). Ces cytokines pro-inflammatoires ou molécules d'adhérence, participent de manière active à l'initiation et à l'entretien du processus inflammatoire, qui, avec le stress oxydatif et l'infiltration des LDL facilitée, promeut la progression de la maladie. Les faibles ESS sont également connus pour avoir des actions plus directes sur la morphologie de la plaque athéromateuse : en effet, ils sont capables de promouvoir la migration, la différenciation et la prolifération des VSMCs via la production du PDGF (« Platelet Derived Growth Factor ») (Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009) et du VEGF (Qiu et Tarbell, 2000; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). La dégradation de la matrice extracellulaire dans la paroi vasculaire et au niveau de la chape fibreuse est favorisée par l'augmentation de l'expression de metalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9) et la diminution du « turn over » matriciel via notamment l'action de l'IFN-γ sur les VSMCs, diminuant leur synthèse de collagène (Cunningham et Gotlieb, 2005; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007; Hahn et Schwartz, 2009). Le VEGF mentionné plus haut a également une action directe sur la néo-vascularisation de la plaque athéromateuse. Les faibles ESS exercent également des rôles bien décrits dans la calcification de la plaque athéromateuse ou l'augmentation de leur thrombogénicité (Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007).

1.9. Objectifs du mémoire

L'équipe « ATHERO » en URBC s'intéresse entre autres à l'étude comparative des LDL oxydées au cuivre, les OX (ou OX-LDL), et aux LDL oxydées à la myéloperoxydase, les MOX (ou MOX-LDL), probablement plus pertinentes d'un point de vue patho-physiologique. En effet, le modèle d'oxydation au cuivre est un modèle souvent utilisé dans la littérature dans le cadre de travaux étudiant la réponse de différents types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose aux LDL oxydées. Cependant, nous savons que le processus d'oxydation des LDL *in vivo* se déroule beaucoup plus probablement via des acteurs comme la myéloperoxydase, enzyme contenue dans les granules des neutrophiles. Dans le cadre de sa thèse, Damien Calay étudie les effets des LDL modifiées sur des macrophages murins (cellules RAW 264.7), étant donné l'implication des cellules spumeuses, macrophages bourrés de lipides suite à l'internalisation non régulée de ces LDL modifiées, dans l'initiation et l'évolution de l'athérosclérose. Damien Calay a montré que les LDL modifiées induisaient un stress oxydatif et une réponse défensive Nrf2-dépendante, la réponse étant plus marquée avec les MOX. Dans la paroi vasculaire, un autre type cellulaire joue un rôle clef, les cellules endothéliales, auxquelles nous nous sommes intéressés dans ce mémoire. Dans ce but nous avons utilisé le modèle des cellules endothéliales humaines EAhy926.

Dans la première partie du travail, nous avons utilisé des cellules endothéliales EAhy926 en conditions statiques et nous les avons stimulées directement avec les LDL natives ou modifiées, en étant attentif aux effets différentiels des OX et MOX. Nous avons caractérisé la réponse des cellules EAhy926 aux LDL modifiées au cuivre et à la myéloperoxydase et nous nous sommes focalisés sur la voie dépendante du facteur de transcription Nrf2, connu pour être activé en cas de stress oxydatif.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons poursuivi l'étude comparative des effets des OX et MOX, mais sur un modèle de cellules endothéliales en conditions dynamiques, soumises à un flux. En effet, le « shear stress », ou forces de cisaillement que l'endothélium encoure par la dynamique de la circulation sanguine, est une composante de plus en plus décrite comme étant à la fois pro- et anti-athérogène. Nous avons d'abord mis au point un modèle en flux, en reproduisant un flux physiologique dans un circuit fermé et stérile afin de stimuler les cellules EAhy926. Nous avons ensuite dans un deuxième temps évalué la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation de 24 heures à un flux physiologique, en nous focalisant encore sur les voies dépendantes des facteurs de transcription Nrf2 et KLF2 et en suivant l'expression d'une batterie de gènes pertinents dans le contexte de ce travail. Enfin, dans un troisième temps, nous avons étudié les effets d'un flux physiologique combiné avec des LDL natives et modifiées sur les cellules EAhy926, ceci nous rapprochant encore plus de la situation *in vivo*, puisque nous savons que des LDL oxydées sont présentes dans la circulation sanguine.

L'objectif général du mémoire est donc de comparer les effets d'OX et MOX sur des cellules endothéliales soumises ou non à un flux. Nous pourrions ainsi comparer la réponse des cellules endothéliales par rapport à celle des macrophages et voir dans quelle mesure la présence de LDL modifiées ou non, peut moduler la réponse des cellules endothéliales aux forces de cisaillement.

2. Matériels et Méthodes

Tableau II-1 : Matériel et réactifs utilisés pour l'isolation des lipoprotéines de faible densité

Colonnes à dessaler	Colonnes de désalage PD-10 (GE Healthcare)
Milieu d'équilibration final des LDL	Milieu RPMI (Lonza BioWhittaker RPMI 1640) sans glutamine
Milieu d'équilibration de la solution servant à générer les OX-LDL	PBS sans EDTA (Lonza, SWZ)
Milieu d'équilibration de la solution servant à générer les MOX-LDL	PBSox (complémenté en EDTA (1 g/l), fourni par le Centre Hospitalier Universitaire de Charleroi)
Matériel supplémentaire	Tubes de 50 ml (Corning, USA)
	Filtres 0.22 μ m Filtropur S membrane (Sarstedt, GER)

Tableau II-2 : Réactifs utilisés pour l'oxydation des LDL au cuivre

Réactif oxydant	Solution de CuSO_4 1mM
	Solution de PBSox
Solution Stop	BHT (2,6 Ditertbutyl 4-méthyl phénol, Sigma, UK).

Tableau II-3 : Réactifs utilisés pour le dosage des LDL par la méthode de Folin-Ciocalteu

Solution réactive A	NaOH 0,1 M, Na_2CO_3 2 % (4 g NaOH (Merck, GER) et 20 g Na_2CO_3 (Merck, GER) pour 1 litre d'eau milli-Q
Solution réactive B	50 ml de réactif A complémenté avec 500 μ l de solution de tartrate de sodium 2 % et 500 μ l de solution de CuSO_4 (UBC, BEL) 1 %
Matériel supplémentaire	Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck, GER)) dilué 2X dans le NaCl 0,9 % Solution NaCl 0,9 % (Merck, GER) Solution de tartrate de sodium 2 % Solution de CuSO_4 1 % (UBC, BEL) Ovalbumine 1 mg / ml Tubes spectro (Kartels, ITA)

2. Matériels et méthodes

2.1. Lipoprotéines (LDL)

2.1.1. Isolation

Les lipoprotéines de faible densité, ou LDL, sont régulièrement fournies par le Centre Hospitalier Universitaire de Charleroi (Vésale). Isolées à partir de plasma sanguin humain poolées, ces LDL sont extraites grâce à des ultracentrifugations séquentielles et sont ensuite stockées sous hélium à 4°C dans l'obscurité (Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006). Les LDL doivent subir un dessalage avant d'être équilibrées dans du milieu de culture et, pour les OX et MOX, avant de subir respectivement une modification chimique et enzymatique. Ces LDL modifiées ou non seront utilisées pour stimuler les cellules EAhy926.

2.1.1.1. Matériel et réactifs (tableau II-1)

2.1.1.2. Méthode

Les colonnes PD-10 sont respectivement équilibrées pour les LDL natives, les OX et les MOX avec 25 ml de RPMI sans glutamine, 25 ml de PBS sans EDTA et 25 ml de PBSox. Un volume de 2,5 ml de LDL est déposé en haut de chaque colonne ; les colonnes sont ensuite lavées avec 3,5 ml de RPMI pour les LDL natives, 3,5 ml de PBS pour la solution servant à préparer les OX ou 3,5 ml de PBSox pour la solution servant à préparer les MOX. Après modification des LDL, les solutions finales d'OX et MOX sont éluées à la manière des LDL natives par du RPMI. Les solutions de LDL sont ensuite rendues stériles par filtration (0,22 μm) et stockées à 4°C et dans l'obscurité. Les solutions de LDL seront dosées par la méthode de Folin-Ciocalteu.

2.1.2. Modification des LDL par le sulfate de cuivre

2.1.2.1. Réactifs (tableau II-2)

2.1.2.2. Méthode

Les LDL équilibrées dans du PBS sont incubées dans l'obscurité pendant 24 h à 37°C en présence de CuSO_4 10 mM. Après 24 h d'oxydation, la réaction est arrêtée par ajout de BHT 25 mM et par mise sur glace pendant 1 heure. La solution de OX est finalement équilibrée dans du RPMI avant d'être dosée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

2.1.3. Modification des LDL par oxydation à la myéloperoxydase (MPO)

Après un premier dosage, les LDL équilibrées dans du PBSox sont incubées avec HCl 4 mM, 2,6 unités chlorantes de MPO par mg de LDL en présence de H_2O_2 1 mM pendant 5 minutes à 37°C (bain-marie). La réaction est ensuite arrêtée par incubation 1 minute sur glace immédiatement après incubation à 37°C. Les MOX sont enfin équilibrées dans du RPMI et filtrées avant d'être dosées par la méthode de Folin-Ciocalteu.

2.1.4. Dosage des LDL par la méthode de Folin-Ciocalteu

2.1.4.1. Matériel et réactifs (tableau II-3)

2.1.4.2. Méthode

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec de l'ovalbumine à 1 mg/ml. Le volume dans chaque tube est ajusté à 100 μl avec du PBSox. Les échantillons sont composés de 20 μl LDL + 80 μl PBSox et le blanc sera fait sur 100 μl de PBSox. 400 μl de NaCl 0,9 % sont ajoutés dans chaque tube afin d'obtenir un volume final de 500 μl . 2,5 ml de réactif B sont ajoutés par tube

Tableau II-4: Réactifs utilisés pour la migration des lipoprotéines sur gel d'agarose

TBE 10X (1l)	108 g de Tris, 55 g d'acide borique, 9,3 g de Titriplex III, EDTA disodique (Invitrogen, UK)
Bleu de charge 5X (50 ml)	10 ml de Tris 2 M pH 6.8 (Merck, GER), 12,5 ml de β -mercaptoéthanol (FlukaChemi AG, SWZ), 25 ml de glycérol (Merck, GER), 50 mg de bleu de bromophénol (Janssens Chemicals)(+ SDS 20% (MP Biomedicals, FR) pour le bleu de charge utilisé en Western Blot)
Bleu de Coomassie (200 ml)	100 ml d'eau milli-Q, 80 de ml méthanol (Accros Organics, USA), 20 ml acide acétique, 0,3 g de bleu de Coomassie
Solution de décoloration (1l)	500 ml d'eau milli-Q, 400 ml de méthanol (Accros Organics, USA), 100 ml d'acide acétique
Gel de migration	Gel d'agarose 0,8 %

Tableau II-5 : Matériel et réactifs utilisés pour le repiquage des cellules EAhy926

Milieu de culture complet	Milieu DHG-L1 (Dulbecco High Glucose) (Gibco 41966 ; UK) contenant 1.5 g / l NaHCO_3
	10 % (ou 1 % avant stimulation aux LDL) de sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
Trypsine-EDTA	Solution de trypsine à 0,5 g / l et EDTA à 0,2 g / l préparée dans une solution de Puck (Gibco, UK)
Boîtes de culture	Boîtes de cultures de 75 cm ² (T75) (Costar, Corning, USA) ou T25 (25 cm ²)
Milieu de rinçage	PBS stérile (Phosphate Buffer Saline, Lonza, SWZ)
Tubes	Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)

et s'en suit une incubation de 10 minutes à température ambiante. 250 μ l de Réactif de Folin sont enfin ajoutés dans chaque tube, ces derniers seront incubés minimum 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité avant la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm.

2.1.5. Migration des LDL sur gel d'agarose

2.1.5.1. Principe

La migration des LDL modifiées sur gel d'agarose permet de vérifier si le processus d'oxydation a eu lieu correctement, puisque les modifications des résidus lysines de l'ApoB100 des LDL engendrent une migration plus ou moins importante par rapport aux LDL natives.

2.1.5.2. Matériel et réactifs (tableau II-4)

2.1.5.3. Méthode

Un gel d'agarose 0,8 % est préparé en dissolvant 0,8 g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE et en laissant polymériser le gel environ 30 minutes. Chaque échantillon est dilué à une concentration de +/- 500 μ g/ml dans du TBE 1X et en les mélangeant avec du bleu de charge 5X sans SDS, avant d'être chargé sur le gel. La migration s'opère pendant 2 heures à 80-100 V et ampérage maximum. Les protéines sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie pendant 20 minutes. Le surplus de colorant est nettoyé par 4 à 5 rinçages dans la solution de décoloration avant une décoloration toute la nuit. Le gel est ensuite scanné et numérisé grâce au logiciel Image Master Labscan.

2.1.6. Conditions de stimulation avec les LDL

Les LDL seront utilisées au cours de ce mémoire pour stimuler les cellules EAhy926. Toute stimulation aux LDL a été effectuée (sauf mentionné autrement) à la concentration de 100 μ g de LDL/ml de milieu. Toute stimulation est précédée d'une heure de mise au repos des cellules dans du milieu DGH-L1 seul, alors que la stimulation est effectuée dans du milieu DHG-L1 en présence de FBS à 1%.

2.2. Conditions statiques

2.2.1. Culture cellulaire

2.2.1.1. Type cellulaire utilisé

Le modèle cellulaire utilisé au cours de toutes les manipulations est un modèle de cellules endothéliales. Il s'agit de la lignée cellulaire hybride, les cellules EAhy926, qui résulte de la fusion entre des cellules primaires HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des cellules humaines épithéliales alvéolaires dérivées d'un carcinome pulmonaire de type II, les cellules A549.

2.2.1.2. Repiquage des cellules EAhy926

2.2.1.2.1. Matériel et réactifs (Tableau II-5)

2.2.1.2.2. Méthode

Les cellules EAhy926 sont cultivées en T75 placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les cellules sont réensemencées tous les deux jours (en semaine) ou tous les trois jours (pour le week-end) selon le protocole suivant : le milieu de culture est décanté et les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec 7 ml de PBS. Ces dernières sont détachées par ajout de 2 ml de trypsine-EDTA suivi d'une incubation de 2 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 8 ml de DHG-L1 10 % FBS. L'intégralité de la

Tableau II-6 : Test de cytotoxicité : Mesure du relargage de la lactate déshydrogenase par le « Cytotoxicity Detection Kit » de ROCHE

Matériel cellulaire	Cellules repiquées dans une plaque 24 puits (Costar ; Corning, USA) à une densité de 50.000 cellules / puits
Rinçage	PBS non stérile (0,9 % NaCl (Merck, GER), 10 mM KH ₂ PO ₄ (Merck, GER), pH=7,4)
Kit de détection	Kit ROCHE (Roche Applied Biosciences, USA) placé à -20°C (bouteille 1 reconstituée avec 1 ml d'eau distillée, bouteille 2 dégelée et placée à 4°C)
Matériel supplémentaire	Microtubes (Eppendorf) Multichannel (Labosystems) Plaque 96 puits (Greiner Bio-One, AUS) PBS-Triton X-100 (Merck, GER) 10 %

Tableau II-7 : Marquage de cellules spumeuses par coloration avec l'Oil Red O

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaques 12 puits (Costar) à une densité de 120.000 cellules par puits
Colorant Oil Red O stock	Solution d'Oil Red O (1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol, O0625, Sigma-Aldrich) 0,2 % dans l'isopropanol (Merck, GER)
Solution de dextrine	Solution de dextrine (Pharmacia Biotech) 1 % dans de l'eau milli-Q
Solution colorante à utiliser	Solution d'Oil Red O (3 volumes) et de dextrine (2 volumes) filtrée juste avant utilisation
Matériel supplémentaire	PBS non stérile (0,9 % NaCl (Merck, GER), 10 mM KH ₂ PO ₄ (Merck, GER), pH=7,4) Paraformaldéhyde (PAF) 4 % (Merck, GER) Ethanol 100 % ou 96 % (Merck, GER) Solution d'iodure de propidium 1 %

Tableau II-8 : Matériel pour la mesure de ROS intracellulaires

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaques 24 puits (Costar, Corning, USA) à une densité de 80.000 cellules / puits
Sonde fluorescente	H ₂ DCF-DA (2',7'-Dichloro-fluorescein, 410217, Sigma-Aldrich) 20 μM dans du DHG-L1 1 % FBS

suspension est ensuite centrifugée à 400 RCF durant 5 minutes afin de culoter cellules. Le surnageant est enfin décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml de DHG-L1. La suspension cellulaire est alors répartie en 2 ou 3 dans de nouvelles T75, contenant un volume de milieu ajusté à 15 ml.

2.2.2. Test de cytotoxicité : Mesure du relargage de la lactate déshydrogenase par le « Cytotoxicity Detection Kit » de ROCHE

2.2.2.1. Principe

L'évaluation de la cytotoxicité par le Kit ROCHE s'effectue via une méthode colorimétrique permettant une quantification à haut débit de la lyse ou mort cellulaire. Basée sur la mesure de l'activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH) relarguée du cytoplasme vers le milieu extracellulaire de cellules endommagées, cette méthode permet de quantifier de manière relative le pourcentage de cytotoxicité par rapport aux conditions contrôles, via une méthode mathématique comparant les quantifications obtenues pour les différentes fractions que sont les culots, les fractions cytoplasmiques et les surnageants de culture.

2.2.2.2. Matériel et réactifs (tableau II-6)

2.2.2.3. Méthode

Le milieu de culture est récolté et placé dans des microtubes nommés « culots » (C), le tout gardé sur glace. Les cellules restées dans les plaques sont lysées avec 250 µl de PBS-Triton X-100 10 %, placées sur agitateur de plaque à température ambiante pendant 10 minutes. Les cellules lysées sont ensuite transférées dans les microtubes nommés « lysat » (L). Les microtubes « culots » sont centrifugés 5 minutes à 400 RCF et le surnageant des culots est placé dans les microtubes nommés « surnageants » (S). Les culots sont enfin resuspendus dans 250 µl de PBS-Triton X-100 10 %. Les puits d'une plaque 96 puits sont alors remplis avec 100 µl de la fraction culot ou de la fraction surnageant. La fraction « lysat » est diluée 50X avant d'être dispensée à raison de 100 µl par puits dans la plaque. Le blanc « surnageant » est constitué de 100 µl de milieu seul, alors que les blancs « culots » et « lysat » sont constitués de 100 µl de PBS-Triton X-100 10 %. 100 µl de réactif préparé à raison de 222 µl de la bouteille 1 et 10 ml de la bouteille 2 pour 100 puits sont ajoutés par puits. La plaque 96 puits est conservée à l'abri de la lumière à température ambiante et l'absorbance est lue à 500 nm dans un lecteur de plaques. Le pourcentage de cytotoxicité est obtenu via la formule mathématique suivante:

$$\% \text{ cytotox} = \frac{100 * (C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4)}{(C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4) + ((L\text{-blc}) * 20)}$$

2.2.3. Marquage de cellules spumeuses par coloration à l'Oil Red O

2.2.3.1. Principe

La coloration à l'Oil red O est une coloration lysochrome et spécifique aux lipides neutres. Permettant de visualiser en premier lieu les lipides internalisés par les cellules par microscopie optique, la solution colorante peut ensuite être récupérée afin d'être quantifiée via une mesure d'absorbance.

2.2.3.2. Matériel et réactifs (tableau II-7)

Tableau II-9 : Extraction nucléaire

Matériel cellulaire	Cellules repiquées dans des T25 (Costar, Corning, USA) à 800.000 cellules/T25
PBS (1 l)	9 gr NaCl (Merck, GER) 20 ml tampon K_2HPO_4 0.5 M pH 7,4 (Merck, GER)
PBS + 1 mM Na_2MoO_4 + 5 mM NaF (100 ml)	100 ml PBS , 24 mg Na_2MoO_4 (Sigma, USA), 21 mg NaF (Merck, GER)
Tampon hypotonique (HB) 10X (pour 1 l)	2,1 g NaF (50 mM, Merck, GER) ; 2,42 g Na_2MoO_4 (10 mM, Sigma) ; 47,5 g Hepes (200 mM, Accro Organics); 0,37 g EDTA (1 mM, Merck, GER) pH 7,9
Tampon de lyse 0,5 % NP-40 (pour 100 ml)	10 ml HB 10X 500 μ l NP-40 (Sigma), 89,5 ml H_2O
Tampon RE (100 ml)	10 ml HB 10X, 20 ml glycérol 87 %, 70 ml H_2O
Tampon SA (0,8 M NaCl) (100 ml)	10 ml HB10X, 20 ml glycérol 87 %, 20 ml NaCl 4 % (7,01 g/30 ml H_2O), 50 ml H_2O
RE complet	1 ml tampon RE 40 μ l PIC (protease inhibitor cocktail) (Complete, Roche), 40 μ l PIB (phosphatase inhibitor buffer)
SA complet	1 ml tampon SA 40 μ l PIC (protease inhibitor cocktail) (Complete, Roche), 40 μ l PIB (phosphatase inhibitor buffer)
PIC et PIB	PIB (phosphatase inhibitor buffer) : 25 mM Na_3VO_4 ; 250 mM p-nitrophenylphosphate; 250 mM β -glycérophosphate; 125 mM NaF pour 10 ml PIC (protease inhibitor cocktail, Complete Roche) : une tablette à dissoudre dans 2 ml H_2O
Matériel supplémentaire	Racloirs 24 cm (TPP, SWZ) Microtubes (Eppendorf)

2.2.3.3. Méthode

Les cellules sont rincées au préalable avec 2 ml de PBS, avant d'être fixées par une incubation de 2 minutes 30 secondes dans 1 ml de PAF 4 %. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, et incubées 30 minutes avec 1 ml de solution ORO/Dextrine à température ambiante. Après coloration, la solution ORO est décantée et les cellules sont rincées 3X avec 2 ml de PBS. A ce moment, les cellules peuvent être visualisées en microscopie optique et prises en photo. Les cellules sont enfin perméabilisées avec 1 ml d'éthanol 96 % pendant 30 minutes à température ambiante. L'éthanol ayant perméabilisé les cellules et redissout le colorant ORO présent dans les lipides, est récupéré et transféré dans une autre plaque 12 puits et son absorbance est lue à 490 nm. Les cellules sont incubées avec 1 ml de solution d'iodure de propidium (10 ng/ μ l) durant 30 minutes à l'obscurité. La fluorescence est alors lue à 612 nm après excitation à 515 nm au fluorimètre. Les résultats sont exprimés par un ratio des valeurs d'absorbance et de fluorescence.

2.2.4. Mesure de la production d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ROS)

2.2.4.1. Principe

La sonde sensible aux Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène H₂DCF-DA (ou 5-(et-6)-chlorométhyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate acétyl ester) est une sonde intracellulaire qui est clivée par les estérases intracellulaires qui hydrolysent les groupements acétates ; elle ne peut plus diffuser hors de la cellule suite à ce clivage. Elle ne devient fluorescente qu'une fois oxydée.

2.2.4.2. Matériel et réactifs (tableau II-8)

2.2.4.3. Méthode

La mesure de production de ROS intracellulaire est effectuée en incubant les cellules pendant 30 minutes avant la stimulation avec des LDL avec la sonde H₂DCF-DA 20 μ M dans du DHG-L1 1% FBS. La fluorescence est lue à 520 nm après stimulation avec les LDL ($\lambda_{exc}=485$).

2.2.5. Extraction nucléaire

2.2.5.1. Matériel et réactifs (tableau II-9)

2.2.5.2. Méthode

Les cellules sont rincées une première fois avec 10 ml de PBS, pour être ensuite rincées une seconde fois avec 10 ml de PBS froid complété avec du Na₂MoO₄ 1 mM et du NaF 5 mM. Après une incubation de 5 minutes sur glace dans du tampon hypotonique (HB), les T25 sont décantées à fond et sont raclées dans 500 μ l de tampon de lyse 0,5 % NP-40. Le lysat est transféré dans des microtubes qui seront ensuite incubés 5 minutes sur glace puis centrifugés 30 secondes à 15.700 RCF. Le surnageant est décanté après centrifugation et le culot est resuspendu dans 50 μ l de RE complet (voir tableau II-9) + 50 μ l de SA complet. Les tubes sont incubés en chambre froide à 4°C sur roue pendant 30 minutes. Une dernière centrifugation de 10 minutes à 15.700 RCF et à 4°C permet de récupérer les surnageants, qui seront congelés à -70°C. Ceux-ci seront utilisés pour déterminer l'activité de Nrf2.

2.2.6. Dosage de protéines par les méthodes de Bradford et de Pierce

2.2.6.1. Dosage de protéines par la méthode de Bradford

2.2.6.1.1. Matériel et réactifs (tableau II-10)

Tableau II-10 : Dosage protéique par les méthodes de Bradford et de Pierce

Matériel requis pour le dosage par la méthode de Bradford	Réactif de Bradford (Bio-Rad protein Assay 5X, Bio-Rad, USA) Tubes à Bradford (Kartel, ITA) Extraits protéiques BSA (Bovine Serum Albumin à 2 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) (Thermo Fisher Scientific, USA)
Matériel requis pour le dosage par la méthode de Pierce	Réactif de Pierce (Thermo Fisher Scientific, USA) Extraits protéiques BSA (Bovine Serum Albumine à 2 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) (Thermo Fisher Scientific, USA) Plaques 96 puits (Greiner Bio-One, AUS) Multichannel (Labosystems)

Tableau II-11 : Matériel et réactifs utilisés pour le test de liaison à l'ADN de Nrf2 par Trans-AM

Matériel	Plaques 96 puits « coatées » Tips BioHit
Tampon de binding concentré	Hepes 2 mM (Accro Organics) EDTA 0,2 mM (Merck, GER) NaCl 8 mM (Merck, GER) Glycérol 12 % H ₂ O pH 7,5
Tampon de binding complet	1 ml de tampon de binding concentré 2 μ l de DTT 1M
Tampon de lyse	800 μ l de tampon RE 200 μ l de tampon SA 40 μ l de PIC 40 μ l de PIB
Lysat	Dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 10 μ g/ 20 μ l
Anticorps primaire	Anti-Nrf2 dilué 500X dans du PBS 50 + BSA 1 % (PAA Laboratories, GER)
Anticorps secondaire	Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000X dans PBS 50 + Lait Gloria 1 %
Autres réactifs	Solution TMB (tétraméthylbenzidine) (Tebu-Bio) Solution Stop (HCl) (Biosources) BSA Fraction V (Sigma)

2.2.6.1.2. Méthode

Le but de cette méthode est d'évaluer la quantité de protéines présentes dans un extrait. De 2 à 5 μ l d'extraits sont ajoutés dans 1 ml de réactif de Bradford dilué 5X dans de l'eau milli-Q. Après 5 minutes d'incubation, l'absorbance (densité optique ou DO) de la solution est lue à 595 nm grâce à un spectrophotomètre mis au préalable à zéro sur de l'eau. Afin d'obtenir une droite d'étalonnage, différentes concentrations en BSA sont également lues avec la série d'échantillons. Le blanc étalon est constitué d'eau, alors que le blanc échantillon variera selon le tampon de lyse utilisé. Enfin, il est possible d'obtenir la concentration en protéines via la formule suivante :

$$\frac{((\text{moyenne DO échantillons} - \text{moyenne blancs échantillons}) / (\text{moyenne DO étalon} - \text{moyenne DO blanc étalon})) \times \text{volumes des échantillons}}{5} = \mu\text{g prot}/\mu\text{l}$$

2.2.6.2. Dosage de protéines par la méthode de Pierce

2.2.6.2.1. Matériel et réactifs (tableau II-10)

2.2.6.2.2. Méthode

Cette procédure permet également d'évaluer la concentration en protéines d'un échantillon. Ici, 10 μ l de chaque échantillon sont déposés dans la plaque 96 puits, et à la manière d'un Bradford, certains puits serviront à réaliser une droite d'étalonnage grâce à la BSA de concentration connue (0 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 μ g de BSA, volume ajusté si nécessaire à 10 μ l avec de l'eau milli-Q). 100 μ l de réactif de Pierce sont ajoutés dans chaque puits, et la DO à 660 nm est lue après 5 minutes d'incubation de la plaque à température ambiante. La même formule que décrite au point précédent est utilisée.

2.2.7. Quantification du taux de liaison à l'ADN de Nrf2 par Trans-AM

2.2.7.1. Principe

Le but de cette méthode colorimétrique est de mesurer la liaison de facteurs de transcription (ici Nrf2) à l'ADN. Des plaques 96 puits « coatées » à la streptavidine permettent de piéger un trappeur, ou ADN double brin biotinylé à une extrémité, contenant la séquence consensus du facteur de transcription d'intérêt. Une fois le trappeur fixé, des extraits nucléaires sont incubés dans les puits, permettant la liaison du facteur de transcription. Ces derniers sont extraits via le protocole du point 6. Le facteur de transcription lié sera ensuite reconnu via un système d'anticorps primaire/secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). L'activité enzymatique de cette dernière dépendra de l'abondance du facteur de transcription accroché à la séquence consensus.

2.2.7.2. Matériel et réactifs (tableau II-11)

2.2.7.3. Méthode

Tout d'abord, 30 μ l tampon de binding 1X sont déposés dans chaque puits. 20 μ l de lysat dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 10 μ g/ 20 μ l sont ensuite rajoutés dans ces derniers. La plaque est alors incubée 1 heure sur vortex à température ambiante. Après l'incubation, les puits sont rincés 3X avec 200 μ l PBS 50 Tween 0,1 % et 100 μ l d'anticorps anti-Nrf2 (dilué 500 X dans du PBS 50 + BSA 1 %) sont déposés dans chaque puits pendant 1 heure à température ambiante. Les puits sont, après incubation, rincés 3X avec 200 μ l de PBS 50 Tween 0,1 %. La fixation de l'anticorps secondaire se fait en déposant 100 μ l du conjugué dilué 1000X dans du PBS 50 + Gloria 1 % par puits, et la plaque est incubée 1 heure à température ambiante. La plaque est enfin rincée 4X avec 200 μ l de PBS 50 Tween 0,1 % et 100 μ l de TMB sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 10 minutes à

Tableau II-12 : Matériel et réactifs nécessaire pour la transfection des cellules EAhy926 en single Luciferase Assay

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaque 24 puits (Costar, USA) à une densité de 100.000 cellules / puits
Plasmide	Plasmide (ADN) pARE-luciférase (Leonard, Kieran <i>et al.</i> 2006)
Agent transfectant	Superfect (Qiagen)
Milieu de transfection	OptiMEM (Gibco, UK) seul et à 5,9 % FBS
Solution de rinçage	PBS stérile (Lonza, Suisse)
Matériel divers	Tubes de 10 ml stériles (Sterillin, UK)
Kit de révélation	PBS non stérile Glo Lysis Buffer (Promega, USA) Luminoscan Plaque 96 puits (Thermo Fisher Scientific, USA) Substrat Luciférase (Promega, USA)

Tableau II-13 : Matériel et réactifs nécessaires à la transfection des cellules EAhy926 en Double Luciferase Assay

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaque 24 puits (Costar, USA) à une densité de 100.000 cellules / puits
Plasmide	Plasmide (ADN) pARE-luciférase (Leonard <i>et al.</i> , 2006) (5/6) et pRL SV40 (promega, USA)
Agent transfectant	Superfect (Qiagen)
Milieu de transfection	OptiMEM (Gibco, UK) seul et à 5,9 % FBS
Solution de rinçage	PBS stérile (Lonza, SWZ)
Matériel divers	Tubes de 10 ml stériles (Sterillin, UK)
Kit de révélation	Luminomètre (Berthold) Dual luciférase assay (Promega, USA) : Passive Lysis Buffer 5X, Luciferase Assay Reagent II (LAR II), Solution Stop and Glo 50X Cuvettes Lumac (Stardest, GER)

température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 μ l de solution Stop dans chaque puits. La DO est ensuite lue à 455 nm, avec comme référence 655 nm dans un lecteur de plaques.

2.2.8. Mesure de l'activité transactivatrice de Nrf2 par transfection des cellules EAhy926 avec un plasmide rapporteur

2.2.8.1. Transfection en Single Luciferase Assay

2.2.8.1.1. Principe

Un système rapporteur permet de déterminer l'activité transactivatrice d'un facteur de transcription. L'activité du facteur de transcription Nrf2 est mesurée grâce à l'induction de l'expression du gène rapporteur Luciférase, placé sous le contrôle d'un promoteur authentique de *NQO1*. La luciférase ainsi produite catalysera la production d'émissions lumineuses mesurées par un luminomètre en présence d'ATP et de magnésium, suite à l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Le plasmide a été aimablement fourni par Leonard *et al* (Leonard, Kieran *et al.*, 2006). En single Luciferase Assay, les cellules ne sont transfectées qu'avec un type de plasmide, la normalisation s'effectue en rapportant le signal sur la quantité de protéines mesurée par la méthode de Bradford ou Pierce.

2.2.8.1.2. Matériel et réactifs (tableau II-12)

2.2.8.1.3. Méthode

La plaque 24 puits sera repiquée la veille à raison de 100.000 cellules / puits dans du DHG-L1. 1 μ g d'ADN / puits est mélangé avec 60 μ l d'optiMEM / puits. Après 5 minutes d'incubation 0,6 μ l de Superfect / puits est mélangé. Pendant les 15 minutes d'incubation, les puits sont rincés 1X au PBS stérile (Lonza, SWZ) à 37°C. Après le temps d'incubation, 360 μ l d'optiMEM 5,9% FBS / puits sont ajoutés aux complexes. 400 μ l de la solution transfectante sont déposés dans chaque puits préalablement décanté avec du PBS. La transfection se produit pendant 3 heures à 37°C / 5% de CO₂. Après la transfection, les cellules sont rincées une fois au DHG-L1 seul à 37°C et mises au repos 1 heure dans du DHG-L1 1% FBS avant la stimulation avec les LDL. Cette dernière se déroule pendant 24 heures, après quoi la révélation de la transcription est réalisée: les puits sont rincés 2X au PBS puis incubés 5 minutes avec 150 μ l de Glo Lysis Buffer. Les puits sont ensuite « splachés » et 100 μ l de lysat cellulaire sont transférés dans une plaque 96 puits. La lecture doit être directement effectuée au Luminoscan, juste après l'ajout de 100 μ l de substrat luminescent. Le reste du lysat cellulaire est utilisé pour doser les protéines via la méthode de Bradford ou de Pierce.

2.2.8.2. Transfection par Double Luciferase Assay

2.2.8.2.1. Principe

Le principe est le même que celui décrit dans le point précédent, à l'exception qu'il s'agit d'une cotransfection du plasmide pARE-Luc avec le plasmide pRL SV40, plasmide portant le gène de la luciférase de Renilla placé sous le contrôle d'un promoteur viral fort et constitutif (SV40). Le signal produit par cette luciférase, discriminable de celui produit par la luciférase « Firefly » du plasmide pARE-Luc, permettra de normaliser ce dernier sans dosage de protéines.

2.2.8.2.2. Matériel et réactifs (tableau II-13)

Tableau II-14 : Matériel et réactifs requis pour l'analyse en real time RT-PCR

Extraction ARN	<p>Tri Reagent Solution (Ambion/Applied Biosystems)</p> <p>Chloroforme RNase free</p> <p>Isopropanol 100% RNase free (Merck, GER)</p> <p>Ethanol 75% RNase free (Merck, GER)</p> <p>Eau RNase Free</p> <p>Microtubes RNase free (Eppendorf)</p> <p>Tips RNase free</p> <p>Paillasse RNase free</p> <p>Racloirs 24 cm (TPP, SWZ)</p> <p>PBS RNase free</p> <p>SDS 1% (MP Biomedicals, FR)</p> <p>Cellules repiquées en T25 (Costar, Corning, USA) à 800.000 cellules / boîte l'avant veille de la stimulation</p>
Réverse transcription	<p>Kit Roche : Primer oligo(dT), dNTP mix, Buffer RT 5 x, Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Protector RNase Inhibitor, Reverse Transcriptase</p> <p>Eau RNase free</p>
Real Time RT-PCR	<p>Master mix « SYBR Green PCR » (Applied Biosystems, Holland)</p> <p>Amorces sens et antisens (voir tableau II-15 pour séquences et concentrations à utiliser)</p> <p>Plaque 96 puits (96 well optical reaction plate, Applied Biosystems, Holland)</p> <p>Logiciel 7000 SDS (sequence detection system ; Applied biosystems, Holland)</p> <p>Eau RNase free</p> <p>Tips RNase Free</p>

2.2.8.2.3. Méthode

La méthode de transfection est la même jusque la révélation, à l'exception qu'ici les deux plasmides sont cotransfectés avec un ratio de 5/6 pARE-Luc et 1/6 pRL SV40. Après transfection, les cellules sont rincées 2X au PBS et sont incubées à température ambiante avec 100 μ l de Passive Lysis Buffer 1X sur agitateur de plaque pendant 15 minutes. Les puits sont ensuite « splatchés » et le lysat cellulaire est centrifugé 3 minutes à 15.700 RCF. Seul le surnageant est gardé pour la lecture au luminomètre : un volume de 60 μ l de LARII est déposé dans autant de cuvettes Lumac que de conditions, auquel sont rajoutés 20 μ l de lysat cellulaire. Une première lecture est effectuée directement au luminomètre. La cuvette Lumac est reprise et 60 μ l de Stop and Glo 1X y sont ajoutés, avant de procéder rapidement à la deuxième lecture. Le premier signal correspondant à la luciférase « Firefly » est ensuite normalisé avec le deuxième signal, correspondant lui à la luciférase Renilla.

2.2.9. Analyses en RT-PCR en temps réel

2.2.9.1. Extraction d'ARN total

2.2.9.1.1. Matériel et réactifs (tableau II-14)

2.2.9.1.2. Méthode

Les manipulations avec de l'ARN doivent se faire en conditions RNase free. Pour ce faire, la paillasse et le matériel sont nettoyés au SDS 1 %. Les T25 sont d'abord décantées de leur milieu et rincées 2X sur glace avec du PBS RNase free froid. Les cellules sont ensuite raclées dans 300 μ l de Tri Reagent Solution et le lysat est transféré dans des microtubes RNase free qui seront ensuite incubés 5 minutes à température ambiante. Il est alors possible de les congeler à -70°C ou de procéder directement à l'extraction d'ARN. Cette dernière commence avec l'ajout de 65 μ l de chloroforme dans chaque tube. Ceux-ci sont ensuite agités vigoureusement pendant 15 secondes à la main. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 12.000 RCF à 4°C pour séparer les phases. La phase supérieure est récupérée et 170 μ l d'isopropanol sont ajoutés. Les tubes sont ensuite incubés environ 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugés pendant 10 minutes à 12.000 RCF à 4°C. Le surnageant est alors prudemment décanté, et le culot rincé avec 1 ml d'éthanol 75 %. Les tubes sont enfin centrifugés pendant 5 minutes à 7.600 RCF à 4°C. Le surnageant est décanté, et les culots sont séchés pendant quelques minutes sur bloc chauffant à 37°C. Les culots sont resuspendus dans 20 μ l d'eau RNase free. L'ARN est alors dosé avant transcription réverse ou congelé à -70°C.

2.2.9.2. Transcription réverse

2.2.9.2.1. Matériel et réactifs (tableau II-14)

2.2.9.2.2. Méthode

Un volume de chaque échantillon contenant 5 μ g d'ARN total est engagé dans la réaction, auquel de l'eau RNase free est ajoutée afin d'atteindre un volume total de 12 μ l. 1 μ l d'oligo dT est ajouté également à chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite incubés 10 min à 65 °C. 7 μ l de mix réactionnel (4 μ l buffer RT 5X, 4 μ l dNTP, 0,5 μ l protector RNase inhibitor, et 0,5 μ l reverse transcriptase par tube) sont ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min à 55 °C et 5 min à 85 °C afin d'arrêter la réaction de réverse-transcription. Finalement, les échantillons sont conservés à -20°C pour la RT-PCR en temps réel.

Tableau II-15 : Liste des gènes cibles et séquences des amorces des gènes étudiés au cours de ce mémoire, dilution de ces dernières

Gènes étudiés	Séquence des amorces		Dilution (nM)	
	Sens	Antisens	Sens	Antisens
<i>HO-1</i>	GCA CTC AGG CAG AGG GTG ATA	CAA CTC AAA GAG CTG GAT GTT	300	300
<i>NQO-1</i>	AAT TCA GAG TGG CAT TCT GCA TTT	CTG GAG TGT GCC CAA TGC TAT A	300	300
<i>IL-8</i>	CTG GCC GTG GCT CTC TTG	GGG TGG AAA GGT TTG GAG TAT G	300	300
<i>PTX-3</i>	CAA TTG ACT CCA TCC CAC TGA	GAT GAA GAG CTT GTC CCA TTC C	900	900
<i>23kD</i>	GCC TAC AAG AAA GTT TGC CTA TCT G	TGA GCT GTT TCT TCT TCC GCT AGT	300	300
<i>IL-1β</i>	CTT AAA GCC CGC CTG ACA AGA	AAT AGG GAA GCG TTG CTC AT	300	300
<i>GAPDH</i>	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	200	200
<i>18S</i>	TGG TGC ATG GCC GTT CT	TAG TTA GCA TGC CAG AGT CTC GTT	300	300
<i>COX2</i>	ATT AGC CTG AAT GTG CCA TAA GAC T	ACC CAC AGT GCT TGA CAC AGA AT	300	300
<i>c-FOS</i>	TCA CCC GCA GAC TCC TTC TC	GTG GGA ATG AAG TTG GCA CTG	300	300
<i>ICAM-1</i>	GCA GTG GTG CAA TCA TGG TT	ATT TGC CAG GTG TGG TGT TGT	300	300
<i>MMP-9</i>	CCT TCC TTA TCG CCG ACA AGT	ACC GAC GCG CCT GTG TAC	300	300
<i>MCP-1</i>	CAT TGT GGC CAA GGA GAT CTG	AGT GAG TGT TCA AGT CTT CGG AGT T	900	300
<i>Tubuline-α</i>	CCC GAG GGC ACT ACA CCA T	CAG GGA GGT GAA CCC AGA AC	300	300
<i>Nrf2</i>	GCA AGT TTG GGA GGA GCT ATT ATC	AGT TTG GCT TCT GGA CTT GGA A	300	300

<i>Tnfa</i>	TTG ATC CCT GAC ATC TGG AAT CT	CTG GAA ACA TCT GGA GAG AGG AA	300	300
<i>KLF2</i>	ACG CAC CGC CAC TCA CA	TTG CAG TGG TAG GGC TTC TCA	300	300
<i>eNOS</i>	AAG CGA GTG AAG GCG ACA AT	GAG GGA CAC CAC GTC ATA CTC A	300	300
<i>VCAM-1</i>	TTG GCT CAC AAT TAA GAA GTT TAA CAC	GCA GGT ATT ATT AAG GAG GAT GCA A	300	300
<i>TM</i>	TCA GGT CCT CAG AGA ATT TCT ACC A	AGC CTA GGA TTC TGC ATT TCT AAC C	300	300
<i>GCS</i>	GAA GAG AGC ATC TGG AGA ACT AAT GA	AGT TAT GAC ACT GTC TTG CTT GTA GTC A	300	300
<i>ABCa</i>	TGG AAT TGT GCC CTA AGT GTT GT	CTG AAC CTT CCA TTG ACC ATG AT	300	300
<i>SOD2</i>	CAA ATT GCT GCT TGT CCA AAT C	CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC	300	300

2.2.9.3. RT-PCR en temps réel

2.2.9.3.1. Principe

La RT-PCR en temps réel permet de mesurer des variations d'abondance de transcrits entre une condition contrôle et plusieurs conditions test. Les ADNc obtenus après l'étape de rétro-transcription seront amplifiés par PCR et la quantité d'amplicon sera évaluée grâce à l'intercalant fluorescent qu'est le SYBRgreen. A un cycle de PCR donné, la fluorescence est telle qu'elle se distingue du bruit de fond et provient de l'amplicon spécifiquement formé. Ce cycle, ou Ct (pour Cycle Threshold) possède une valeur inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ, donc de messenger. La valeur de Ct est ensuite normalisée avec la valeur de Ct d'un gène exprimé de manière non variable selon les conditions de stimulation. Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification, une courbe de dissociation est réalisée en fin de PCR et correspond à une chute de fluorescence à une température donnée pour laquelle les brins de l'amplicon se séparent.

2.2.9.3.2. Matériel et réactifs (tableau II-14)

2.2.9.3.3. Méthode

Un mix réactionnel est préparé pour chaque gène étudié. Ce dernier contient 2,5 μ l d'amorce sens à la dilution adéquate (voir tableau II-15), 2,5 μ l d'amorce antisens à la dilution adéquate, 12,5 μ l de Master Mix et 2,5 μ l d'eau RNase free. 5 μ l d'ADNc dilué 100 x sont ajoutés à 20 μ l du mix / puits. Le logiciel est alors lancé et un fichier contenant les gènes ciblés et le design de plaque est créé.

2.2.9.3.4. Traitement des données

La méthode utilisée pour le travail des données est celles des $\delta\delta$ Ct. La valeur de Ct d'un « housekeeping gene » (ou HKG) est soustraite à la valeur correspondante à la même condition d'un autre gène étudié. Les valeurs de δ Ct obtenues pour la condition contrôle sont soustraites à chaque valeur δ Ct des conditions de stimulation pour un même gène étudié, et en effectuant $2^{-\delta\delta Ct}$ pour chaque condition de stimulation, nous obtenons le niveau d'induction de ce gène par rapport à la condition contrôle de stimulation.

2.2.10. Analyses en Western Blot

2.2.10.1. Principe

Le western blot est une technique permettant d'estimer de manière semi-quantitative les variations d'abondance protéique entre différentes conditions expérimentales. Se déroulant en de nombreuses étapes, cette technique permet le transfert de protéines préalablement séparées selon leur poids moléculaire sur une membrane de PVDF. Ces protéines sont alors facilement accessibles à des anticorps couplés à un système de révélation permettant une impression sur film photographique.

2.2.10.2. Extraction protéique totale et préparation des échantillons

2.2.10.2.1. Matériel et réactifs (tableaux II-16 et II-17)

2.2.10.2.2. Méthode

Le tampon de lyse complet est préparé en ajoutant à 1 ml de tampon de lyse 40 μ l de PIC et de PIB. Les cellules, rincées au préalable 2X avec du PBS froid, sont lysées dans 100 μ l de tampon de lyse complet, raclées et transférées dans des microtubes. Le lysat cellulaire est alors incubé minimum 30 minutes sur glace en étant vortexé toutes les 10 minutes. Les microtubes sont enfin centrifugés 10 minutes à 15.700 RCF à 4°C et seul le surnageant est conservé. La concentration protéique du lysat cellulaire est évaluée par le dosage protéique par la méthode de Bradford ou de Pierce (voir ci-dessus). Un volume de lysat correspondant à

Tableau II-16 : Réactifs utilisés lors de la technique de Western Blot

Gel buffer (200 ml)	36,3 g Tris (Merck, Allemagne) 0,8 g SDS (MP Biomedicals, USA) pH 8,9
Gel mix 12 % (35 ml)	8,4 ml Gel buffer, 14 ml Acryl/bis (Bio-Rad, USA), 12,6 ml H ₂ O
Gel séparateur d'acrylamide	35 ml gel mix 12 % , 175 µl APS 25 % (PlusOne Amersham, GE Healthcare, UK), 10,5 µl TEMED (tetra-méthyl-éthylènediamine, PlusOne Amersham, GE Healthcare, UK)
Spacer gel buffer (200 ml)	10,2 g Tris (Merck, Allemagne), 40 g Glycine (Merck, Allemagne), 10 g SDS (MP Biomedicals, USA) pH 6,8
Spacer gel mix (10 ml)	2,5 ml Spacer gel buffer 1,7 ml Acryl/bis (Bio-Rad, USA) 5,8 ml H ₂ O
Gel concentrateur	10 ml Spacer gel mix, 50 µl APS 25 %, 3 µl TEMED (tetra-méthyl-éthylènediamine, PlusOne Amersham, GE Healthcare, UK)
Running buffer 10X (1 l)	30 g Tris (Merck, Allemagne), 140 g Glycine (Merck, Allemagne), 10 g SDS (MP Biomedicals, USA)
Blotting buffer (1 l)	24 g Tris (Merck, Allemagne), 115g Glycine (Merck, Allemagne), 1 l méthanol
Bleu de charge 5X NuPage	10 ml Spacer gel buffer, 10 ml SDS 20 %, 5 ml β-mercaptoéthanol, 10 ml glycérol 17,5 ml bleu de bromophénol
TBS (1 l)	24,22 g Tris (Merck ; 80,06 g NaCl (Merck) ; pH=7,6
PBS-Tween 0,1 % (500 ml)	500 ml TBS, 500 µl Tween-20 (Sigma-aldrich)
TBS-T 0,1% Lait 2%	200 ml TBS-T 0,1% ; 4 g lait (Amersham, USA)
Tampon de Lyse « Biosource » (Elisa)	TRIS 10 mM, pH 7,4 (Merck, GER) NaCl 100 mM (Merck, GER) Glycérol 10 % NP-40 1 % SDS 0,1 % DOC (déoxycholate de sodium) 0,5 %

une quantité précise de protéines (30 μg) est portée à 40 μl de volume avec de l'eau milli-Q. 10 μl de bleu de charge sont ensuite ajoutés et les protéines sont dénaturées pendant 5 minutes à 100°C.

2.2.10.2.3. Electrophorèse, transfert (blotting) et révélation

2.2.10.2.3.1. Matériel et réactifs (tableaux II-16 et II-17)

2.2.10.2.3.2. Méthode

Le système est monté avec les plaques et les spacers. Le gel concentrateur est coulé de telle manière à ce que le niveau arrive environ 1 cm en bas du niveau du peigne. De l'isobutanol est déposé à la surface du liquide non polymérisé, afin de l'en préserver de l'oxygène. Après 1 heure de polymérisation, la surface du gel est rincée avec de l'eau et le gel concentrateur est coulé. Le peigne est rapidement placé, et le gel concentrateur est laissé à polymériser pendant 45 minutes. Après polymérisation, le peigne est retiré et les échantillons déposés au fond des puits. Le gel est placé au fond de la cuve et soumis à un ampérage de 35 mA. Après que les échantillons aient migré dans le gel séparateur, ceux-ci sont soumis à un ampérage de 45 mA pendant environ 2 heures 30 minutes. Après migration complète des échantillons à travers le gel, ce dernier est démoulé. La membrane de PVDF est activée 1 minute dans du méthanol 100 %, puis équilibrée 5 minutes dans du tampon de transfert. Les papiers Whatman sont humectés avec ce même tampon, ainsi que les éponges servant au système sandwich. La membrane équilibrée est déposée sur le gel et deux papiers Whatman humides sont superposés à la membrane. Les bulles sont retirées avec un rouleau humidifié au tampon de transfert. Deux éponges humides sont placées en surface, et le système est retourné afin de déposer de l'autre côté également deux papiers Whatman et deux éponges humides. Le système est placé dans la cuve de transfert, membrane en dessous, et soumis à un ampérage de 150 mA pendant 2 heures. Après le transfert, la membrane est incubée dans du TBS-T + agent bloquant Amersham 2 % pendant 2 heures. Après cette étape de blocking, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dans du TBS-T + agent bloquant Amersham 2 % toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite rincée 3X15 minutes dans du TBS-T 0,1 % avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire. 3 rinçages au PBS-T 0,1% sont effectués avant de procéder à la révélation. Pour ce faire, la membrane est déposée face protéines sur la solution de révélation pendant 5 minutes avant d'être transférée en chambre noire pour impressionner les films photographiques. Le film est enfin déposé dans la machine de fixation/révélation. La liste des anticorps utilisés est reprise dans le tableau II-18.

2.2.11. Autres réactifs

- Trolox (Merck, GER), utilisé comme anti-oxydant : 125,16 mg suspendu dans 2 ml d'éthanol stérile (Merck) = solution stock, utilisation à raison de 2 μl de la solution stock par ml de DHG-L1 1 % FBS.
- SIN-1 (3-morpholinosydnonimine, hydrochloride, Invitrogen Molecular Probes) utilisé comme contrôle positif dans les techniques de Trans-AM et de transfection : une fiole resuspendue dans 484 μl HBSS stérile complété avec 2,42 μl CaCl_2 (Merck, GER) et 2,42 μl MgSO_4 (Merck, GER), utilisé à du 1mM dans du DHG-L1 1 % FBS
- H_2O_2 (Merck, GER) utilisé comme contrôle positif dans l'évaluation de la cytotoxicité et la mesure de production de ROS : 200 et 500 μM dans du DHG-L1 1 % FBS.

2.2.12. Tests statistiques

Tous les tests statistiques (test t de student, comparaison pairée et ANOVA 1) ont été effectués grâce au logiciel SigmaStat©.

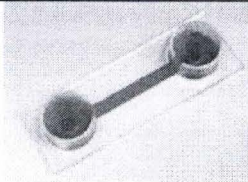
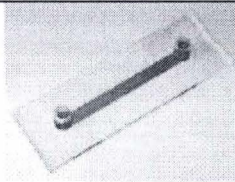

Tableau II-17 : Matériels utilisés lors de la technique de Western Blot

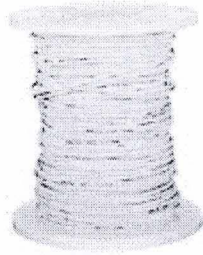
Extraction protéique	<p>Cellules repiquées en T25 (Costar, Corning, USA) à 800,000 cellules/boîte</p> <p>PBS non stérile</p> <p>Tampon de lyse « Biosource » (voir tableau II-16)</p> <p>PIC et PIB (voir tableau II-9) (Roche, GER)</p> <p>Racloirs 24 cm (TPP, SWZ)</p>
Préparation des échantillons	<p>Bleu de charge (voir tableau II-4)</p> <p>Échantillons</p>
Electrophorèse	<p>Gel séparateur (Running gel, voir tableau II-16)</p> <p>Gel concentrateur (stacking Gel, voir tableau II-16)</p> <p>Tampon d'électrophorèse (Running buffer, voir tableau II-16)</p> <p>Cuve/plaques de verre/spacers/peignes/générateur</p> <p>Isobutanol (Merck, GER)</p>
Transfert	<p>Appareil de transfert (Hoeffer Semiphor, amersham, USA)</p> <p>Papier Whatman (Merck, GER)</p> <p>Membrane de PVDF (Amersham, UK)</p> <p>Tampon de transfert (blotting buffer, voir tableau II-16)</p> <p>Méthanol 100% (Accros Organics)</p> <p>Éponges</p>
Révélation	<p>Tampon de rinçage (TBS-T 0,1% pH=7,6, voir tableau II-16)</p> <p>Anticorps primaires et secondaires (voir tableau II-8)</p> <p>Agent bloquant (TBS-T lait 2%, voir tableau II-16)</p> <p>Substrat de révélation (ECL advance Western Blotting Detection Kit, Amersham, UK)</p> <p>Film photographique (Amersham, UK)</p> <p>Appareil de fixation et révélation (Fuji, JP)</p>

Tableau II-18 : Anticorps/réactifs utilisés au cours de ce mémoire

Protéine ciblée	Référence	Dilutions (IF)	Dilutions (WB)
HO-1	Rabbit EP1391Y, Abcam	100X	5.000X
Nrf2	Rabbit H-300, sc-13032, Santa Cruz	100X	
α -tubuline	MS-581-PCL, NeoMarkers		50.000X
Actine	Alexa 488-phalloidine	1.000X	
IgG de lapin	Alexa 488-anti rabbit conjugates (2 ^{daires})	1.000X	

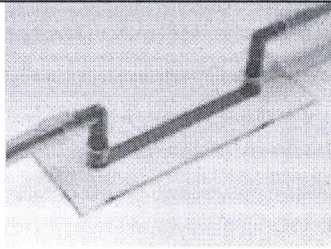
Tableau II-19 : Types de lames Ibidi utilisées pour les conditions statiques et en flux et matériel utilisé lors de la mise en flux

Statique	Flux
	
Ibidi μ -Slide I	Ibidi μ -Slide I ^{0.4} Luer
Repiquage dans 100 μ l (volume du canal) à une confluence de 1.600.000 cellules / ml (source : http://www.ibidi.de)	
	
source : http://www.masterflex.com/	
Pompe péristaltique L/S® Easy-Load® II 77200-62 (Masterflex, ColeParmer, USA)	



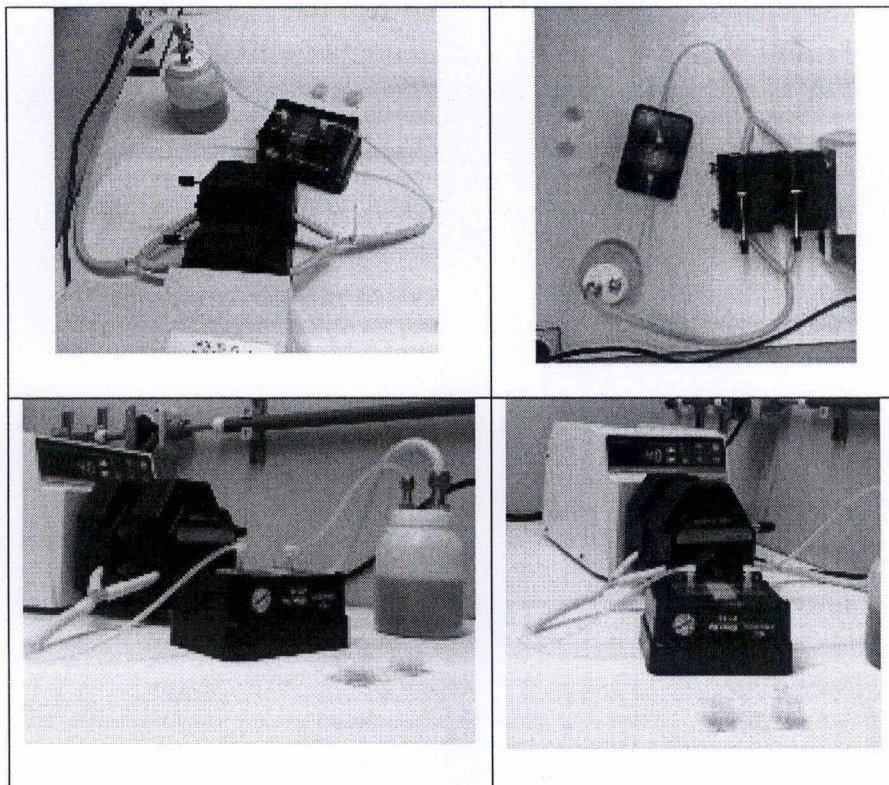
source : <http://www.masterflex.com>

Masterflex PharMed BPT Spooled Tubing, L/S (#15, ref R-95687-15, Masterflex, ColeParmer, USA)



Ibidi Flow Kit (connector Luer male, connector 1.6 / 3.2 mm, silicone tubes 40 cm; 2.0 mm) (Ibidi, GER) (source: <http://www.ibidi.de>)

Figure II-1: Illustration du circuit et de l'intégration des lames Ibidi μ -Slide I



2.3. Conditions dynamiques

2.3.1. Culture cellulaire

2.3.1.1. Principe

Afin d'étudier la réponse *in vitro* des cellules EAhy926 à un « shear stress », il est nécessaire de faire passer un flux de milieu sur les cellules. Un circuit fermé et stérile a été donc été conçu, faisant passer du milieu de culture standard sur des cellules cultivées en lames Ibidi®.

2.3.1.2. Matériel et réactifs

Les milieux de cultures, solution de rinçages, type cellulaire et produits nécessaires à l'entretien de la culture sont les mêmes qu'en condition statique (tableau II-2). Les cellules sont ici cultivées en lames Ibidi® (tableau II-19).

2.3.1.3. Méthode

Le repiquage s'opère de la même manière qu'en condition statique jusqu'à l'étape où les cellules sont redispensées en T75. Ici, les cellules sont comptées et la densité d'un aliquot cellulaire est portée à 1.600 000 cellules dans 1 ml via ajustement du volume par du DHG-L1. Un volume de 100 μ l de cette solution est prélevé de manière stérile et injecté dans les canaux des chambres Ibidi® (tableau II-19). Les lames sont ensuite incubées 1 heure dans l'étuve de culture, temps nécessaire aux cellules pour adhérer à la lame. Après ce temps d'incubation, les réservoirs de la chambre statique sont remplis avec 2X700 μ l de milieu DHG-L1 et les réservoirs de la chambre fluide sont remplis avec 2X70 μ l de ce même milieu. Les lames sont alors incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant toute manipulation ou mise en flux.

2.3.2. Circuit

2.3.2.1. Principe

La mise en flux nécessite la connexion des chambres Ibidi® avec une tubulure adaptée à une pompe péristaltique. Au cours de ce mémoire, un flux continu laminaire d'environ 50 dynes/cm² a été appliqué sur les cellules, ce qui correspond au « shear stress » supposé, selon la littérature (Malek, Alper *et al.*, 1999; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007) dans une artère coronarienne gauche.

2.3.2.2. Matériel (tableau II-19)

2.3.2.3. Méthode (figure II-1)

Les tubulures et le réservoir sont autoclavés avant la mise en flux et le milieu DHG-L1 est placé dans l'étuve à 5% CO₂ avec le bouchon dévissé afin d'équilibrer ce dernier en CO₂. Les emballages des tubulures sont ouverts sous atmosphère stérile. Le circuit est monté sous hotte et le réservoir de milieu est scellé avec un morceau de Parafilm® M après remplissage avec un volume de 200 ml (pour les expériences en flux seul) ou un volume de 100 ml additionné ou non de 100 μ g / ml de LDL (pour les expériences visant à déterminer les effets du flux et des LDL additionnés). Le système est placé en chambre chaude à 37°C pendant 24 heures.

2.3.3. Marquage en immunofluorescence

2.3.3.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence permet au même titre que le Western Blot d'étudier l'expression d'un gène au niveau protéique. De plus, cette technique qualitative permet de visualiser la localisation cellulaire d'une protéine particulière au sein de la cellule. Cette technique nécessite une fixation cellulaire et une perméabilisation afin de permettre au

Tableau II-20 : Matériel pour le marquage en immunofluorescence sur chambres Ibidi (Ibidi, GER)

PBS (1 l)	9 g NaCl (Merck,GER) ; 20 ml de tampon phosphate 0,5M, eau milli-Q
PBS-BSA 2% (100 ml)	2 g BSA (PAA Laboratories, GER) et mise à volume avec PBS
PBS-Triton X-100 1%	1 g Triton X-100 (Merck, GER) et mise à volume avec PBS
Autre matériel	PBS-Paraformaldéhyde 4 % (Merck, GER) TO-PRO-3 (Molecular Probes, USA) Microscope confocal (Leica) Mowiol (Sigma-Aldrich,GER-UK)

système d'anticorps primaire/secondaire couplé à un fluorochrome de pénétrer dans la cellule. Les cellules sont examinées au microscope confocal (Leica).

2.3.3.2. Matériel et réactifs (tableau II-20)

2.3.3.3. Méthode

Le marquage en immunofluorescence en chambre Ibidi® s'opère directement sur la lame. Après l'incubation des lames, les cellules sont rincées avec du PBS à 37°C comme illustré à la figure II-2 :

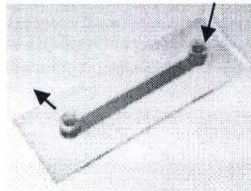


Figure II-2: Schéma montrant le principe des rinçages et incubations en chambre Ibidi®

Les cellules sont ensuite fixées de la même manière en faisant passer 3 ou 4X 100 μ l de paraformaldéhyde 4 % dans le canal. Après 10 minutes de fixation, les cellules sont rincées au PBS à 37°C. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec le PBS-Triton X-100 à 37°C en faisant passer 3 ou 4X 100 μ l de la solution perméabilisante dans le canal. Après 5 minutes d'incubation, les cellules sont rincées avec du PBS à 37°C et sont incubées 2X10 minutes avec du PBS-BSA 2 % à 37°C. Après cette étape, l'anticorps primaire à la dilution adéquate (ou la phalloïdine- Alexa Fluor 488) dans le PBS-BSA 2 % est injecté dans le canal (environ 2X le volume du canal) et incubé à 4°C en chambre humide (pour l'anticorps primaire) ou incubé 1 heure à température ambiante dans le cas de la phalloïdine- Alexa Fluor 488. Après cette étape, les canaux sont rincés avec du PBS-BSA 2% à 37°C et l'anticorps secondaire est mis à incuber 2 heures à température ambiante dans l'obscurité. Dans le cas du marquage de l'actine à la phalloïdine- Alexa Fluor 488, cette étape n'est pas nécessaire. Après cette incubation, les cellules sont rincées au PBS-BSA 2% et une nouvelle fois au PBS. Ces dernières sont alors incubées avec du ToPro-3 dilué 80X dans une solution de RNase (2 mg / ml de PBS) pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lame est montée au mowiol liquide à 56°C de la même manière qu'un rinçage, en faisant passer la solution dans le canal. La visualisation au microscope confocal se fait après quelques heures de durcissement du mowiol.

2.3.4. RT-PCR en temps réel

Les analyses en Real Time RT-PCR se font de la même manière qu'en conditions statiques à l'exception de l'extraction, qui requiert une technique particulière étant donné le design de la lame.

2.3.4.1. Matériel et réactifs (tableau II-14)

2.3.4.2. Méthode

Les lames sont rincées avec 4 à 5X le volume du canal en PBS RNase free selon le même procédé que pour l'IF (figure II-2). Les réservoirs sont ensuite complètement vidés, et le canal rempli de 100 μ l de Tri Reagent Solution (Ambion/Applied Biosystems) et incubé quelques minutes à température ambiante. L'opération est répétée avec 70 μ l de Tri Reagent Solution (Ambion/Applied Biosystems) afin de récupérer l'entièreté des cellules. Le reste de la procédure d'extraction d'ARN est similaire en tout point à celle décrite dans le volet conditions statiques (Point 2.2.9).

3. Résultats

Figure 1. Comparison of the number of eggs per female for the two species.



Figure 2. Comparison of the number of eggs per female for the two species. The y-axis represents the number of eggs per female, and the x-axis represents the instar stage. The legend indicates the two species: Species 1 (dark bars) and Species 2 (light bars).



Figure 3. Comparison of the number of eggs per female for the two species. The y-axis represents the number of eggs per female, and the x-axis represents the instar stage. The legend indicates the two species: Species 1 (dark bars) and Species 2 (light bars).



Figure III-1 : Les LDL modifiées au cuivre et à la myéloperoxydase possèdent une mobilité électrophorétique différente des LDL natives. Les LDL natives, oxydées au cuivre ou à la MPO migrent de manière différente sur un gel d'agarose. 25 μg de LDL ont été déposés par puits.

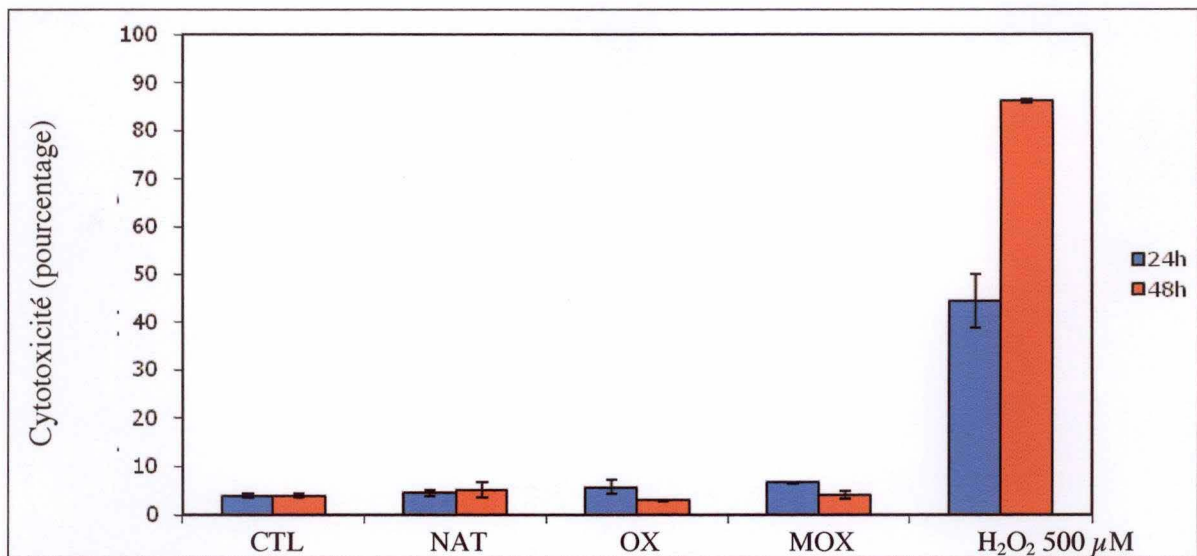


Figure III-2 : Les LDL modifiées sont faiblement cytotoxiques. Le pourcentage de cytotoxicité des LDL natives, oxydées au cuivre et à la MPO est estimé en mesurant l'activité de la lactate deshydrogénase. Les cellules EAhy926 ont été stimulées pendant 24 ou 48 heures avec 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL natives ou modifiées. Le peroxyde d'hydrogène (500 μM) a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm SD (n=3) en pourcentage par rapport au lysat total (voir dans la section correspondante des Matériels et Méthodes).

3. Résultats

3.1. Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 aux LDL modifiées en conditions statiques: implication du facteur de transcription Nrf2

3.1.1. Caractérisation préliminaire de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 lors d'une stimulation aux LDL

La première partie des résultats générés en conditions de stimulations statiques s'est attelée à caractériser le modèle. En effet, jusqu'à présent, les LDL modifiées ou non avaient été testées sur des macrophages murins RAW 264.7 (thèse de Damien Calay). Avant de s'attarder aux effets des LDL sur la voie Nrf2, nous avons voulu vérifier la toxicité éventuelle des LDL natives ou modifiées sur les cellules endothéliales EAhy926. Dans un premier temps, nous avons évalué la validité du processus d'oxydation des LDL au cuivre ou à la myéloperoxydase, par migration de ces différentes fractions sur gel d'agarose. Ensuite, afin de vérifier si les LDL étaient cytotoxique pour les cellules EAhy926, nous avons procédé à une mesure du relargage de la lactate déshydrogénase après stimulation des cellules EAhy926 avec les LDL natives et modifiées. Le temps d'incubation réalisé pour ce test correspond à la période maximale de stimulation des cellules EAhy926 aux LDL natives et modifiées utilisée au cours de ce mémoire. Dans un troisième temps, puisque les modèles de macrophages utilisés dans le cadre des travaux ciblés sur l'athérosclérose sont connus pour être capables d'internaliser les LDL, nous avons procédé à une coloration intracellulaire spécifique aux lipides neutres, à savoir les triglycérides, afin d'évaluer si ce processus se déroule également dans les cellules EAhy926.

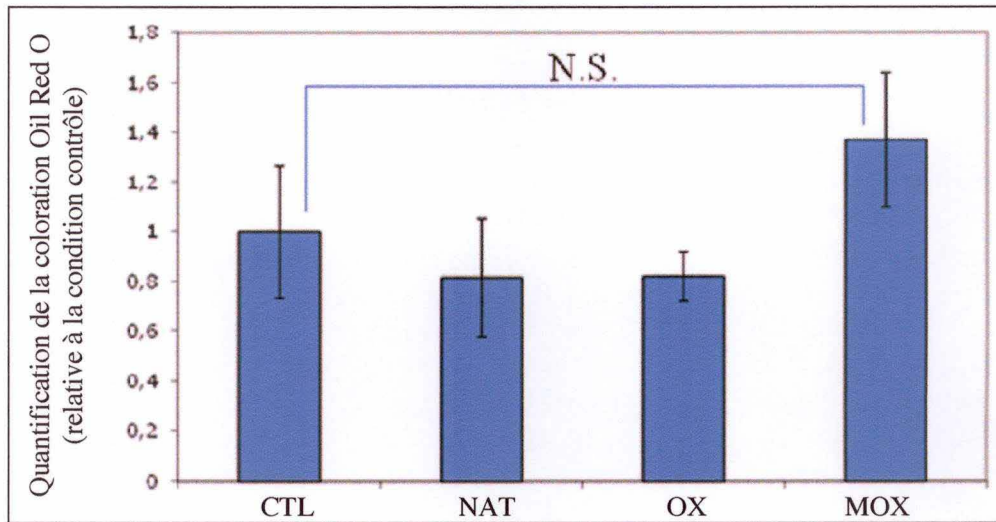
3.1.1.1. Les LDL modifiées au cuivre et à la myéloperoxydase se caractérisent par une mobilité électrophorétique différente par rapport aux LDL natives

Les trois fractions de LDL, à savoir les LDL natives (NAT), oxydées au cuivre (OX) et à la myéloperoxydase (MOX) ont été chargées en double sur un gel d'agarose à raison de 25 μg /puits. Une fois que les fractions de LDL ont migré, une coloration au bleu de Coomassie a été effectuée ; cette dernière étant spécifique aux protéines, les fractions de LDL ont été rendues visibles. Nous pouvons observer dans la figure III-1 que les LDL oxydées au cuivre migrent plus loin que les LDL natives, et que les LDL oxydées à la myéloperoxydase migrent elles encore plus loin que les LDL oxydées au cuivre.

3.1.1.2. Les LDL modifiées sont faiblement cytotoxiques

Afin d'évaluer si les LDL natives, oxydées au cuivre (OX) ou oxydées à la myéloperoxydase (MOX) peuvent éventuellement avoir un effet cytotoxique sur les cellules EAhy926, nous avons procédé à une mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase dans le surnageant de culture après 24 et 48 heures de stimulation avec les LDL NAT, OX et MOX. Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , a été utilisé comme contrôle positif (500 μM). Comme montré dans la figure III-2, les LDL NAT, OX et MOX induisent un taux de cytotoxicité relatif de moins de 10 % et ce pour les deux temps d'incubation testés. Le peroxyde d'hydrogène est lui responsable d'une élévation nettement plus marquée de la cytotoxicité, à savoir plus de 85 % pour 48 heures d'incubation. Cette manipulation a été réalisée avec une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL, concentration maintenue dans toutes les conditions de stimulation au cours de ce mémoire.

(a)



(b)

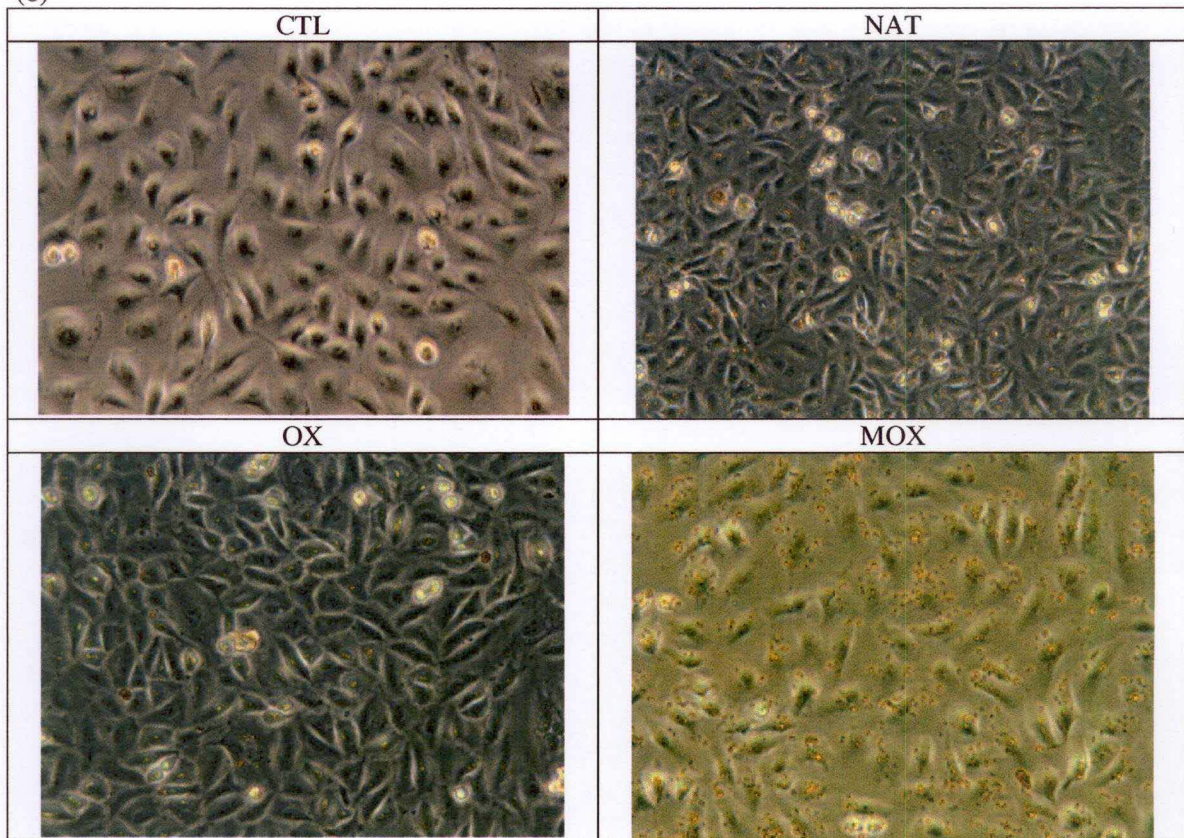


Figure III-3 : Coloration par l'Oil Red O des cellules EAhy926 après 48h de stimulation aux LDL. Marquage à l'Oil Red O des cellules EAhy926 après 48 heures d'incubation avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées. (a) La quantification de la coloration est réalisée par mesure d'absorbance à 490 nm. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm SD (n=4). N.S. est utilisé pour désigner une différence non significative statistiquement. (b) Les micrographies en contraste de phase de cellules incubées ou non avec des LDL natives ou modifiées pendant 48 heures montrent des points rouges semblant être internalisés ou adsorbés à la surface des cellules endothéliales incubées en présence de MOX-LDL (objectif : 20X).

3.1.1.3. Coloration Oil Red O

L'internalisation des LDL par les cellules endothéliales a été également évaluée. Nous avons procédé à une coloration Oil Red O, spécifique aux lipides neutres, après 48 heures d'incubation des cellules EAhy926 avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées (figure III-3). Cette méthode a été utilisée avec succès pour évaluer l'internalisation de LDL par les macrophages qui se transforment *in vitro* en cellules spumeuses (thèse de Damien Calay). Comme montré dans la figure III-3a, nous n'observons pas de différence dans la quantification de la coloration entre les cellules contrôles et les cellules stimulées aux LDL NAT et OX. Ceci est confirmé par les micrographies réalisées grâce au microscope à contraste de phase, où nous n'observons pas de différence notable entre ces trois conditions. Cependant, la quantification apparemment plus grande pour les cellules stimulées aux MOX semble se confirmer dans les micrographies pour cette condition (figure III-3b, MOX), où nous pouvons remarquer une série de petits granules rouges qui pourraient correspondre à des gouttelettes lipidiques marquées à l'Oil Red O. Les tests statistiques, par comparaison pairée entre la condition contrôle et les cellules stimulées aux LDL MOX, ne montrent cependant pas de différence significative entre ces deux groupes de données ($t=2.373$ avec 6 degrés de liberté ; $p=0.055$).

3.1.2. Caractérisation de l'activation de la voie Nrf2 dans les cellules EAhy926 en réponse à une stimulation aux LDL

Après avoir mis en évidence que les LDL étaient peu cytotoxiques pour les cellules EAhy926 et qu'elles n'induisent pas la formation de cellules endothéliales spumeuses, nous avons pu tenter de caractériser la réponse des cellules EAhy926 aux LDL en nous focalisant sur le stress oxydatif et la voie dépendante du facteur de transcription Nrf2

3.1.2.1. Les LDL modifiées génèrent un stress oxydatif

Afin d'évaluer si la stimulation des cellules EAhy926 aux LDL natives et modifiées est capable d'induire un stress oxydatif dans ces dernières, et donc de manière subséquente d'activer la voie Nrf2, nous avons procédé à une mesure de la production d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ROS) après 30 minutes de stimulation aux LDL. La sonde fluorescente H₂DCF-DA a été utilisée. Comme montré dans la figure III-4, dans les cellules incubées avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou oxydées au cuivre, une faible augmentation de la production de ROS est observée par rapport à la condition contrôle. Cependant, une stimulation des cellules EAhy926 avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL oxydées à la myéloperoxydase est capable d'augmenter fortement la production de ROS, plus de 25 fois celle de la condition contrôle. Le peroxyde d'hydrogène a été utilisé comme contrôle positif car capable d'induire un stress oxydatif intense ; il génère comme attendu une production très élevée de ROS, plus de 72 fois celle de la condition contrôle. En résumé, des trois types de LDL utilisées pour stimuler les cellules EAhy926, ce sont les LDL oxydées à la myéloperoxydase qui sont les plus aptes à générer un stress oxydatif, avec une production de ROS élevée. Cette manipulation a été reproduite trois fois (résultats non montrés) à des temps ponctuels ou en cinétique avec à chaque fois la même tendance qui était observée, à savoir une génération de ROS plus élevée pour les MOX que pour les OX.

3.1.2.2. Effets des LDL sur l'activation de Nrf2

La voie Nrf2, connue pour être entre autres activée par un stress oxydatif, requiert à la fois la liaison du facteur de transcription Nrf2 à l'ADN et sa transactivation. Afin d'évaluer si les LDL natives ou modifiées à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ ont un effet sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2, nous avons procédé à un test Trans-AM. Comme montré dans la figure III-5, nous avons évalué l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 pour trois temps d'incubation,

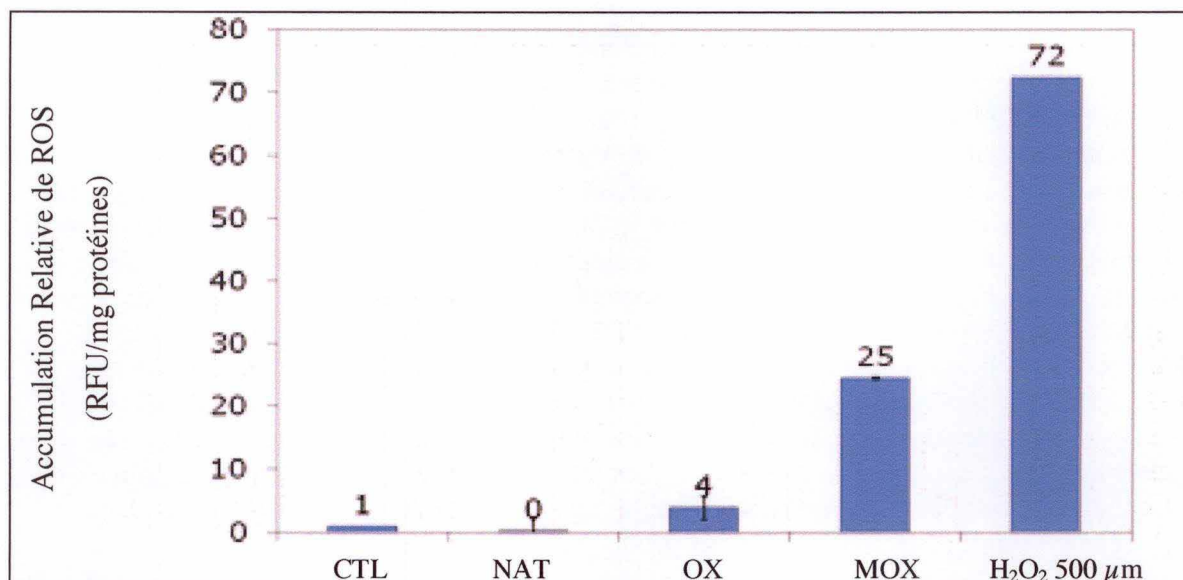


Figure III-4 : Les LDL modifiées génèrent un stress oxydatif. L'accumulation relative de ROS a été évaluée en utilisant la sonde H₂DCF-DA et la mesure de fluorescence (λ_{exc} = 485 nm ; λ_{em} = 520 nm) a été normalisée par la quantité de protéines. Les cellules EAhy926 ont été stimulées pendant 30 minutes avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées. Le peroxyde d'hydrogène a été utilisé comme contrôle positif à une concentration de 500 μ M. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm SD (pour les NAT, OX, MOX) (n=3) et calculés de manière relative aux cellules contrôles dont la valeur a été fixée arbitrairement à 1.

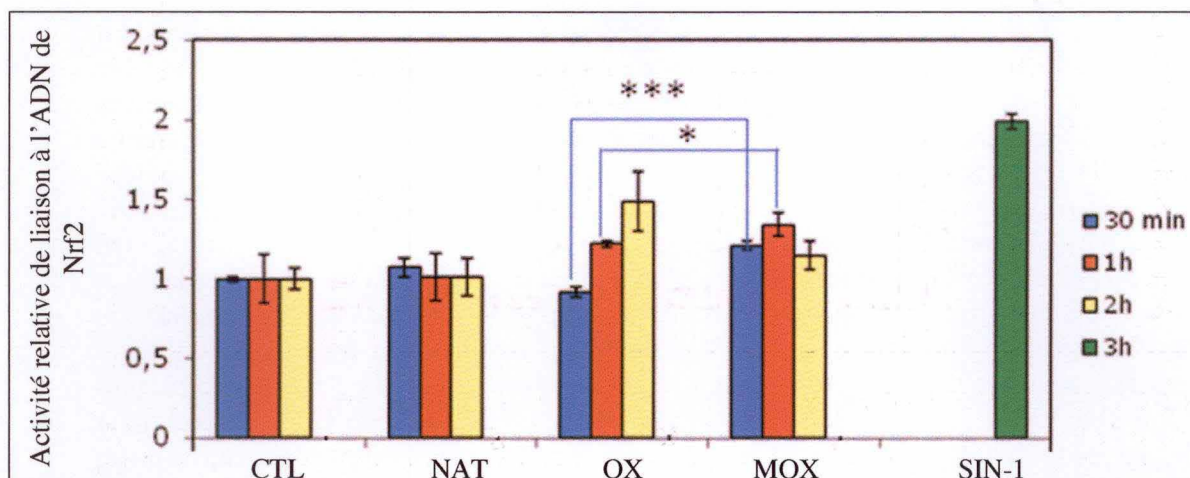
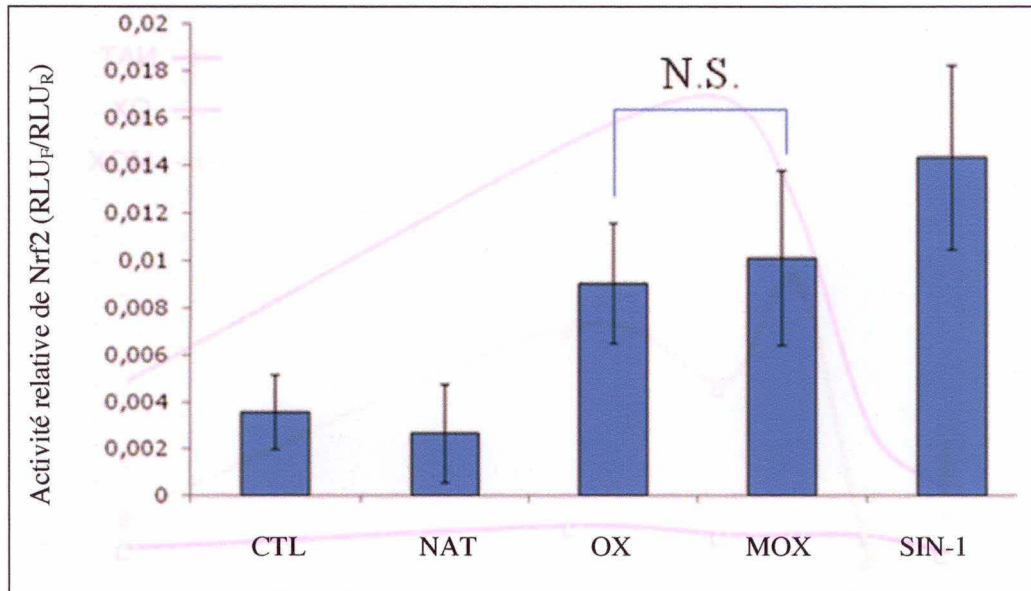


Figure III-5 : Evaluation des effets du SIN-1 et des LDL sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2. Les cellules EAhy926 ont été incubées en présence de 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées pendant des périodes de temps croissantes (30 minutes, 1 heure ou 2 heures). Les cellules ont également été incubées avec du SIN-1 (1 mM) pendant 3 heures, faisant office de contrôle positif. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles dont la valeur a été arbitrairement fixée à 1. ***= différence statistiquement significative entre les OX et MOX pour 30 minutes d'incubation (t=10,224 avec 4 degrés de liberté, p<0.001) ; *= différence statistiquement significative entre OX et MOX pour 1 heure d'incubation (t=2.976 avec 4 degrés de liberté, p=0.0041).

(a)



(b)

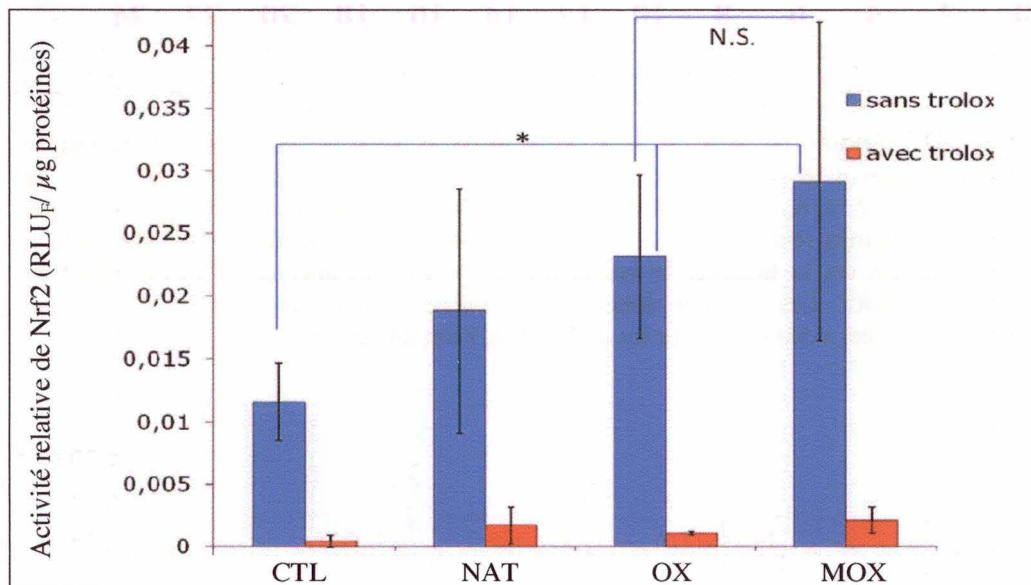


Figure III-6 : Etude de l'activité transactivatrice de Nrf2 en réponse à une stimulation aux LDL.

(a) Mesure de l'activité transactivatrice de Nrf2 en réponse à une stimulation de 24 heures aux LDL natives ou modifiées (100 μ g/ml) et au SIN-1 (1mM), ce dernier faisant office de contrôle positif. Un système rapporteur en Dual Luciférase a été utilisé (p-NQO1-ARE-LUC, pRL SV40). Le rapport entre les deux signaux luciférase est exprimé en tant que moyenne \pm SD (n=4). N.S. signifie une différence statistiquement non significative. (b) Mesure de l'activité transactivatrice de Nrf2 en réponse à une stimulation de 24 heures aux LDL natives ou modifiées (100 μ g/ml) avec et sans Trolox (500 μ M). Un système rapporteur en Single Luciférase a été utilisé (p-NQO1-ARE-LUC). Le rapport entre le signal luciférase et la quantité de protéines est exprimé en tant que moyenne \pm SD (n=4). N.S. signifie une différence statistiquement non significative ; * signifie une différence statistiquement significative entre OX, MOX et la condition contrôle (p<0.188 ; p<0.366).

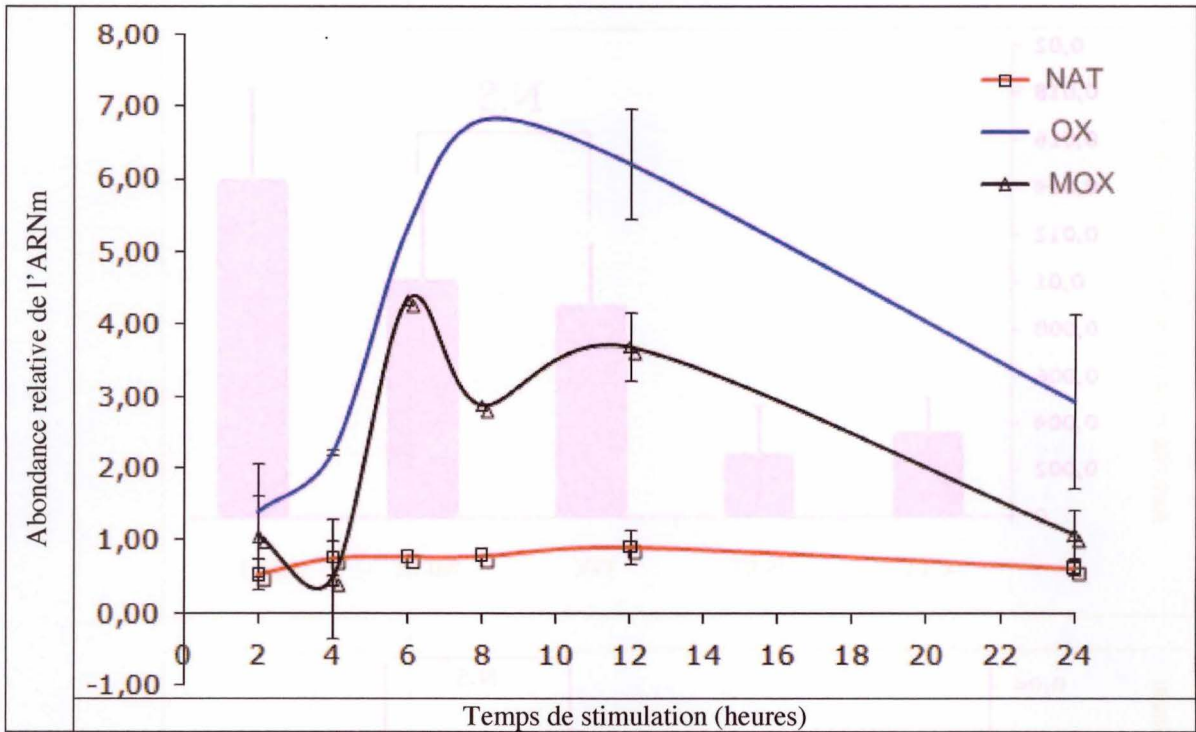


Figure III-7 : Les LDL modifiées induisent une surexpression d'*ho-1*. Variation de l'abondance relative de l'ARN messager d'*HO-1* en fonction d'une cinétique de stimulation avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives et modifiées (2, 4, 6, 8, 12 et 24 heures). L'expression relative d'*ho-1* est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, comme décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la tubuline et toutes les opérations arithmétiques ont été faites en utilisant la méthode des $\delta\delta\text{Ct}$. Les résultats donnés de manière relative aux cellules contrôles, et exprimés en tant que moyenne \pm SD (n=3 pour les points 2, 4, 12 et 24 heures).

respectivement 30 minutes, 1 heure et 2 heures. Les cellules EAhy926 ont été également incubées pendant 3 heures avec du SIN-1 1 mM, faisant office de contrôle positif. Ce dernier est connu pour activer la voie Nrf2 en induisant la production de peroxy-nitrite et a déjà été utilisé dans ce but avec succès sur le même type cellulaire au cours de la thèse de Laurine Mattart. Comme montré dans la figure III-5, les conditions contrôle génèrent un taux basal de liaison à l'ADN de Nrf2. Dans les cellules incubées avec les LDL natives, il n'y a pas de nette augmentation de ce taux de liaison à l'ADN. Par contre, les cellules incubées avec les LDL oxydées au cuivre sont responsables d'une augmentation de ce taux pour 1 heure et 2 heures d'incubation. Enfin, avec LDL oxydées à la myéloperoxydase on observe aussi une augmentation du taux de liaison à l'ADN de Nrf2 par rapport aux cellules contrôles et stimulées au LDL natives, mais à des niveaux comparables pour les trois temps d'incubation. Des tests statistiques (comparaisons paires) ont été effectués où les différences entre OX et MOX semblaient les plus notoires, et une différence statistique très hautement significative (***) existe entre OX et MOX pour 30 minutes de stimulation, ainsi qu'une différence statistique significative (*) entre OX et MOX pour 1 heure de stimulation ($t=2.976$ avec 4 degrés de liberté, $p=0.041$).

Après avoir confirmé qu'il existe une augmentation, même modeste, de l'activité de liaison de Nrf2 à l'ADN suite à une stimulation aux LDL modifiées et au SIN-1, nous avons ensuite procédé à l'évaluation de l'activité transactivatrice de Nrf2. Dans ce but, nous avons utilisé un système rapporteur en dual luciférase et un système rapporteur en luciférase simple pour transfecter les cellules EAhy926 (figure III-6). Ces dernières ont été stimulées pendant 24 heures avec des LDL natives ou modifiées, à 100 $\mu\text{g/ml}$, avant d'effectuer la transfection. Comme montré dans la figure III-6a, les cellules transfectées avec un système rapporteur en dual luciférase et stimulées avec du SIN-1 1mM génèrent le plus haut taux de transactivation de Nrf2, comme attendu. Nous observons également une augmentation de l'activité transactivatrice de Nrf2 pour les cellules stimulées avec des LDL modifiées par comparaison aux cellules contrôles ou à celles stimulées aux LDL natives. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence statistiquement significative entre les conditions OX et MOX ($t=0.200$ avec 6 degrés de liberté ; $p=848$). Dans la figure III-6b, nous avons procédé à une transfection en luciférase simple avec une stimulation avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées, additionnées ou non de Trolox 500 μM , un analogue hydrophile de la vitamine E et antioxydant bien reconnu. Nous avons pu mettre en évidence une différence statistiquement significative entre les cellules contrôles et stimulées avec des LDL modifiées ($p<0.188$, $p<0.366$). Il n'existe cependant pas de différence statistique entre les conditions OX et MOX. L'addition de Trolox provoque une diminution drastique de l'activité transactivatrice de Nrf2 pour les conditions OX et MOX, mais aussi pour les conditions contrôles et NAT.

3.1.2.3. Evaluation de l'effet des LDL sur l'expression du gène cible de Nrf2, *ho-1*.

Afin de confirmer l'activation de Nrf2 (activité de liaison et activité transactivatrice), nous avons procédé à l'évaluation de l'effet des LDL sur l'expression d'*ho-1*, à un niveau ARNm et protéique.

3.1.2.3.1 Les LDL modifiées induisent une surexpression d'*ho-1* au niveau ARNm

Afin d'évaluer la quantité relative d'ARNm d'*ho-1* produit en réponse à une stimulation des cellules EAhy926 avec des LDL natives ou modifiées au cours du temps, nous avons procédé à une RT-PCR quantitative en temps réel sur des extraits d'ARN totaux de cellules EAhy926 stimulées avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées pendant 2, 4, 6, 8, 12 et 24 heures

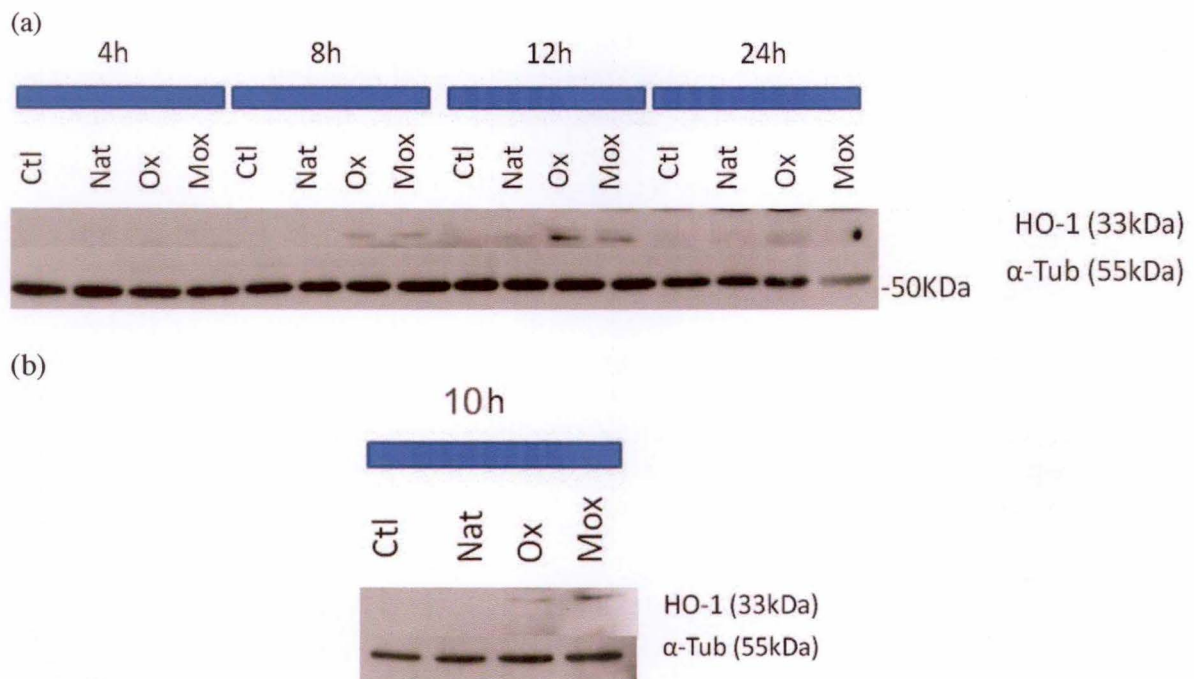


Figure III-8 : Les LDL modifiées induisent une augmentation d'abondance d'HO-1. (a) Les cellules EAhy926 ont été incubées pendant des durées croissantes (4, 8, 12 et 24 heures) avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées. L'extraction protéique totale et le Western Blot ont été réalisés selon la description dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. HO-1 peut être visualisée à 33 kDa et montre une surexpression à 8 et 12h d'incubation avec des OX et MOX et ceci en fonction d'une comparaison avec les cellules contrôles. L' α -tubuline, observée à 55kDa, a été utilisée comme contrôle de charge. (b) Les cellules EAhy926 ont été incubées avec 100 μ g/ml de LDL natives et modifiées pendant 10 heures.

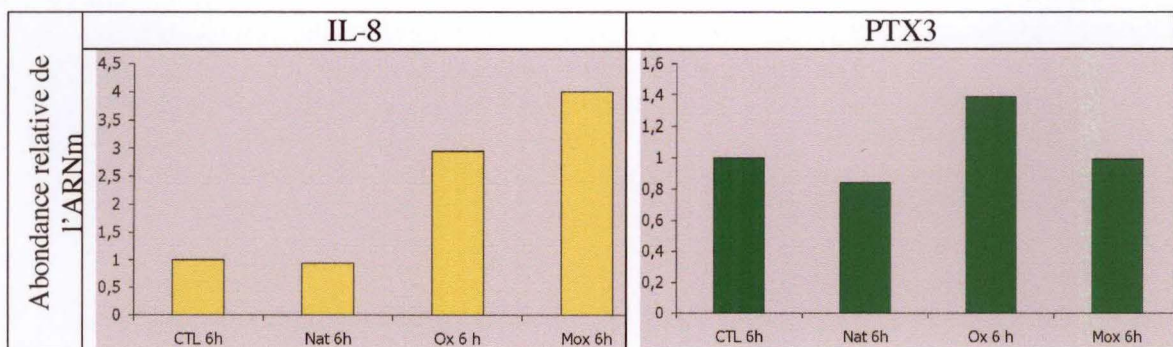


Figure III-9 : Les LDL natives et modifiées induisent la surexpression de gènes pro-inflammatoires. Abondance relative de l'ARN messager pour l'IL-8 et la PTX3 en fonction d'une stimulation des cellules EAhy926 avec 100 μ g/ml de LDL natives et modifiées pendant 6 heures. L'abondance relative des ARNm est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, comme décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est le 23 kDa et toutes les opérations arithmétiques ont été faites en utilisant la méthode des $\delta\delta$ Ct. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles.

(figure III-7). La tubuline a été utilisée comme « housekeeping gene » (HKG) pour la normalisation et les opérations mathématiques ont été effectuées grâce à la méthode des $\delta\delta Ct$. L'abondance de l'ARNm d'*ho-1* pour les conditions NAT, OX et MOX est exprimée de manière relative par rapport à l'abondance de l'ARNm dans la condition contrôle. Comme montré dans la figure III-7, les LDL natives n'induisent pas de surexpression d'*ho-1*, contrairement aux LDL modifiées. Les LDL oxydées au cuivre sont responsables de la plus forte surexpression d'*ho-1* au cours du temps dans les cellules EAhy926, avec un pic d'abondance relative localisé entre 6 et 10 heures de stimulation. Les LDL oxydées à la myéloperoxydase sont responsables d'une surexpression d'*ho-1* également, mais plus modeste que pour les LDL OX. Le pic majeur d'abondance relative est localisé lui autour des 6 heures de stimulation, mais il est suivi d'un deuxième pic vers 12 heures. Trois cinétiques ont été réalisées de manière indépendante et moyennées. On constate donc que l'induction d'*ho-1* n'est pas directement corrélée à l'intensité du stress oxydatif induit (figure III-4).

3.1.2.3.2 Les LDL modifiées induisent une augmentation de l'abondance d'HO-1

Afin de confirmer la surexpression d'HO-1 mais à un niveau protéique cette fois, nous avons procédé à des analyses en Western Blot (figure III-8). Les cellules EAhy926 ont subi une stimulation avec 100 $\mu g/ml$ de LDL natives ou modifiées, suivie d'une extraction protéique totale à respectivement 4, 8, 12 et 24 heures de stimulation (figure III-8a). La révélation en chémoluminescence en ECL standard nous a permis d'observer la bande correspondant à la HO-1 à 33 kDa. Bien qu'HO-1 ne soit pas observée dans les conditions contrôles ou avec les LDL natives, l'incubation des cellules EAhy926 avec des LDL modifiées pendant 8 et 12 heures induit une surexpression d'HO-1. Afin de confirmer ceci, nous avons procédé à une stimulation des cellules EAhy926 avec des LDL natives et modifiées et une extraction protéique totale ponctuelle après 10 heures de stimulation (figure III-8b). Nous observons la bande HO-1 prédite à 33 kDa pour une stimulation des cellules EAhy926 avec des LDL modifiées, alors qu'HO-1 n'est surexprimée ni dans les conditions contrôles, ni avec les LDL natives.

3.1.2.4 Les LDL induisent la surexpression de gènes pro-inflammatoires

Puisque les LDL modifiées ont potentiellement un effet pro-inflammatoire, nous avons évalué l'abondance relative de l'ARNm de 2 gènes pro-inflammatoires, à savoir l'interleukine-8 (*il-8*) et la pentraxine-3 (*ptx3*) (figure III-9). Une RT-PCR quantitative en temps réel a été effectuée sur des extraits d'ARN totaux de cellules EAhy926 stimulées pendant 6 heures avec des LDL natives ou modifiées. Le gène 23 kDa a été utilisé comme « housekeeping gene » (HKG) pour la normalisation et les opérations mathématiques ont été effectuées grâce à la méthode des $\delta\delta Ct$. L'abondance de l'ARNm pour les 2 gènes cibles et pour les conditions NAT, OX et MOX est exprimée par rapport à l'abondance de l'ARNm dans la condition contrôle. Comme montré dans la figure III-9, les LDL natives n'induisent pas la surexpression de l'*il-8* ou de la *ptx3*. L'*il-8* est surexprimée après 6 heures de stimulation avec des LDL modifiées, alors que *ptx3* ne semble être surexprimée qu'après 6 heures de stimulation avec des LDL oxydées au cuivre uniquement.

3.1.2.5 Les LDL natives induisent la surexpression d'ABCA1

Puisqu'*ABCA1* est décrit dans la littérature (Liao, Langmann *et al.*, 2002) comme un gène régulé par une stimulation aux LDL, nous avons tenté d'évaluer l'abondance relative d'ARNm d'*ABCA1* produit en réponse à une stimulation des cellules EAhy926 aux LDL natives ou modifiées au cours du temps. Nous avons procédé à une RT-PCR quantitative en temps réel sur des extraits d'ARN totaux de cellules EAhy926 stimulées avec 100 $\mu g/ml$ de

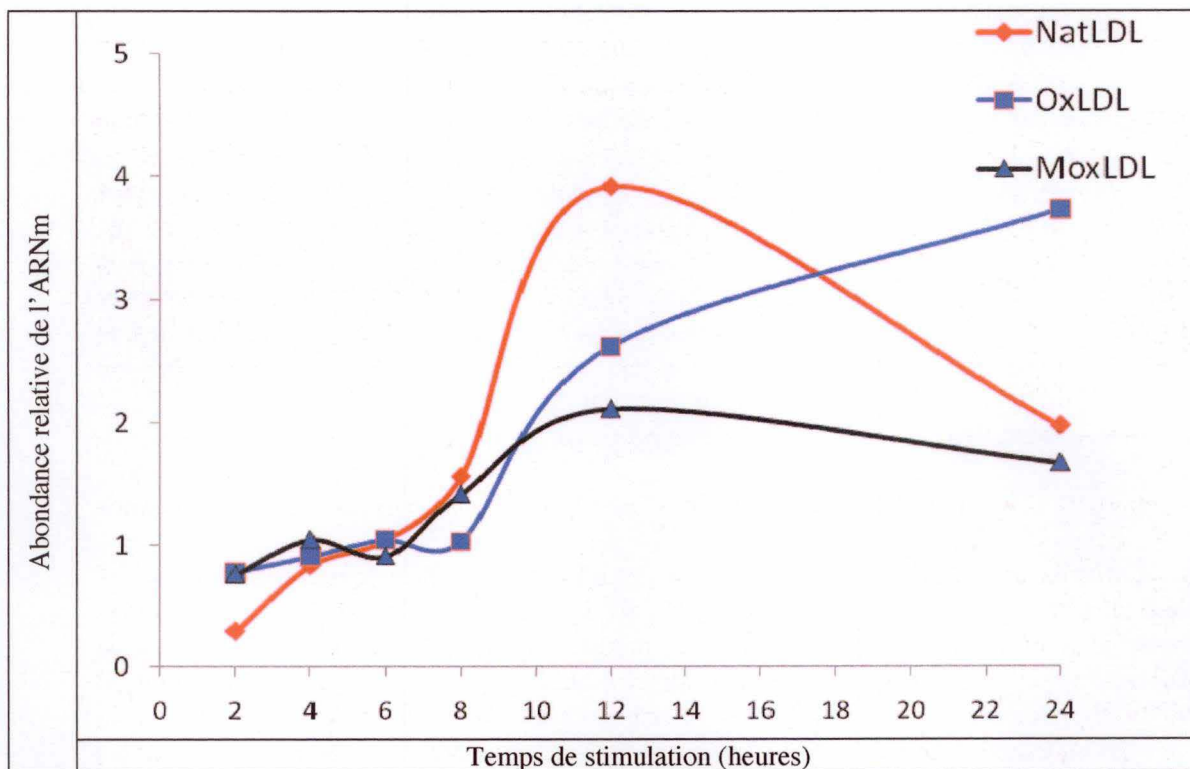


Figure III-10 : Les LDL natives induisent la surexpression d'*ABCA1*. Variations d'abondance relative de l'ARN messenger d'*ABCA1* en fonction d'une cinétique de stimulation avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives et modifiées (2, 4, 6, 8, 12 et 24 heures). L'abondance relative de l'ARNm d'*ABCA1* est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, comme décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la tubuline et toutes les opérations arithmétiques ont été faites en utilisant la méthode des $\delta\delta\text{Ct}$. Les résultats sont donnés de manière relative aux cellules contrôles.

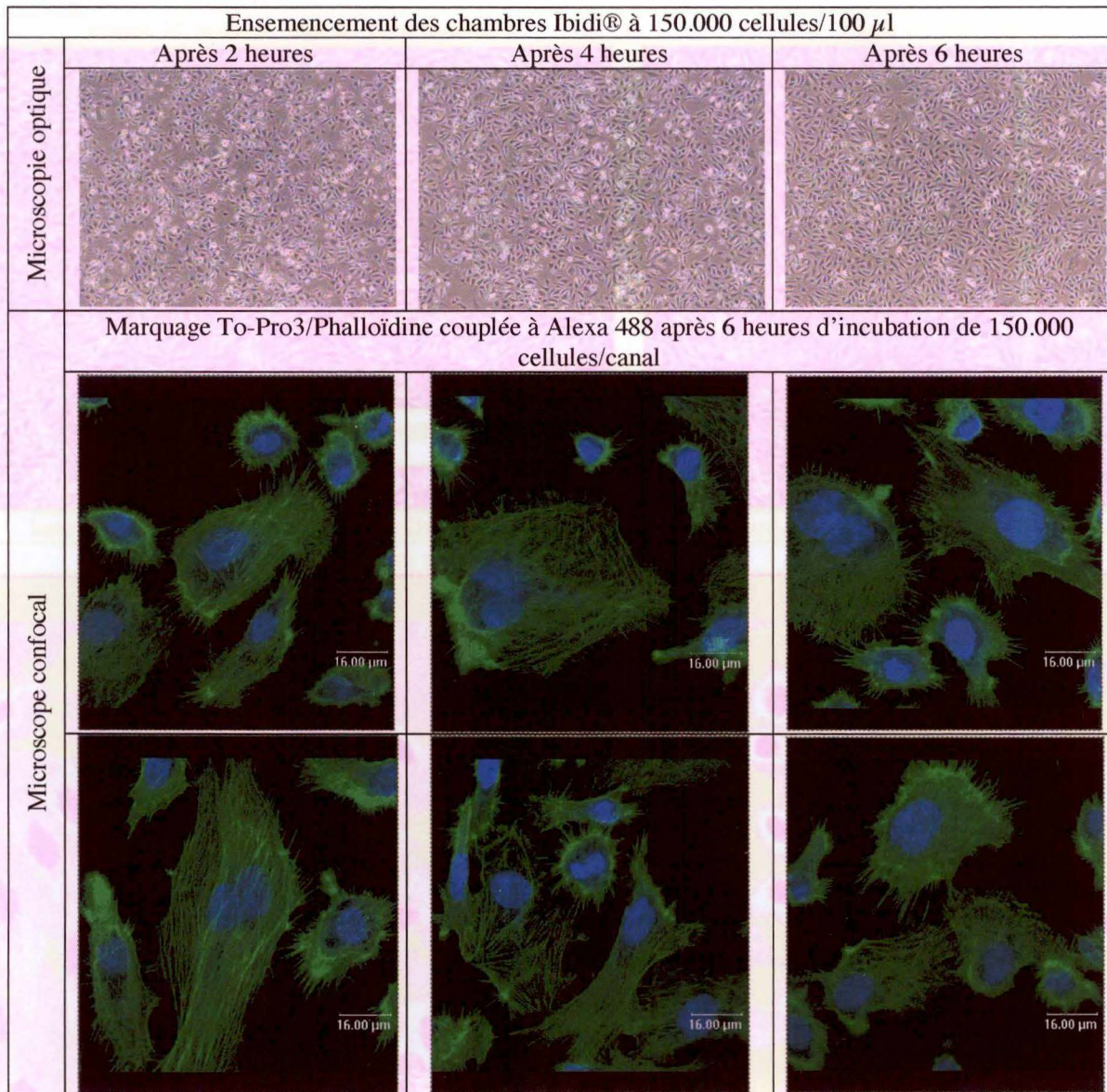


Figure III-11 : Morphologie des cellules EAhy926 ensemencées en chambre Ibidi®. Ensemencement des cellules EAhy926 en chambres Ibidi® à raison de 150.000 cellules par canal. Les cellules ont été incubées durant 6 heures à l'étuve à CO₂ en condition statique. Les cellules ont été visualisées au microscope optique à contraste de phase après 2,4 et 6 heures d'incubation (Objectif 10X). Après 6 heures d'incubation à l'étuve, les cellules ont subi un marquage To-Pro3/Phalloïdine couplée à l'Alexa 488.

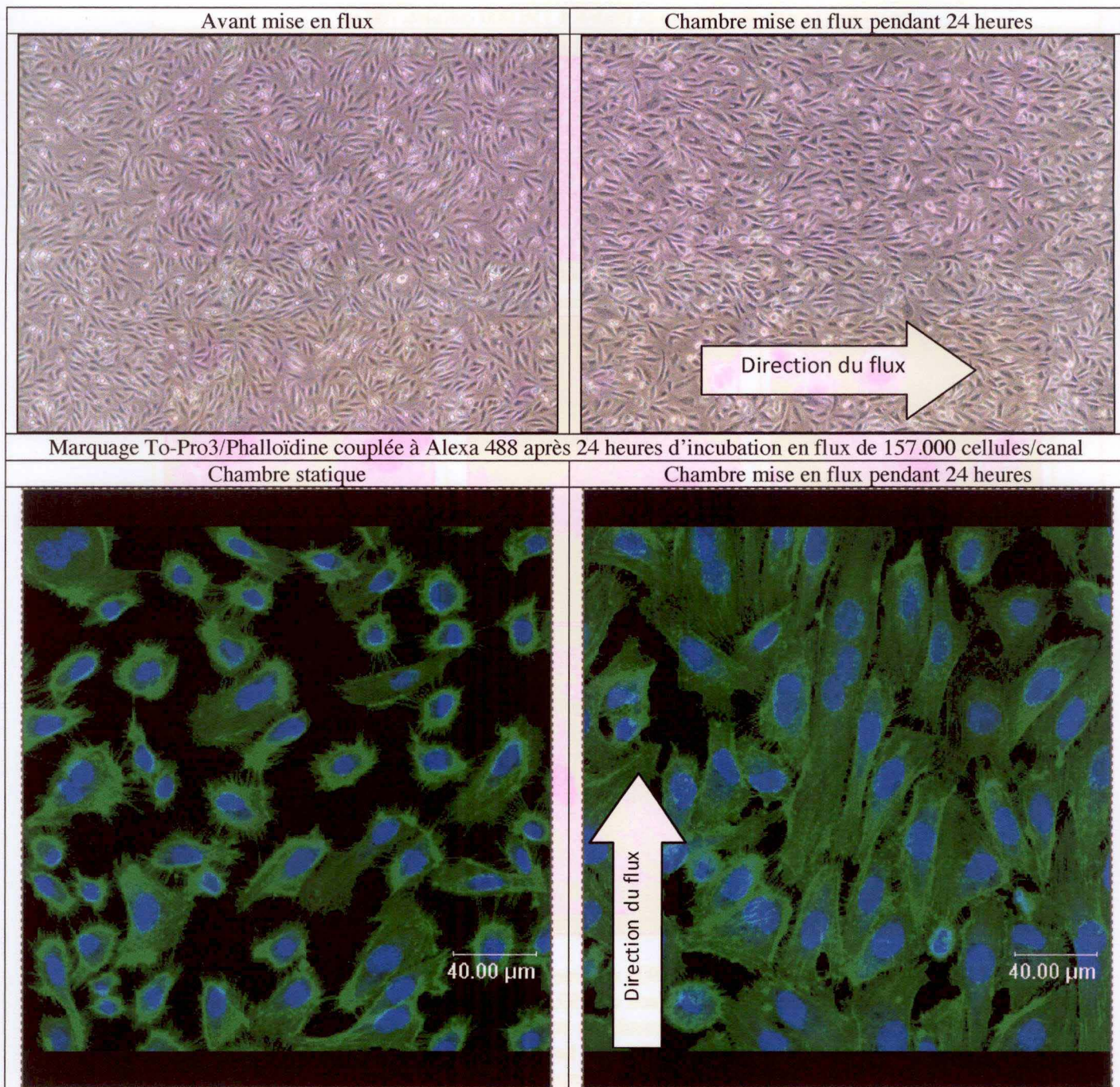


Figure III-12 : Réarrangement des cellules EAhy926 le long des lignes de flux. Les cellules EAhy926 ont étéensemencées à raison de 157.000 cellules/canal, incubées 6 heures dans l'étuve à CO₂ en conditions statiques et enfin mises en flux pendant 24 heures grâce au système décrit dans la section correspondantes des Matériels et Méthodes (figure II-1). La condition contrôle, ou chambre statique, est elle restée pendant ces 24 heures dans l'étuve à CO₂. Le flux appliqué correspond à un « shear stress » physiologique (50 dynes/cm²). Après 24 heures de flux, les cellules ont été visualisées au microscope (Objectif 10X). Les cellules ont ensuite subi un marquage To-Pro3/Phalloïdine couplée à Alexa 488.

LDL natives ou modifiées pendant 2, 4, 6, 8, 12 et 24 heures (figure III-10). La tubuline a été utilisée comme « housekeeping gene » (HKG) pour la normalisation et les opérations mathématiques ont été effectuées grâce à la méthode des $\delta\delta Ct$. L'abondance de l'ARNm d'*ABCA1* pour les conditions NAT, OX et MOX est exprimée par rapport à l'abondance de l'ARNm dans la condition contrôle. Comme montré dans la figure III-10, les LDL natives ou modifiées induisent surexpression d'*ABCA1*. Les LDL natives induisent la plus forte surexpression d'*ABCA1* au cours du temps dans les cellules EAhy926, avec un pic d'abondance localisé entre 10 et 12 heures de stimulation. Les LDL modifiées induisent une surexpression d'*ABCA1* également, mais plus modeste que pour les LDL natives. Avec les OX, on observe une augmentation qui se maintient entre 8 et 24 heures. Avec les MOX, l'augmentation est plus faible et stagne entre 8 et 24 heures. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et doit donc être confirmée.

3.2. Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines en conditions dynamiques : étude de l'effet du « shear stress » et des LDL modifiées sur la voie Nrf2

La deuxième partie du mémoire s'est attelée à la caractérisation de la réponse des cellules EAhy926 à un « shear stress » physiologique additionné ou non d'une stimulation aux LDL natives ou modifiées. Une mise au point de la densité des cellules EAhy926 à utiliser dans les chambres de culture Ibidi® a été nécessaire, mais ne sera pas détaillée dans les résultats.

3.2.1. Effets d'un flux seul sur les cellules EAhy926

3.2.1.1. Etude de la morphologie des cellules EAhy926 en chambres Ibidi®

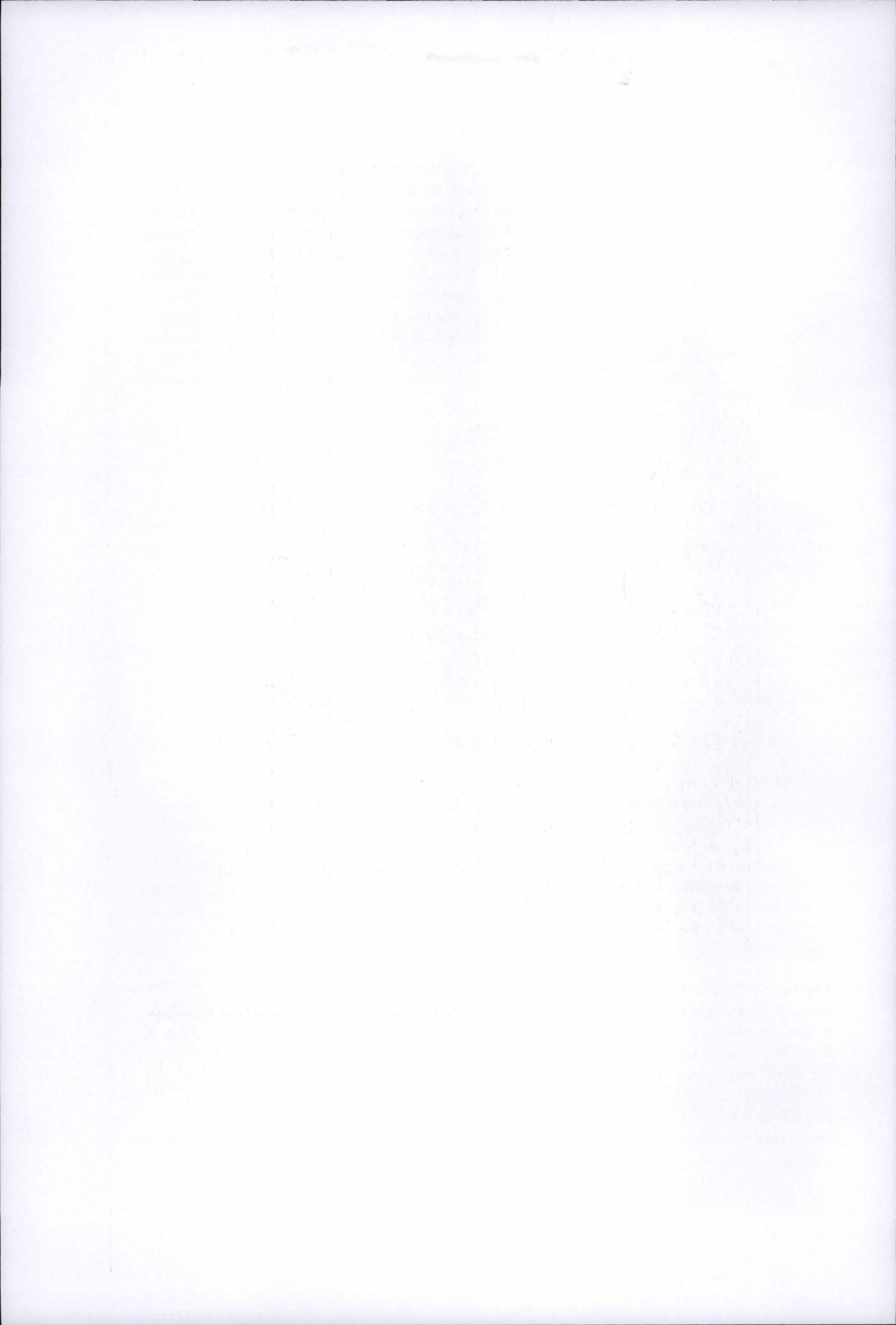
Les cellules EAhy926 sont repiquées en chambre de culture Ibidi® et doivent être incubées avant la mise en flux un certain temps en condition statique à l'étuve à CO₂. Dans un premier temps, une mise au point concernant ce temps d'incubation a été réalisée.

3.2.1.1.1. Evaluation de la morphologie optimale en condition statique avant la mise en flux

150.000 cellules EAhy926 ont étéensemencées dans le canal des chambres de culture Ibidi® et incubées 6 heures à l'étuve à CO₂. Des photos (microscope optique à contraste de phase, objectif 10X) ont été prises à 2, 4 et 6 heures d'incubation (voir figure III-11). A 6 heures, les cellules EAhy926 montrent un étalement optimal. Un marquage en fluorescence a été réalisé avec la sonde To-Pro pour marquer les noyaux et la phalloïdine couplée à un Alexa 488 pour marquer les microfilaments d'actine. Les images obtenues en microscopie confocale montrent un noyau en bleu et les filaments d'actine des cellules EAhy926 en vert. Le réseau d'actine est bien étalé, confirmant les observations obtenues en microscopie optique à contraste de phase.

3.2.1.1.2. Une mise en flux des cellules EAhy926 pendant 24 heures induit un réarrangement des cellules le long des lignes de flux

Puisque le flux est décrit comme un acteur responsable du changement morphologique des cellules endothéliales, nous avons procédé à un repiquage de cellules EAhy926 dans 2 chambres de culture Ibidi® à raison de 157.000 cellules/canal. Les chambres de culture ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant le montage du système décrit dans la section Matériels et Méthodes et la mise en flux. Un flux de 50 dynes/cm² a été appliqué pendant 24 heures sur une chambre de culture Ibidi®, alors que l'autre, servant de contrôle statique, a été incubée pendant ce temps à l'étuve à CO₂. Après les 24 heures d'incubation en flux ou en condition statique, des micrographies au microscope optique à contraste de phase ont été prises (objectif 10X) (figure III-12). En comparant la chambre de culture contrôle avec la chambre de culture mise en flux, nous avons pu observer un réarrangement des cellules



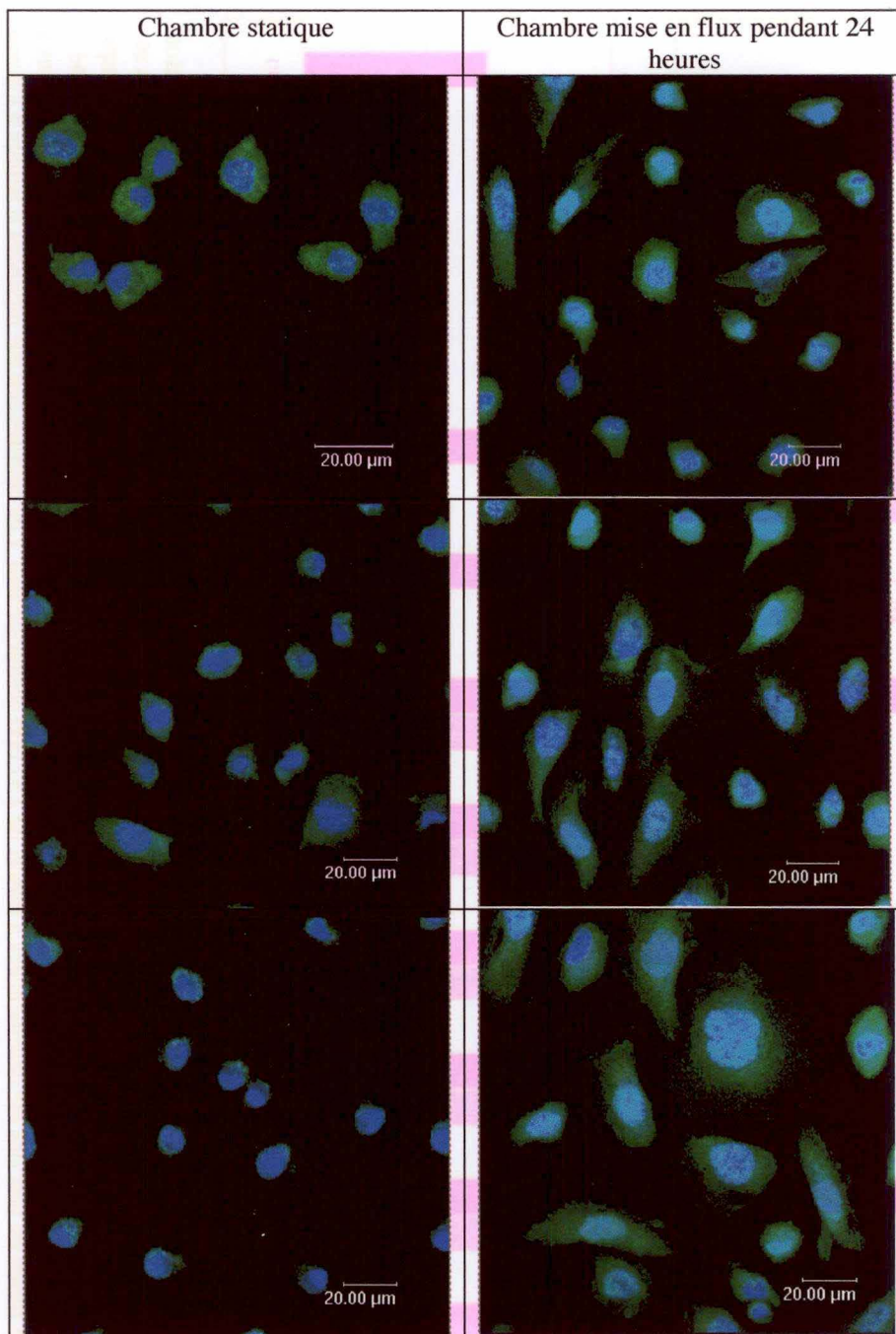


Figure III-13 : Nrf2 est transloqué dans le noyau après stimulation des cellules EAhy926 pendant 24 heures avec un flux physiologique. Immuno-marquage de Nrf2 (anti Nrf2 (H300) & anti-rabbit IgG-Alexa 488) et du noyau (ToPro3) sur des cellules EAhy926 soumises à une mise en flux de 24 heures (50 dynes/cm^2) via le système décrit dans la section correspondantes des Matériels et Méthodes (figure II-1). Les cellules ont étéensemencées à raison de 157.000 cellules/canal. La chambre statique fait office de contrôle et a été incubée 24 heures à l'étuve à CO_2 . Les cellules ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO_2 avant la mise en flux.

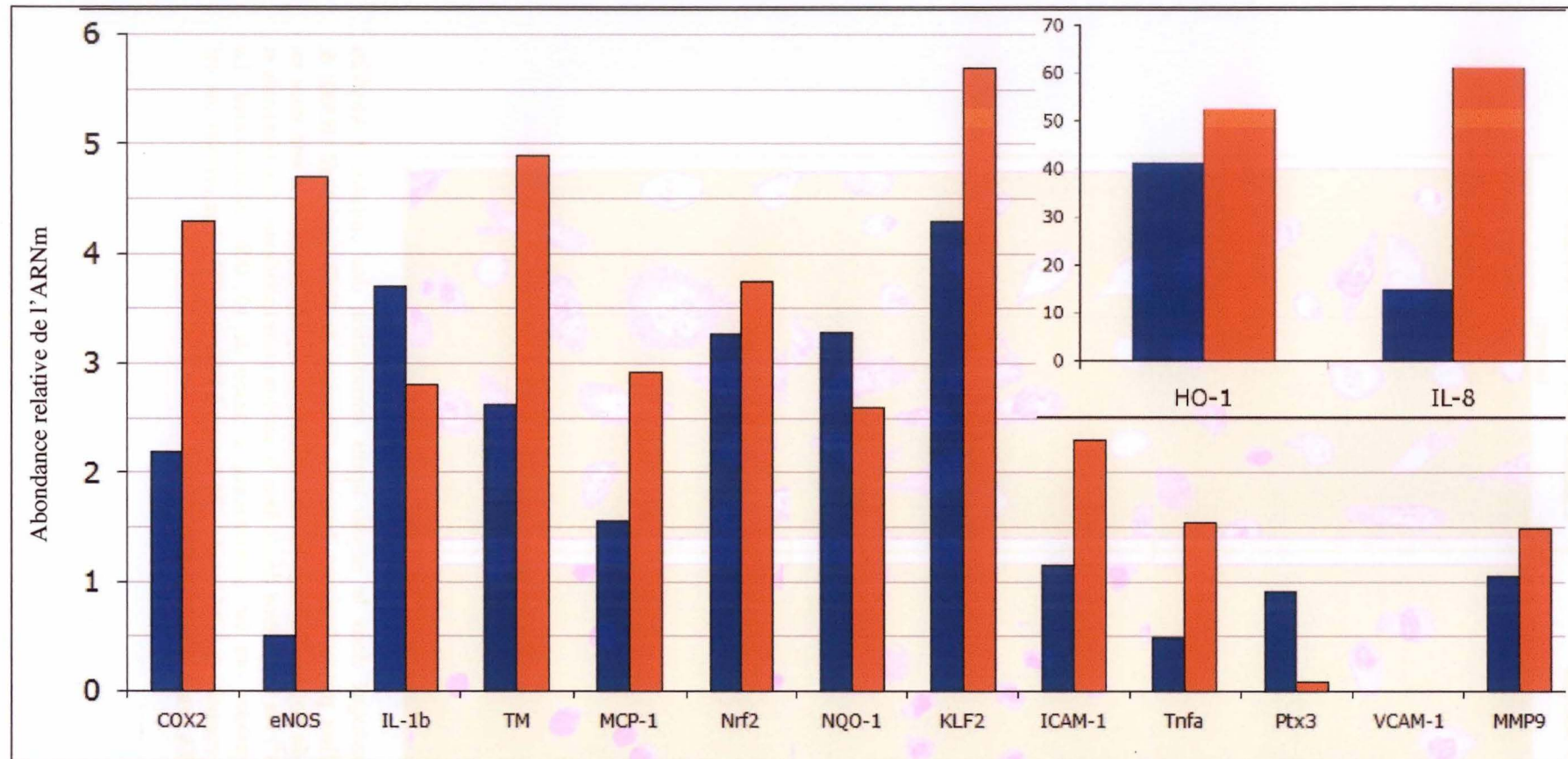


Figure III-14 : Effet d'un « shear stress » physiologique l'expression relative d'une batterie de gènes au niveau ARNm dans les cellules EAhy926. Variation d'abondance relative de l'ARN messager de différents gènes après 24 heures de mise en flux (système décrit dans la section correspondante du Matériels et Méthodes, 50 dynes/cm²) pour deux expériences indépendantes. L'expression relative de ces différents gènes est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, comme décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la GAPDH et toutes les opérations arithmétiques ont été faites en utilisant la méthode des $\delta\delta Ct$. Les résultats sont donnés de manière relative aux cellules contrôles, à savoir une chambre incubée pendant 24 heures à l'étuve à CO₂. Les chambres statiques et mises en flux ont étéensemencées à raison de 157.000 cellules/canal. Les cellules ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant la mise en flux.

EAhy926 selon la direction du flux. Pour confirmer ceci, nous avons ensuite procédé au même marquage To-Pro/Phalloïdine-Alexa488 sur ces 2 chambres de culture. Après observation au microscope confocal, nous avons pu mettre en évidence que le réseau d'actine subissait un réarrangement et s'orientait dans le sens des lignes de flux.

3.2.1.2. Nrf2 est transloqué dans le noyau après stimulation des cellules EAhy926 pendant 24 heures avec un flux physiologique

Puisque le « shear stress » est décrit dans la littérature comme un activateur de la voie Nrf2 (Hsieh, Hsiao *et al.*, 2009), nous avons tenté d'étudier la translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules EAhy926 en réponse à un flux physiologique appliqué pendant 24 heures. Les cellules EAhy926 ont été repiquées dans 2 chambres de culture Ibidi® à raison de 157.000 cellules/canal. Les chambres de culture ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant le montage du système décrit dans la section des Matériels et Méthodes, et la mise en flux. Un flux de 50 dynes/cm² a été appliqué pendant 24 heures sur une chambre de culture Ibidi®, alors que l'autre, servant de contrôle, a été incubée pendant ce temps à l'étuve à CO₂. Après les 24 heures d'incubation en flux ou en condition statique (voir figure III-13), nous avons procédé à un marquage en immuno-fluorescence de Nrf2 (avec un anticorps secondaire couplé à la sonde Alexa 488) et du noyau (avec la sonde To-Pro 3) sur ces 2 chambres de culture. Les observations au microscope confocal montrent chez les cellules contrôle un noyau bleu avec le cytoplasme vert, ce qui indique que Nrf2 est localisé dans le cytoplasme. Lorsque que nous observons les cellules mises en flux pendant 24 heures, le noyau apparaît en turquoise par superposition des deux fluorochromes sur la plupart des cellules, indiquant une translocation nucléaire de Nrf2. Nous pouvons également observer un alignement des cellules le long des lignes de flux.

3.2.1.3. Effet d'un un flux physiologique sur l'expression de gènes dans les cellules EAhy926 exposées pendant 24 heures

Puisque le « shear stress » est décrit dans la littérature comme un acteur capable de moduler l'expression de toute une série de gènes dans les cellules endothéliales, nous avons tenté d'évaluer la quantité relative d'ARNm d'une batterie de gènes. Pour couvrir la physiologie complexe de la cellule endothéliale, nous avons sélectionné des gènes encodant diverses classes fonctionnelles de protéines pertinentes dans un contexte vasculaire et de stress oxydatif et décrites en majeure partie dans l'introduction :

- les protéines d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 impliquées dans la diapédèse
- les cytokines et chémokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF α , IL-8 et MCP-1
- la PTX3, qui fait partie comme le CRP des pentraxines pro-inflammatoires, mais qui contrairement au CRP produit par le foie, est exprimée de manière ubiquiste
- la COX2 et la MMP9, plutôt pro-inflammatoires
- la eNOS anti-athérogène
- les facteurs de transcription Nrf2 (sensible au stress oxydatif et au flux) et KLF2 (sensible au « shear stress »)
- HO-1 et NQO1, dont l'expression est régulée par Nrf2
- la TM, une protéine anti-coagulante

Nous avons évalué les effets de 24 heures de flux sur l'expression de ces gènes (figure III-14). Nous avons procédé à une RT-PCR quantitative en temps réel sur des extraits d'ARN totaux de cellules EAhy926 repiquées dans 2 chambres de cultures Ibidi® à raison de 157.000 cellules/canal. Les 2 chambres ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant la mise en flux. Une chambre a été mise en flux (50 dynes/cm²) pendant 24 heures et l'autre, faisant office de

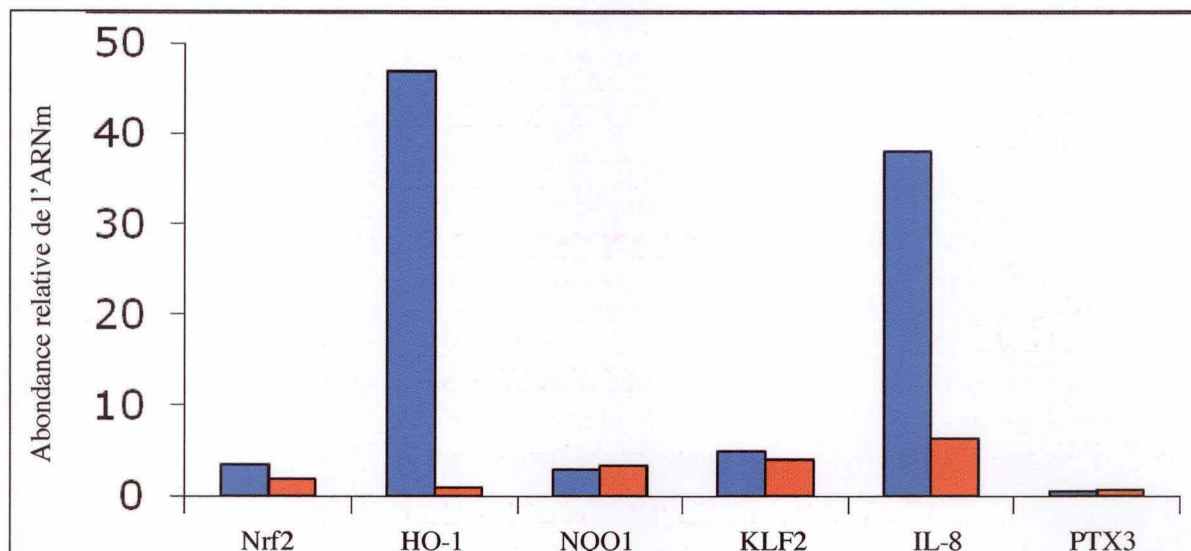
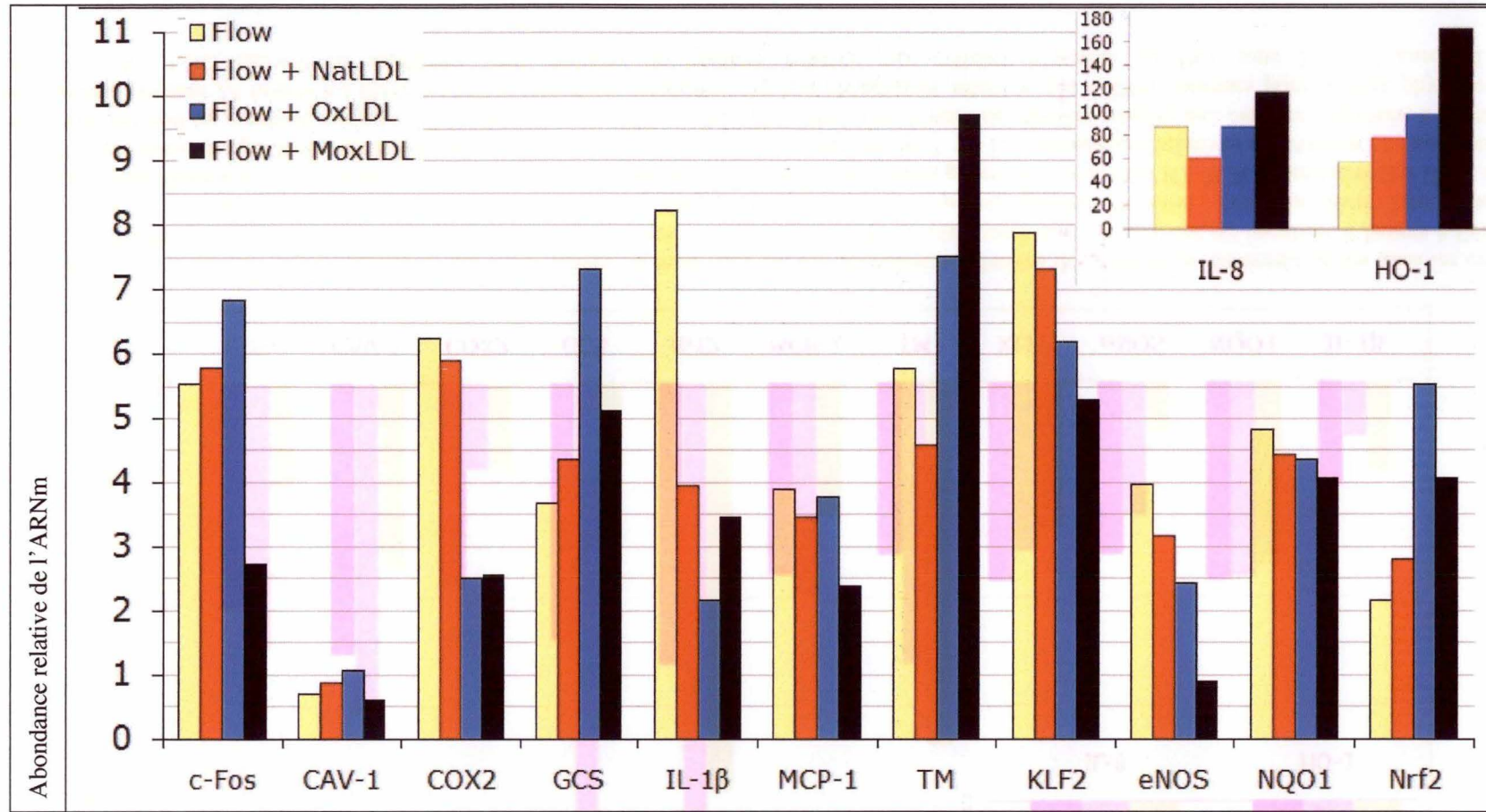


Figure III-15 : Effet d'un « shear stress » physiologique et d'un antioxydant sur les abondances relatives d'ARNm de différents gènes dans les cellules EAhy926. La variation d'abondance relative de l'ARN messenger de différents gènes après 24 heures de mise en flux (système décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes, 50 dynes/cm²) pour deux expériences indépendantes et moyennées (en bleu), est confrontée à la variation d'abondance relative de l'ARN messenger de ces mêmes gènes pour une mise en flux similaire mais avec du Trolox 500 μM (en rouge). L'abondance relative d'ARNm de ces différents gènes est évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel, comme décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la GAPDH et toutes les opérations arithmétiques ont été faites en utilisant la méthode des $\delta\delta C_t$. Les résultats sont donnés de manière relative aux cellules contrôles, à savoir une chambre incubée pendant 24 heures à l'étuve à CO₂. Les chambres statiques et mises en flux ont étéensemencées à raison de 157.000 cellules/canal. Les cellules ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant la mise en flux.

(a)



(b)

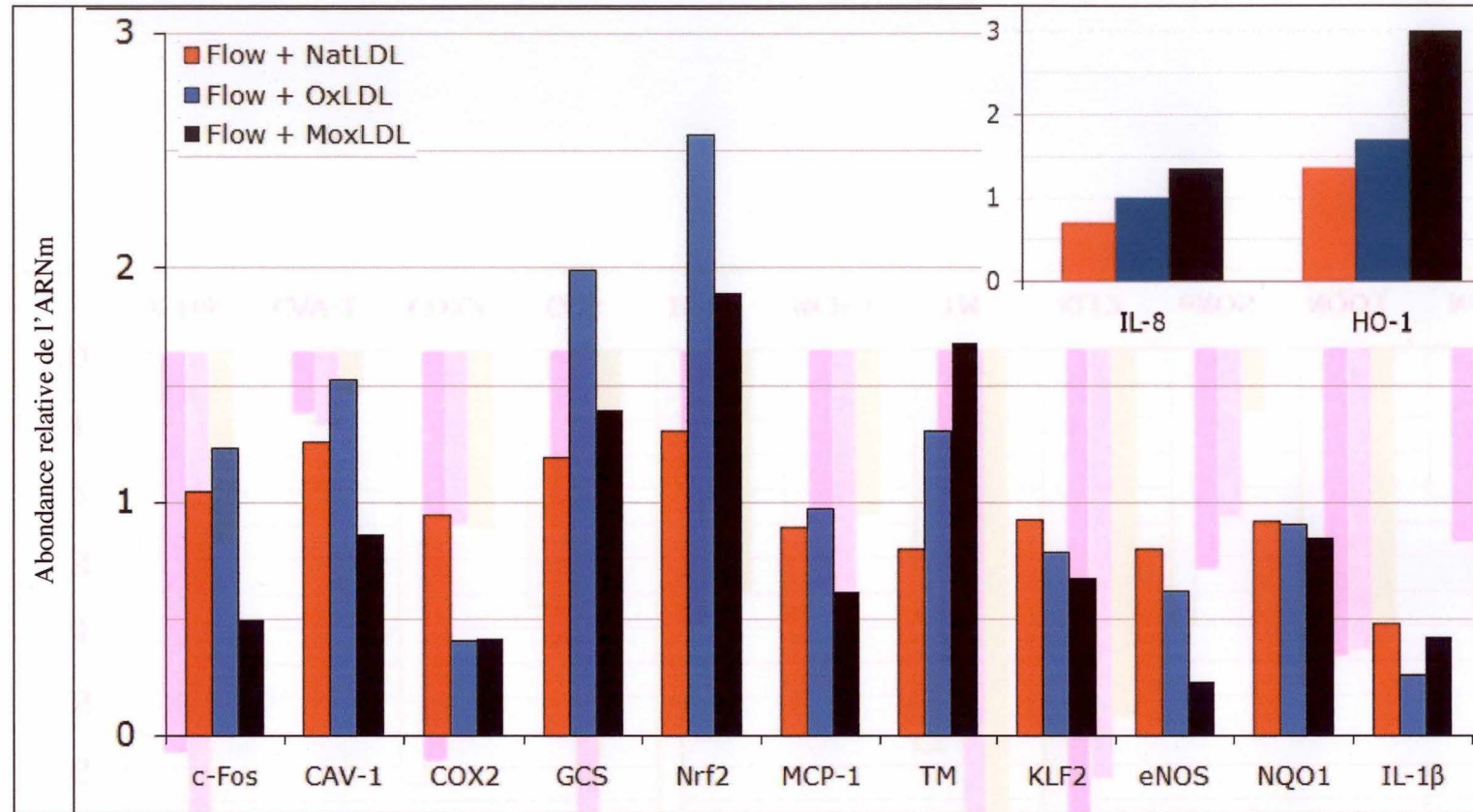


Figure III-16 : Effet d'un flux physiologique et des LDL natives ou modifiées sur les abondances relatives des ARNm de différents gènes dans les cellules EAhy926. Les chambres statiques et mises en flux ont étéensemencées à raison de 160.000 cellules/canal. Les cellules ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂, puis mises en flux pendant 5 heures avant d'ajouter les LDL natives ou modifiées (100 µg/ml) pendant 24 heures (système décrit dans la section correspondantes des Matériels et Méthodes, 50 dynes/cm²). L'expression relative de ces différents gènes est évaluée par RT-PCR quantitative. Le HKG utilisé est la GAPDH et toutes les opérations arithmétiques ont été faites en utilisant la méthode des $\delta\delta Ct$. (a) Les abondances relatives des ARNm obtenues pour un flux physiologique seul ou combiné avec des LDL natives ou modifiées après 24 heures sont données de manière relative aux cellules contrôles, à savoir une chambre incubée pendant 24 heures à l'étuve à CO₂ en conditions statiques. (b) Les abondances relatives des ARNm obtenues pour un flux physiologique combiné avec des LDL natives ou modifiées sont données de manière relative aux cellules exposées au flux sans LDL (Figure III-16a).

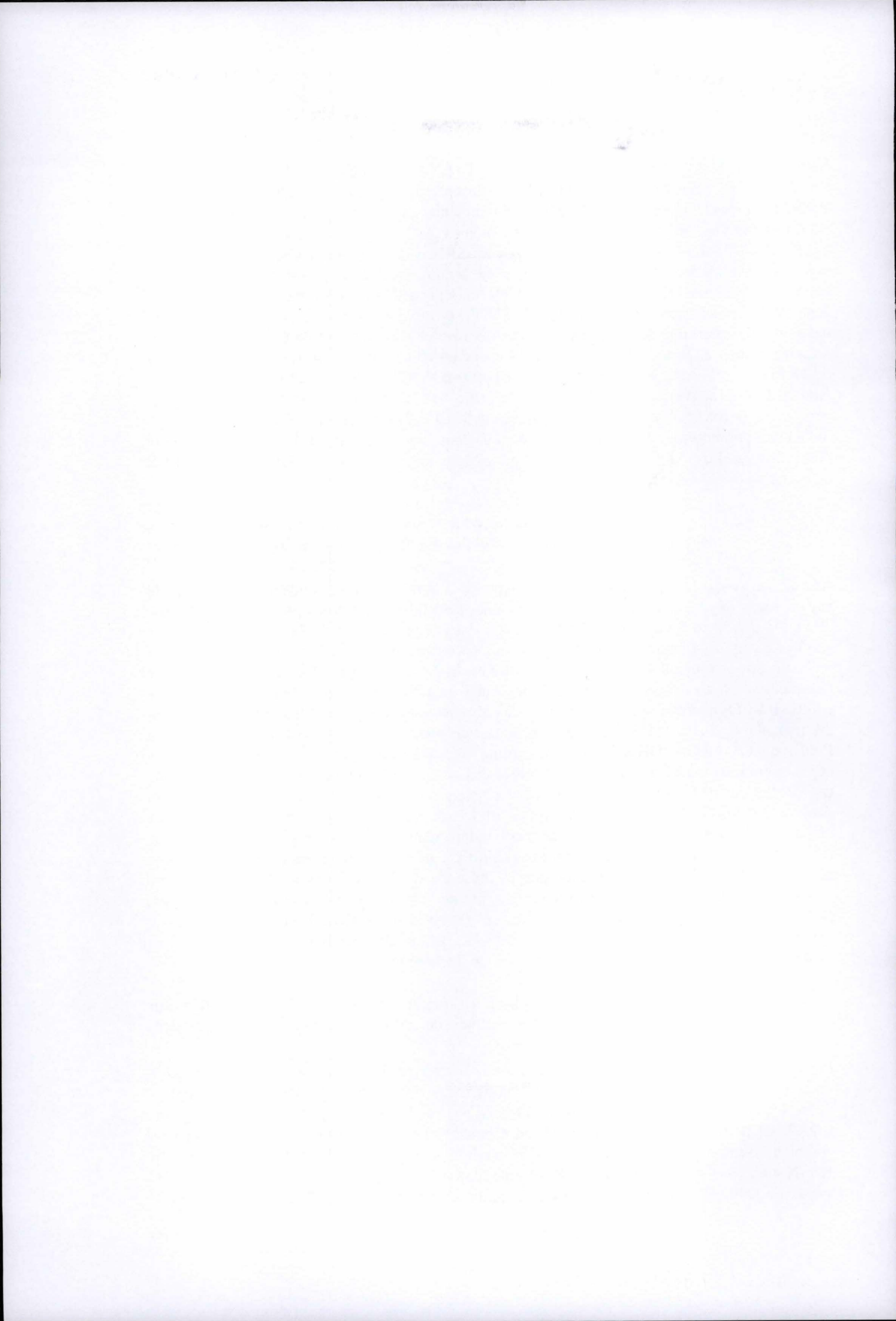
contrôle, est restée 24 heures à l'étuve à CO₂. La GAPDH a été utilisée comme « housekeeping gene » (HKG) pour la normalisation et les opérations mathématiques ont été effectuées grâce à la méthode des $\delta\delta Ct$. L'abondance des ARNm des différents gènes est exprimée par rapport à l'abondance de ces mêmes ARNm dans la condition contrôle. La figure III-14 donne les abondances relatives en ARNm des différents gènes étudiés pour 2 expériences indépendantes. Il existe une cohérence entre les deux expériences indépendantes, puisque les taux relatifs d'abondance des ARNm sont sensiblement les mêmes pour un même gène étudié, mis à part l'ARNm codant la eNOS, puisque nous n'avons observé une légère induction que pour une des deux expériences de mise en flux pendant 24 heures. Deux gènes présentent une très forte induction, les gènes encodant HO-1 (plus de 40 fois pour *ho-1* et plus de 15 fois pour l'*il-8*). L'abondance des ARNm encodant les deux facteurs de transcription Nrf2 et KLF2, augmente aussi de l'ordre de 3 à 5 fois, ainsi que celle des ARNm *NQO1*, gène cible de Nrf2. Enfin, les gènes encodant la COX2, l'IL-1 β et la TM présentent des inductions variant entre 2 et 4 fois. Pour *icam-1*, *mmp9*, *mcp-1*, *tnfa*, *ptx3*, les inductions sont plus faibles. Les ARNm de *vcam-1* n'ont pas été détectés par la méthode de RT-PCR quantitative en temps réel.

3.2.1.4. L'utilisation d'un antioxydant permet de diminuer la surexpression de *Nrf2*, *ho-1* et *il-8* dans les cellules EAhy926 stimulées pendant 24 heures avec un flux physiologique

Afin de vérifier si la réponse des cellules EAhy926 à la mise en flux pendant 24 heures passe par un stress oxydatif, nous avons tenté d'évaluer l'abondance relative d'ARNm de *Nrf2*, *ho-1*, *NQO1*, *KLF2*, *il-8* et *ptx3* produits en réponse à une stimulation de 24 heures de flux des cellules EAhy926 (figure III-15). Nous avons procédé à une RT-PCR quantitative en temps réel sur des extraits d'ARN totaux de cellules EAhy926 repiquées dans 2 chambres de cultures Ibidi® à raison de 157.000 cellules/canal. Les 2 chambres ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant la mise en flux. Une chambre a été mise en flux (50 dynes/cm²) pendant 24 heures avec du Trolox 500 μ M et l'autre, faisant office de contrôle, est restée 24 heures à l'étuve à CO₂. La GAPDH a été utilisée comme « housekeeping gene » pour la normalisation et les opérations mathématiques ont été effectuées grâce à la méthode des $\delta\delta Ct$. L'abondance des ARNm des différents gènes est exprimée par rapport à l'abondance de ces mêmes ARNm dans la condition contrôle. Dans la figure III-15 est représentée l'abondance relative des différents gènes étudiés pour les expériences indépendantes de flux moyennées (voir figure III-14) comparée aux abondances relatives des différents gènes étudiés en présence de flux et de Trolox. Nous pouvons remarquer que la présence de Trolox dans le milieu de culture auquel est exposé la chambre en flux semble diminuer l'abondance relative des ARNm codant Nrf2, HO-1 et l'IL-8 par rapport aux abondances relatives des ARNm de ces gènes pour les 2 expériences en flux moyennées (voir figure III-15). L'abondance relative des ARNm codant NQO1, PTX3 et KLF2 ne semble pas modifiée de manière notable.

3.2.2. Effets combinés d'un flux physiologique et des LDL natives ou modifiées sur les abondances relatives des ARNm de différents gènes dans les cellules EAhy926

Puisque nous savons que les LDL natives et modifiées induisent une variation d'abondance relative des ARNm d'une série de gènes, nous avons tenté d'évaluer l'abondance relative d'ARNm encodant eNOS, HO-1, IL-8, TM, NQO1, Nrf2, KLF2, ABCA1, c-Fos, CAV-1, COX2, GCS, IL-1 β et MCP-1 produits en réponse à une stimulation de 24 heures de flux combinée ou non avec des LDL natives ou modifiées sur des cellules EAhy926 (figure III-16). Nous avons procédé à une RT-PCR quantitative en temps réel sur des extraits d'ARN totaux de cellules EAhy926 repiquées en chambres de cultures Ibidi® à raison de 160.000



cellules/canal. Les chambres ont été incubées 6 heures à l'étuve à CO₂ avant la mise en flux. Une mise en flux (50 dynes/cm²) de 5 heures sans LDL précède les mises en flux (50 dynes/cm²) pendant 24 heures avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées. La GAPDH a été utilisée comme « housekeeping gene » pour la normalisation et les opérations mathématiques ont été effectuées grâce à la méthode des $\delta\delta\text{Ct}$. L'abondance des ARNm des différents gènes est exprimée par rapport à l'abondance de ces mêmes ARNm dans la condition contrôle (figure III-16a), à savoir les conditions statiques sans LDL moyennées (voir figure III-14). Nous avons également exprimé les résultats obtenus pour les cellules EAhy926 exposées à la fois aux LDL et au flux par rapport au flux seul (figure III-16b) pour mieux estimer l'effet des LDL natives ou modifiées sur le flux.

Trois types de réponses se dégagent de la figure III-16. Dans un premier temps, les LDL peuvent renforcer l'effet du flux, avec des effets variables entre OX et MOX. Ensuite, les LDL peuvent également contrecarrer l'induction par le « shear stress ». Enfin, il est possible de dire qu'en général, les LDL natives n'ont pas ou peu d'effets.

La présence de LDL modifiées renforce l'effet du flux, et pour *ho-1*, *tm*, *il-8*, l'effet est le plus marqué pour les MOX. Il est nécessaire à ce stade de rappeler qu'en conditions statiques, HO-1 était plus induit par les OX que par les MOX (figure III-7). En ce qui concerne la *gcs*, ce sont également les MOX qui ont l'effet le plus marqué sur son induction. Les LDL peuvent également contrecarrer l'induction par le « shear stress », et ceci concerne *il-1 β* , *enos*, *KLF2* (tous les LDL ont un effet), *cox2* (seules les LDL modifiées ont un effet) et *c-fos* et *mcp-1*, sur lesquels seuls les MOX ont un effet. Enfin, Les LDL natives influencent peu les variations d'expression génique induites par le flux, sauf dans le cas de *il-1 β* .

4. Discussion

4. Discussion

4.1. Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 aux LDL modifiées en conditions statiques: implication du facteur de transcription Nrf2

4.1.1. Caractérisation primaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL natives et modifiées

Les premières manipulations qui ont été effectuées ont eu pour but de caractériser notre modèle et de valider sa robustesse. Dans un premier temps, nous avons vérifié par migration électrophorétique si le processus d'oxydation au cuivre ou à la myéloperoxydase des LDL générerait bien des fractions de LDL différentes. Le processus d'oxydation des LDL aux ions Cu^{2+} se déroule en premier sur la fraction lipidique des LDL, son étendue dépendant du ratio entre la concentration en LDL et la concentration en oxydant (le sulfate de cuivre) (Zarev, Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003). A terme, l'oxydation lipidique génère suffisamment d'oxydants pour aller modifier la fraction protéique, à savoir l'ApoB-100. Les produits d'oxydation sont principalement des cholestéryl-esters, hydroxystérols et des hydroperoxydes de phosphatidylcholine pour une oxydation lipidique, et une ApoB-100 carbonylée pour une oxydation sur la fraction protéique (Burkitt, 2001; Zarev, Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003). Le modèle d'oxydation au cuivre est souvent cité comme un processus non physiologique, même si elle est efficace (Esterbauer, Gebicki *et al.*, 1992). Nous avons également procédé à une oxydation des LDL par la myéloperoxydase (MPO), enzyme candidate pertinente par rapport à l'oxydation des LDL *in vivo*, contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles et décrite comme étant présente au niveau des lésions athéromateuses (Zhang, Brennan *et al.*, 2001). Le processus d'oxydation à la MPO mène principalement à la modification de l'ApoB-100 et à la formation de chlorotyrosines, dityrosines et nitrotyrosines. La fraction lipidique peut également être touchée, mais principalement à pH plus acide et en présence d'hydroperoxydes préformés (Spickett, Jerlich *et al.*, 2000; Heinecke, 2003). Les MOX sont considérées comme des éliciteurs potentiels au processus inflammatoire dans l'athérosclérose (Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006). La différence de nature du processus d'oxydation et des charges électriques portées par les LDL modifiées permet d'expliquer la variation qui existe au niveau de la vitesse de migration de ces dernières par rapport aux LDL natives, comme montré dans la figure III-1. Des résultats similaires ont été obtenus par Damien Calay au cours de sa thèse de doctorat : les LDL modifiées migrent plus rapidement que les LDL natives, et les MOX migrent elles-même plus rapidement que les OX, cette propriété étant utilisée comme moyen de vérifier si le processus d'oxydation a bien eu lieu.

Nous avons utilisé ces fractions de LDL natives ou modifiées pour stimuler une lignée de cellules endothéliales humaines. Ces dernières sont issues d'HUVECs et d'A549 (voir la section correspondante dans les Matériels et Méthodes) et font l'objet de nombreux travaux en tant que modèle de cellules endothéliales humaines dans la littérature. Elles seront utilisées tout au long de ce mémoire. Afin d'évaluer si les LDL étaient cytotoxiques et délétères pour cette lignée cellulaire, nous avons procédé à une mesure de l'activité de la lactate deshydrogénase dans le surnageant de culture de cellules EAhy926 stimulées avec des LDL natives ou modifiées à 100 $\mu\text{g/ml}$. Dans la figure III-2, nous avons montré que ni les LDL natives, ni les LDL modifiées n'avaient d'effets cytotoxiques sur les cellules EAhy926 à cette concentration, qui sera utilisée tout au long de ce travail.

Ensuite, nous avons tenté d'évaluer si les cellules EAhy926 sont capables, à la manière des macrophages, d'internaliser par endocytose et d'accumuler les LDL. Les macrophages sont

connus pour exprimer une série de récepteurs aux LDL oxydées ou acétylées et aux acides gras. Ces récepteurs, les récepteurs « scavenger » permettent la différenciation des macrophages en cellules spumeuses (Itabe, 2003; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007). Le SR-A et le CD36 sont les plus classiquement décrits comme récepteurs des LDL oxydées ou acétylées intervenant dans le processus de différenciation des macrophages dans la lésion athéromateuse. De plus, ces récepteurs « scavenger » sont connus pour médier l'accumulation lipidique *in vitro*. A la manière des macrophages, les cellules endothéliales expriment certains récepteurs « scavenger », qui pourraient éventuellement intervenir dans l'internalisation des LDL nous servant de condition de stimulation sur les cellules EAhy926. Même si les récepteurs aux LDL oxydées à la myéloperoxydase ne sont pas encore décrits définitivement, et ce autant pour les macrophages que pour les cellules endothéliales, ces dernières expriment les récepteurs LOX-1 (Sawamura, Kume *et al.*, 1997), SREC (de type II et II) et CL-P1, tous décrits comme récepteurs aux LDL oxydées (Itabe, 2003; Adachi et Tsujimoto, 2006; Pluddemann, Neyen *et al.*, 2007). Sachant ceci, nous avons évalué une éventuelle accumulation intracellulaire des LDL par les cellules EAhy926 (voir figure III-3) par une coloration à l'Oil Red O dirigée contre les lipides neutres. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une accumulation des LDL dans les cellules EAhy926 pour une stimulation de ces dernières pendant 48 heures avec des LDL natives et oxydées au cuivre, ni par une approche quantitative (figure III-3a), ni par une analyse morphologique des cellules au microscope optique à contraste de phase (figure III-3b). Cette manipulation a été répétée un certain nombre de fois et à des temps de stimulation différents (données non montrées), sans réussir à mettre en évidence une accumulation des LDL statistiquement significative, ceci étant dû à une variabilité trop grande entre les réplicats d'une même expérience. En ce qui concerne la stimulation avec les LDL modifiées à la MPO, nous avons pu observer après 48 heures d'incubation la présence d'un certain nombre de petits spots rouges sur ou dans les cellules EAhy926 (figure III-3b). Cependant, l'analyse quantitative du colorant donne une différence statistiquement non significative. On ne peut donc pas exclure que les taches rouges observées soient des MOX adsorbées à la surface des cellules. Afin de confirmer si les LDL sont bien internalisées, nous pourrions procéder à un immuno-marquage avec des anticorps ciblant la fraction protéique des MOX, à savoir l'ApoB-100. Les anticorps anti-ApoB-100 étant disponibles dans le commerce, il serait utile de suivre la distribution de cette protéine dans les cellules EAhy926 stimulées au LDL natives et modifiées au cours du temps.

Les conclusions de nos expériences préliminaires sont que les LDL n'exercent pas d'effets cytotoxiques sur les cellules endothéliales. Les LDL ne s'accumulent apparemment pas puisque nous n'observons pas de gouttelettes lipidiques comparables à celles visualisées dans les macrophages murins utilisés au cours de la thèse de Damien Calay. Cependant, ces observations n'excluent absolument pas que des interactions entre les récepteurs « scavenger » endothéliaux et les LDL modifiées puissent se dérouler, menant à une réponse cellulaire.

4.1.2. Caractérisation secondaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL : Activation de la voie Nrf2

Après nos conclusions préliminaires, nous avons focalisé notre attention sur une éventuelle activation de la voie Nrf2 dans les cellules EAhy926 en réponse à une stimulation aux LDL natives ou modifiées. Nrf2 est décrit comme un facteur de transcription notamment activé et relocalisé dans le noyau cellulaire suite à un stress oxydatif, comme la présence d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ROS) (pour une revue, voir (Niture, Kaspar *et al.*, 2009)). Afin d'évaluer si, à la manière de ce qui est observé chez les macrophages murins (Damien Calay, manuscrit en révision), une stimulation avec des LDL modifiées est capable de générer

des ROS dans les cellules EAhy926, ROS éventuellement capables de manière subséquente d'activer la voie Nrf2, nous avons procédé à une mesure de production de ROS dans les cellules EAhy926 après plusieurs temps de stimulation avec des LDL natives et modifiées (données non montrées). Comme montré dans la figure III-4, nous avons pu observer qu'après 30 minutes de stimulation des cellules EAhy926, les LDL modifiées étaient capables de générer un stress oxydatif. Les MOX sont les plus efficaces, puisqu'elles sont capables de générer une fluorescence 25 fois plus élevée que celle mesurée dans les cellules contrôles. Nous pouvions donc supposer que les LDL modifiées à la MPO seront également les plus efficaces en ce qui concerne l'activation subséquente de la voie Nrf2, à la manière de ce qui a déjà été montré dans les macrophages murins (Damien Calay, manuscrit en révision) ou dans les cellules endothéliales et les VSMCs (Mann, Niehueser-Saran *et al.*, 2007). De manière surprenante, ceci ne semble pas évident dans le cas des cellules EAhy926. Comme montré dans la figure III-5, par une expérience en Trans-AM, nous avons évalué le taux de liaison de Nrf2 à sa séquence consensus ARE. Nous avons pu montrer que les LDL modifiées étaient capables d'augmenter l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 lorsque que nous stimulons les cellules EAhy926 avec les LDL modifiées au cuivre. Une incubation avec les LDL modifiées à la MPO est également responsable d'une augmentation du taux de liaison à l'ADN de Nrf2, ceci commençant déjà dès 30 minutes de stimulation et étant statistiquement différent de l'induction causée par les OX. Nous n'observons donc pas une corrélation directe entre l'intensité du stress oxydatif (production de ROS à la figure III-4) et l'augmentation de l'activité de liaison de Nrf2 à l'ADN (figure III-5) chez les cellules endothéliales.

Nous avons ensuite évalué l'activité transactivatrice de Nrf2 dans les cellules EAhy926 stimulées avec des LDL natives et modifiées. Une première expérience, utilisant un système rapporteur en dual luciférase (figure III-6a) nous a permis de mettre en évidence une activité transactivatrice de Nrf2 augmentée lors d'une stimulation des cellules EAhy926 avec des LDL modifiées par rapport aux cellules contrôles. Les LDL natives n'ont pas d'effets. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence statistiquement significative entre la stimulation par les OX et les MOX. Nous avons également procédé à la même manipulation, mais en utilisant cette fois un système rapporteur en luciférase simple (figure III-6b). De la même manière, ce sont les LDL modifiées qui présentent un effet significatif sur l'activité transactivatrice de Nrf2 par rapport aux cellules contrôles, contrairement aux LDL natives. Nous n'avons également pas pu mettre en évidence une différence significative entre les conditions OX et MOX, ce qui est conforme aux données sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2. Dans la figure III-6b, nous pouvons également remarquer que l'utilisation d'un antioxydant, à savoir le Trolox, empêche les effets d'une stimulation aux LDL natives ou modifiées sur la transactivation de Nrf2. En effet, le Trolox, composé soluble dérivé de la vitamine E, est connu pour son activité « scavenger » de ROS. On peut donc supposer que la présence de Trolox empêche les modifications rédox de KEAP-1 et donc sa séparation avec Nrf2 induite par la présence de ROS. Le Trolox inhiberait de ce fait la translocation nucléaire de Nrf2 et sa liaison à l'ADN, et a fortiori sa transactivation. Signalons cependant que les effets du Trolox sont également drastiques pour les cellules non stimulées ou celles incubées en présence de LDL natives, ce qui est étonnant au vu des données obtenues dans des manipulations préliminaires (données non montrées) et par Damien Calay au cours de sa thèse. Il faudra donc tester des concentrations plus faibles en Trolox ou un autre antioxydant et s'assurer qu'il n'y ait pas d'éventuelles interactions du Trolox avec le système expérimental utilisé. Nous avons également utilisé le Trolox sur l'expression génique, mais en conditions de flux (figure III-15), avec des effets variables selon les gènes étudiés, ce qui semble exclure des interférences artéfactuelles.

Dans le modèle de macrophages murins utilisé par Damien Calay au cours de sa thèse de doctorat, lorsque les cellules sont stimulées avec les LDL natives et modifiées, on observe une différence statistique entre l'activité transactivatrice de Nrf2 générée par une stimulation aux OX et MOX. Cette dernière observation est en accord avec ce qui est observé en amont de la voie Nrf2. Alors que les OX et MOX génèrent une production de ROS différentielle qui est cohérente avec les taux d'activation de la voie Nrf2 en aval chez les macrophages murins, ceci n'est pas observé dans les cellules endothéliales EAhy926. Comme montré dans les figures III-4, III-6a et III-6b, on constate une certaine discordance entre les effets des LDL modifiées sur la production de ROS et sur l'activation de Nrf2. Nous n'avons toutefois pas pu, à l'heure actuelle, expliquer cette différence majeure et nous ne pouvons proposer que des hypothèses. Tout d'abord les macrophages et cellules endothéliales n'expriment pas les mêmes combinaisons de récepteurs « scavengers », on peut imaginer que les cascades de signalisation en réponse aux LDL modifiées divergent, modulant de manière différente l'activation de Nrf2. Par exemple, les phosphatases, sensibles au stress oxydatif, pourraient s'inactiver plus rapidement dans les macrophages, ce qui renforcerait l'action de kinases en amont de Nrf2 et expliquerait la « suractivation » de Nrf2 avec les MOX en macrophages. Une autre piste de réponse pourrait être liée à la complexité des interactions qui existent entre la voie Nrf2 et les différentes kinases en amont de son activation, et la voie NFκB : NFκB est également activé par la production de ROS (Bubici, Papa *et al.*, 2006). Enfin, des données suggèrent une compartimentalisation de la signalisation redox par les cavéoles et radeaux lipidiques, qui pourraient encore une fois diverger selon les types cellulaires (Patel et Insel, 2009).

Après avoir évalué l'activité de liaison à l'ADN et l'activité transactivatrice de Nrf2, nous avons évalué par RT-PCR quantitative en temps réel les effets des LDL natives et modifiées sur un gène cible de Nrf2, à savoir l'hème oxygénase-1 au cours du temps. Dans la figure III-7, nous avons pu mettre en évidence que les LDL modifiées induisent une surexpression d'*ho-1* au cours du temps avec un pic d'induction localisé entre 8 et 10 heures. Les LDL natives n'ont pas d'effet sur l'induction d'*ho-1*; ceci est en accord avec les observations précédentes et a été confirmé par analyses en Western Blot (figure III-8a et III-8b) : l'ARNm d'*ho-1* voit son abondance augmenter à 8 heures, avec un maximum à 12 heures de stimulation avec les LDL modifiées, les LDL natives n'ayant pas d'effets. Cependant, de manière remarquable, ce sont les OX qui sont responsables de la plus forte induction d'*ho-1* à un niveau ARNm, avec un effet plus modéré des MOX. Encore une fois la différence observée ici n'est explicable ni par les mesures de production de ROS (figure III-4), ni par les niveaux d'activation de Nrf2 dans ces mêmes conditions (figure III-5, III-6a et III-6b). De plus, dans le modèle utilisé par Damien Calay au cours de sa thèse de doctorat, ce sont au contraire les MOX qui avaient le plus d'effet sur l'induction d'*ho-1* (article en révision). Cela suggère que les stress engendrés par les LDL modifiées sont sans doute plus complexes que prévus et qu'ils peuvent déclencher des cascades de signalisation différentes d'un type cellulaire à l'autre, et ce d'autant plus que les récepteurs « scavenger » divergent. Par ailleurs, la régulation d'*ho-1* est complexe et ne dépend pas uniquement de Nrf2, mais aussi de sites liant d'autres facteurs de transcription dont NFκB et AP-1, également rédox-sensibles. Encore une fois, on peut donc penser que d'un type cellulaire à l'autre, un même stimulus puisse aboutir à des inductions différentes.

4.1.2.1. Caractérisation secondaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL : Surexpression de cytokines pro-inflammatoires

Comme suggéré à de nombreuses reprises au cours de ce mémoire, les LDL oxydées à la myéloperoxydase deviennent de plus en plus le sujet de nombreuses études, puisque ce modèle d'oxydation des LDL semble plus proche de ce qui se passe réellement *in vivo*. Boudjeltia *et al* (Boudjeltia, Legssyer *et al.*, 2006) ont montré qu'une stimulation de 48 heures des cellules EAhy926 induisait une augmentation (1.5 et 2 fois) de l'abondance relative de l'ARNm pour l'*il-8* à, respectivement, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de LDL. Cette équipe a conclu que les MOX induisaient la libération de cytokines par les cellules endothéliales et pouvaient donc, en déclenchant la réponse inflammatoire locale et systémique, constituer une composante favorisant l'athérogenèse. Nous avons pu mettre en évidence, dans la figure III-9, une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de l'*il-8* d'un facteur 4 par rapport aux cellules contrôles, lorsque nous procédions à une incubation de 6 heures avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de MOX. Les OX ont aussi un effet sur l'augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de l'*il-8*. L'*IL-8*, cytokine NF κ B-dépendante, est donc induite par la présence de LDL modifiées. Ceci pourrait notamment s'expliquer par le fait que les ROS générés par ces LDL modifiées dans les cellules EAhy926 ont également un effet sur l'activation de la voie NF κ B. Afin d'évaluer le pic d'abondance de l'ARNm de l'*il-8*, nous devrions procéder à une cinétique de stimulation semblable à celle utilisée dans la figure III-7 et tester des inhibiteurs de NF κ B tel que l'évodiamine.

Nous avons également évalué l'abondance relative de l'ARNm de la pentraxine-3, une autre cytokine pro-inflammatoire, après 6 heures de stimulation des cellules EAhy926 avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives et modifiées. Seules les OX ont un effet sur la surexpression de la pentraxine-3. En 2007, Gustin *et al* (Gustin, Delaive *et al.*, 2008) ont montré que le LPA (acide lysophosphatidique), l'un des lipides bio-actifs présents sur les OX, induit la surexpression de la pentraxine-3 par les cellules EAhy926. Le LPA a d'abord été décrit comme un facteur de croissance, puis comme un facteur pro-athérogène, s'accumulant notamment dans les lésions athéromateuses (Siess, Zangl *et al.*, 1999). Après 6 heures d'incubation avec du LPA à 25 μM ou des OX à 100 $\mu\text{g/ml}$, Gustin *et al* ont obtenu une augmentation d'abondance de l'ARNm de la pentraxine-3 de 1.5 fois dans les cellules EAhy926. Nous avons obtenu un résultat similaire en utilisant les mêmes conditions expérimentales. L'induction de la pentraxine-3 est probablement dûe à la composante LPA des OX. De plus, sachant que les MOX sont principalement oxydées sur l'ApoB-100, la composante LPA est probablement inexistante ou réduite, ceci expliquant pourquoi les LDL MOX n'ont pas d'effets sur la surexpression de la pentraxine-3.

4.1.2.2. Caractérisation secondaire de la réponse des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL : Effets sur l'expression du transporteur ABCA1

Nous avons enfin focalisé notre attention sur un gène apparemment régulé par la présence de LDL, à savoir l'*ABCA1*. ABCA1, ou ATP-binding cassette transporter-1 intervient dans l'efflux du cholestérol des cellules vers les HDL, agissant comme une « flippase » lipidique (Yokoyama, 2006). Une étude a montré en 2002 qu'il existait une activation transcriptionnelle de *ABCA1* en réponse à une stimulation de cellules endothéliales (HUVECs) par des LDL natives, avec un effet dose dépendant et avec un pic d'abondance observé entre 10 et 12 heures (Liao, Langmann *et al.*, 2002). Nous avons pu mettre en évidence la même conclusion en utilisant des cellules EAhy926 stimulées avec des LDL natives et modifiées au cours du temps (figure III-10). En utilisant 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives, nous avons pu montrer une surexpression d'*ABCA1* avec un maximum entre 10 et 12 heures. Nous avons également pu mettre en évidence que les OX et MOX induisaient une surexpression d'*ABCA1*, plus modeste

pour les LDL MOX. Le pic d'abondance est observé plus tardivement lorsque l'on stimule les cellules EAhy926 avec les LDL modifiées. Il a été montré (Li, Bi *et al.*, 2005), sur des macrophages murins, que les OX ou même acétylées avaient un effet différent que les LDL natives sur la surexpression d'*ABCA1*, et pouvaient éventuellement intervenir dans la diminution de l'efflux de cholestérol.

4.2. Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines en conditions dynamiques : étude de l'effet du « shear stress » et des LDL modifiées sur la voie Nrf2

4.2.1. Effets d'un « shear stress » seul sur les cellules EAhy926

La deuxième partie de ce mémoire s'est attelée à investiguer outre les LDL une composante de la pathologie de plus en plus décrite, à savoir le « shear stress ». Le « shear stress » endothélial (ou ESS) peut notamment moduler l'invasion monocyttaire ou la perméabilité endothéliale. Considérées à la fois comme pro-athérogènes ou protectrices, en fonction de leur amplitude et de leur direction, ces forces de cisaillement sur l'endothélium requièrent un système particulier pour son étude. Il nous a fallu concevoir un circuit fermé et stérile adapté aux chambres de cultures cellules Ibidi® et déterminer quel débit appliquer afin de rester dans les valeurs décrites d'un « shear stress » protecteur. Nous avons travaillé à 50 dynes/cm² (ce qui correspond à 40 ml/minutes dans notre système), valeur médiane de celles décrites comme étant protectrices (Malek, Alper *et al.*, 1999; Chatzizisis, Coskun *et al.*, 2007). Nous avons ainsi tenté de modéliser *in vitro* dans des chambres de flux les conditions dynamiques que les cellules endothéliales rencontrent *in vivo*. Ceci s'inscrit aussi dans le cadre de notre étude du facteur de transcription Nrf2, puisqu'un « shear stress » endothélial est connu depuis peu pour avoir des effets sur l'activité de Nrf2, et ce par la production de ROS entre autres (Hsieh, Hsiao *et al.*, 2009).

Dans un premier temps, nous avons tenté d'évaluer les effets de la mise en flux seule sur les cellules EAy926. Cet aspect a nécessité de nombreuses mises au point (données non montrées) concernant la densité cellulaire avec laquelle travailler (150.000 cellules par canal, optimum placé à 160.000 cellules par canal, contre 50.000 cellules/canal préconisées par la firme), ainsi qu'au niveau de l'optimum d'étalement cellulaire. Dans la figure III-11, nous avons montré qu'en incubant à l'étuve à CO₂ pendant 6 heures les chambres Ibidi®, les cellules présentaient un maximum d'étalement. Avant ces 6 heures d'incubation, la mise en flux décroche les cellules, et au-delà, le volume de milieu de culture contenu dans les réservoirs des chambres de culture destinées au flux se montre insuffisant (données non montrées). En procédant à un marquage en immunofluorescence après 6 heures d'incubation des chambres de cultures à l'étuve à CO₂, nous avons pu montrer que le cytosquelette d'actine des cellules EAhy926 était bien étalé et que les données résultant du marquage en immunofluorescence venaient soutenir nos observations visuelles en contraste de phase.

Après avoir évalué les paramètres nécessaires avant la mise en flux, nous avons pu procéder à l'application du flux sur les cellules EAhy926 via le système décrit dans la section correspondante des Matériels et Méthodes. Nous avons pu mettre en évidence qu'après 24 heures de mise en flux, les cellules EAhy926 se réorganisaient selon les lignes de flux (figure III-12), par visualisation en microscopie optique à contraste de phase avant la mise en flux, pendant et après, ou par immuno-marquage. Ce phénomène de réorganisation cellulaire est bien décrit dans la littérature, et dès 1995 déjà, le « shear stress » a été mentionné comme un modulateur de la structure cellulaire endothéliale, via une réorganisation du cytosquelette d'actine (Girard et Nerem, 1995). Les protéines d'adhérence focale, comme la vinculine, la

taline ou des intégrines spécifiques sont à la base de ce mécanisme. Il a été montré dans l'étude citée ci dessus par double marquage en immunofluorescence de cellules endothéliales d'aortes bovines qu'en conditions statiques, les récepteurs à fibronectine ou vitronectine étaient principalement localisés en périphérie cellulaire, ceci correspondant à la localisation de la vinculine, la taline et les terminaisons des microfilaments d'actine. En réponse à un « shear stress », ces cellules montraient une elongation avec des fibres de stress réorganisées selon la direction du flux. Nos observations en microscopie confocale viennent soutenir ces observations, puisque nous avons pu montrer une réorganisation du cytosquelette d'actine dans les cellules exposées au flux par rapport aux cellules contrôles.

Après avoir montré l'apparition de changements morphologiques chez les cellules EAhy926 soumises à un flux « physiologique », nous avons aussi pu mettre en évidence que les conditions de flux utilisées conduisaient bien à la translocation nucléaire de Nrf2 (voir figure III-13) dans la plupart des cellules exposées au flux pendant 24 heures. Ces données sont conformes aux données récentes de la littérature. Curieusement, l'activation de Nrf2 via un « shear stress » est dépendante de la production de ROS (Hsieh, Cheng *et al.*, 1998; Hsieh, Hsiao *et al.*, 2009) générée par ce « shear stress ». Cette équipe a notamment travaillé sur des cellules endothéliales soumises à un « shear stress » de 25 à 40 dynes/cm² et a pu mettre en évidence une augmentation de la production de ROS intracellulaires par la sonde H₂DCF-DA. Cette même équipe a également montré que l'inhibition de la PI3K et de la PKC empêchait la translocation nucléaire de Nrf2 suite à un « shear stress », au même titre qu'une inhibition au niveau de la production de ROS. L'activation de Nrf2 en condition de « shear stress » dépend donc d'une action conjointe des ROS avec les deux kinases mentionnées. Signalons que le « shear stress » induit également très rapidement un autre facteur de transcription, le facteur KLF2, qui contribuerait avec Nrf2 aux effets bénéfiques de certains « shear stress » (Boon et Horrevoets, 2009).

Pour continuer l'analyse des effets du flux sur les cellules endothéliales, nous nous sommes penchés sur les modulations d'expression génique dans les cellules mises en flux. Notre choix s'est fixé une série de gènes couvrant différentes facettes fonctionnelles de la cellule endothéliale. Par la méthode de RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons pu mettre en évidence que l'expression de ces gènes était modulée lors d'une stimulation par un « shear stress ». Dans la figure III-14 sont représentées les variations d'abondance relative des ARNm de ces gènes, le contrôle servant à normaliser les résultats étant la même chambre de culture ayant passé 24 heures à l'étuve à CO₂. Sur cette même figure sont représentées les valeurs issues de deux manipulations indépendantes. Nous pouvons d'abord remarquer que *Nrf2* et *KLF2*, gènes cibles directs d'un « shear stress », sont surexprimés. *Nrf2* est donc non seulement activé, mais le gène l'encodant est également induit. Quant à *KLF2*, il est effectivement décrit dans la littérature pour être rapidement induit (Huddleson, Ahmad *et al.*, 2005; van Thienen, Fledderus *et al.*, 2006). Cette induction par un « shear stress » serait notamment médiée par la PI3K (Huddleson, Ahmad *et al.*, 2005).

Nous avons également mis en évidence que les gènes cibles de Nrf2, à savoir la *NQO1* et *ho-1* étaient surexprimés, de manière spectaculaire pour *ho-1*, ceci étant en accord avec les conclusions des études mentionnées plus haut. La *tm* et *enos*, gènes cibles de KLF2 sont également surexprimés. Les gènes pro-inflammatoires *cox2*, *icam-1*, *il-8* et *il-1 β* , *mmp9*, et *mcp-1* et dans une moindre mesure *tnfa* et *ptx3*, sont également surexprimés dans les cellules endothéliales EAhy926 soumises à un flux physiologique. Ces gènes pro-inflammatoires, notamment activés par la voie NF κ B, sont exprimés en conditions de flux faible et pro-athérogène : il a été montré dans ce sens une activation de IKK par la production de ROS

associée au « shear stress » (Mohan, Koyoma *et al.*, 2007). La spectaculaire induction d'*il-8* et la plus modeste induction des autres gènes pro-inflammatoires peut indiquer que notre modèle *in vitro* n'est pas sans failles : nous avons d'ailleurs pu observer (données non montrées) que les cellules au bord du canal se réorganisaient parfois en circonvolutions, ceci suggérant la présence de micro-tourbillons de milieu de culture à ces endroits. Il pourrait donc exister une hétérogénéité dans la réponse des cellules EAhy926 mises en flux : certaines cellules, bien alignées dans le flux, sont protégées, alors que d'autres, soumises à des variations d'amplitude ou de direction de flux, se retrouvent stressées. Cette hypothèse d'une hétérogénéité est également soutenue par le fait que nous pouvons observer, dans la figure III-13, des cellules mises en flux qui ne présentent pas de translocation nucléaire de Nrf2.

Dans la figure III-15 sont présentées les moyennes des valeurs d'abondance relative des ARNm codant Nrf2, HO-1, KLF2, NQO1, IL-8 et PTX3 moyennées (cf. figure III-14) en relation avec les valeurs d'abondance relative de l'ARNm de ces gènes lorsque les cellules EAhy926 sont stimulées en flux additionné de Trolox. Nous pouvons constater que la transcription de *Nrf2* diminue. Nrf2 activant sa propre transcription, il est normal qu'une diminution de ROS diminue l'abondance de son ARNm. L'abondance relative de l'ARNm de *nqo1* ne diminue cependant pas. Un effet spectaculaire du Trolox apparaît quand on regarde l'abondance relative de l'ARNm d'*ho-1*, qui retourne à un taux quasi basal. Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans notre modèle, l'induction d'*ho-1* dépend en grosse partie de l'activation de la voie Nrf2. Puisque le Trolox a aussi un effet sur la variation d'abondance de l'ARNm de *il-8*, nous pouvons aussi penser que son induction ROS-dépendante (notamment par l'activation d'IKK dans la voie NFκB) est inhibée. *ho-1* étant de plus régulée par NFκB, la diminution drastique des valeurs d'abondance relative de son ARNm semble trouver une explication dans l'inhibition de l'action conjointe de la voie Nrf2 et NFκB dans son induction. Enfin, ni les valeurs d'abondance relative des ARNm codant KLF2 ou de la pentraxine 3 ne semblent affectées.

La manipulation de flux en présence de Trolox n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il ne s'agit donc que de résultats préliminaires qu'il faudra reproduire. D'autres inhibiteurs mériteraient aussi d'être testés, tels que l'évodiamine (inhibiteur de la voie NFκB) ou les inhibiteurs interférant avec la régulation de l'expression de KLF2 (inhibiteurs de PI3K ou de l'AMPK par exemple). Il a été en effet découvert récemment que la transcription de KLF2 dans des cellules endothéliales aortiques de rat était régulée par l'AMP-activated protein Kinase (Young, Wu *et al.*, 2009). Cependant nous pouvons déjà émettre l'hypothèse de la production de ROS par le « shear stress » dans le modèle de « shear stress » mis au point pendant ce travail. Nous avons pu mettre en évidence que nos conditions de flux activaient bien la translocation nucléaire de Nrf2 (voir figure III-13) dans la plupart des cellules exposées au flux pendant 24 heures. Compte tenu de ceci, le Trolox inhibant la production de ROS induits par le « shear stress », réduit certainement la translocation nucléaire de Nrf2, son activation transcriptionnelle ainsi que celle d'*ho-1*, gène cible de Nrf2. Une manipulation aisée qui pourrait venir soutenir cette hypothèse serait de procéder à un marquage similaire à celui montré dans la figure III-13 mais en présence de Trolox. L'une des perspectives sera aussi de préciser la source de ces ROS, bien que les NADPH oxydases sont généralement proposées comme source de ROS (Stocker et Keaney, 2004; Borch, Bargelli *et al.*, 2009).

4.2.2. Effets d'un « shear stress » et des LDL natives et modifiées sur les cellules EAhy926

Après avoir évalué les effets d'un « shear stress » seul sur les cellules EAhy926, nous avons tenté de caractériser par RT-PCR quantitative les effets d'un « shear stress » additionné de LDL natives et modifiées. Nous avons donc, dans ce but, enrichi le milieu de culture auquel les cellules EAhy926 sont exposées dans notre circuit avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées. Dans un premier temps, dans la figure III-16a, nous avons représenté les variations d'abondance de l'ARNm d'un ensemble gènes lorsque nous stimulons les cellules EAhy926 en présence de flux additionné de LDL, le contrôle étant celui utilisé pour la normalisation des flux représentés en figure III-14, c. à d. les cellules en conditions statiques. Ceci nous permet d'évaluer la composante flux seule et le flux additionné de LDL natives et modifiées sur la variation d'abondance de l'ARNm des gènes étudiés. Dans la figure III-16b, nous avons établi le ratio entre les variations d'abondance de l'ARNm de ces gènes pour un flux additionné de LDL et les valeurs de flux seul, nous permettant ainsi de mieux discriminer les effets des LDL natives ou modifiées de ceux de la mise en flux car nous avons pu montrer, dans la figure III-14 que le flux généré par notre système était capable à lui seul de générer des variations d'abondance d'ARNm pour la plupart des gènes étudiés.

Comme mentionné dans la description des résultats, on peut dégager trois tendances dans la réponse au niveau de l'expression génique des cellules EAhy926 soumises aux effets combinés du flux et des LDL natives ou modifiées. Soit les LDL renforcent l'effet du flux, avec des effets variables entre OX et MOX. Soit les LDL contrecarrent l'induction par le « shear stress ». Enfin, on observe qu'en général, les LDL natives n'ont pas ou peu d'effets.

Les LDL renforcent l'effet du flux

Les gènes *ho-1*, *tm*, *il-8*, *nrf2* et *gcs* sont plus induits lorsque l'on rajoute des LDL natives ou modifiées aux conditions de flux. L'effet le plus marqué sur *ho-1* est généré par les MOX. Pour rappel, nous avons montré qu'en conditions statiques, les OX étaient responsables de la plus forte induction d'*ho-1* (figure III-7). Nous pouvons mettre en avant ici la durée de la stimulation au flux et aux LDL modifiées. Nous savons en plus qu'en conditions statiques, après 24 heures, les niveaux d'inductions générés par les OX et les MOX ne présentent plus une énorme différence. Ainsi, nous devrions procéder à une cinétique d'extraction en flux afin de déterminer si la différence d'induction par les OX et les MOX se maintient au cours du temps. Pour l'*il-8*, il faut rester prudent, car les variations restent *faibles*. Les MOX semblent générer des taux d'induction plus élevés que les OX, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en conditions statiques (figure III-9). *Nrf2* n'est quant à lui que très peu induit par les LDL natives stimulant les cellules EAhy926 mises en flux. Les LDL modifiées induisent la surexpression de *Nrf2*, avec un effet plus marqué pour les OX. Nous savons que *Nrf2* est activé et induit par un stress oxydatif. Le gène cible de *Nrf2* *gcs* suit cette même tendance, à savoir une plus forte induction par les OX. Ceci est peut être corrélé à la plus forte activation de *Nrf2* en présence de OX. Encore une fois, ici, les résultats ne sont pas vraiment en accord avec ceux obtenus en conditions statiques, puisque nous avons montré que les OX génèrent moins de ROS que les MOX. Par contre, pour la *ho-1*, autre gène cible de *Nrf2*, se sont bien les MOX qui renforcent le plus l'induction par le « shear stress », alors que pour la *nqo1*, également un gène cible de *Nrf2*, on n'observe pas d'effet net des LDL. Par ailleurs, il s'agit d'une expérience préliminaire, qui n'a été réalisée qu'une seule fois. Il faudrait donc répéter la manipulation en utilisant un antioxydant et un contrôle positif tel que le peroxyde d'hydrogène, afin de vérifier si l'effet des LDL natives et modifiées sur la surexpression de *Nrf2* est dépendant de la production de ROS par les LDL modifiées. Enfin, *tm*, un gène cible

de *KLF2*, est surexprimé en présence d'OX et de MOX. Ce résultat est étonnant, puisque *KLF2* est plutôt réprimé par les LDL modifiées.

Les LDL peuvent également contrecarrer l'induction par le « shear stress »

De manière intéressante, l'*il-1 β* voit son expression diminuer suite à l'ajout de LDL natives ou modifiées. Ceci peut paraître surprenant étant donné le stress oxydatif généré par les LDL et que cette cytokine pro-inflammatoire est normalement induite par la présence de ROS, ou même le flux seul (figure III-14). Dans le même sens, nous observons une diminution de l'expression de *cox2* suite à une stimulation avec des LDL modifiées, une diminution de l'expression de *c-fos* et *mcp-1* suite à une stimulation aux MOX. On peut remarquer ici, de manière intéressante, que l'ensemble de ces gènes, à l'exception de *c-fos* qui intervient surtout dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération, sont des gènes pro-inflammatoires reconnus, régulés par NF κ B et sont réprimés en présence de LDL. Sans doute existe-t-il une interaction entre la réponse aux LDL et la réponse au flux seul dans notre système, ou une interaction plus « chimique » entre les ROS générés par les LDL et le flux, menant éventuellement à une protection des cellules. *KLF2* et *enos* voient leur expression diminuer suite à l'ajout de LDL, avec un effet plus marqué pour les MOX. Les profils de réponses sont corrélés, cela peut être normal puisque *enos* est un gène cible de *KLF2*. Enfin, *cav-1* semble être induit en présence des OX, mais sous-exprimé en présence de MOX. Nous ne possédons pas de résultats suffisants en conditions statiques et dynamiques afin d'interpréter ceci, mais rappelons que la cavéoline-1 régule négativement l'activité de la eNOS, qu'elle pourrait jouer un rôle dans la compartimentalisation redox de la cellule (Patel et Insel, 2009) et qu'elle est également associée à la transcytose des lipoprotéines à travers les cellules endothéliales (von Eckardstein et Rohrer, 2009).

Les LDL natives influencent peu les variations d'expression génique

Les LDL natives influencent peu les variations d'expression génique induites par le flux, sauf dans le cas de l'*il-1 β* . Ainsi, nous observons une forte répression de ce gène pro-inflammatoire en présence de LDL, natives ou modifiées. Ceci est, compte tenu de nos résultats, encore inexplicable. Nous aurions pu éventuellement nous focaliser sur l'expression de *vcam-1*, qui est connue pour être induite dans les HUVECs par l'*IL-1 β* , lui-même induit par la présence de LDL natives (Zhu, Liao *et al.*, 1999). Malheureusement, un des problèmes des cellules EAhy926 sur lesquelles nous travaillons est de, apparemment, ne pas exprimer *vcam-1*. Enfin concernant *nqo1*, l'ajout de LDL ne semble pas affecter son expression, si ce n'est qu'elle est légèrement diminuée suite à l'ajout de LDL. On voit donc encore une fois que les gènes cible d'un même facteur de transcription peuvent se comporter de manière divergente.

Il n'y a pas vraiment de publications qui soutiennent à l'heure actuelle le type d'expérimentation réalisée ici, à savoir une stimulation de cellules endothéliales humaines EAhy926 avec un flux physiologique additionné de LDL circulantes. De plus, nous n'avons pas pu, par faute de temps, répéter la manipulation afin de consolider nos résultats. L'interprétation de ces résultats est donc extrêmement complexe et doit s'opérer avec prudence. Des travaux, notamment menés par l'équipe de Zouaoui Boudjeltia *et al* au CHU de Charleroi, sont actuellement en cours avec une chambre de flux plus sophistiquée et entièrement paramétrée. Nous pouvons donc nous attendre à ce que nos résultats soient prochainement confirmés ou infirmés, en suivant les variations d'expression non seulement au niveau ARNm, mais aussi au niveau protéinique. Par ailleurs, nos résultats ont montré que les LDL modifiées activent Nrf2 et conduisent à sa surexpression, mais il faudrait aussi vérifier si d'autres facteurs de transcription sont activés, tels NF κ B et AP-1, également redox-sensibles,

mais aussi des facteurs tels les PPAR et LXR qui pourraient être activés par les acides gras apportés par les LDL natives ou modifiées. L'activation de PPAR et LXR, reconnus pour avoir des effets anti-inflammatoires (Hong et Tontonoz, 2008) permettraient d'expliquer pourquoi certains gènes cibles de NFκB ou de Nrf2 sont réprimés et d'autres pas.

5. Conclusions et perspectives

5. Conclusions et perspectives

L'athérosclérose, maladie inflammatoire, chronique et dégénérative des artères de moyen et gros calibres est décrite comme étant multifactorielle. Un des facteurs de risque bien connus est la dys- ou hyperlipidémie, avec en particulier les excès de LDL (ou mauvais cholestérol) mais aussi leur oxydation. Une multitude de modèles d'études de la pathologie ont été générés, mais dans le contexte d'une dys- ou hyperlipidémie, un modèle est récurrent. Ainsi, les LDL oxydées *in vitro* au cuivre ont souvent été utilisés pour essayer de mimer la composante LDL oxydées *in vivo*. Pourtant, ce modèle, bien qu'efficace en terme d'oxydation des fractions lipidique et protéique des LDL, est moins pertinent que divers modèles alternatifs d'oxydation des LDL plus récents, impliquant d'autres acteurs, entre autres, enzymatiques, telle la myéloperoxydase (MPO). Cette enzyme contenue dans les granules des neutrophiles est présente dans les plaques athéromateuses et a été proposée comme un acteur probable de l'oxydation des LDL *in vivo*. Ce travail se focalise sur les réponses différentielles qui sont générées par une stimulation d'une lignée de cellules endothéliales humaines avec des LDL natives et modifiées au cuivre (ou OX affectées au niveau des fractions lipidiques et protéique) et à la MPO (ou MOX affectées principalement au niveau de la fraction protéique).

Dans un premier temps, nous avons utilisé les cellules endothéliales humaines EAhy926 en conditions statiques stimulées avec des LDL natives ou modifiées, OX ou MOX. **Le premier objectif** ayant trait à ces conditions expérimentales était de mettre en évidence une différence entre la réponse des cellules EAhy926 stimulées au OX et MOX, en nous focalisant sur la voie dépendante du facteur de transcription activé en cas de stress oxydatif, Nrf2. Nous nous attendions à observer une réponse différentielle des cellules endothéliales à ces deux LDL et ce pour deux raisons : premièrement, les processus d'oxydation générés par le cuivre ou la MPO étant sensiblement différents et s'opérant sur des fractions différentes des LDL, nous pouvions nous attendre à une réponse différente. Deuxièmement, il a été montré que les macrophages murins RAW 264.7 répondaient différemment à ces deux types de LDL (thèse de Damien Calay). Nous avons pu répondre à cet objectif et mettre en évidence une réponse différentielle des cellules EAhy926 à une stimulation aux LDL natives et modifiées. Les MOX sont responsables d'une plus grande production de ROS dans les cellules EAhy926, ce qui est conforme à ce qui avait déjà été observé dans notre laboratoire sur les macrophages murins RAW 264.7. Nous nous sommes attardés sur les effets des LDL natives et modifiées sur l'activation du facteur de transcription Nrf2 et la voie cellulaire qui en découle. Nous nous attendions à ce que le taux d'activation de cette voie soit corrélé à la production de ROS par une stimulation aux OX et MOX. Nous n'avons, toutefois, pas pu montrer de différence nette d'activation de Nrf2 entre des cellules EAhy926 stimulées aux OX ou MOX, ces dernières étant toutefois plus efficaces que les LDL natives sur l'activation de Nrf2. Il existe donc à ce niveau une différence entre les cellules EAhy926 et les macrophages murins RAW 264.7, puisque dans ces derniers, l'activation de Nrf2 est proportionnelle aux stress oxydatifs générés par les OX et les MOX. De plus, lorsque nous avons suivi l'expression d'un gène cible de Nrf2, à savoir le gène encodant la protéine Hème Oxygénase-1 (HO-1), nous avons mis en évidence une surexpression d'*ho-1*, mais plus marquée pour les OX que pour les MOX. Ceci est en désaccord avec ce qui est observé dans les macrophages murins RAW 264.7, où ce sont les MOX qui causent la plus grande induction d'*ho-1*. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces discordances entre les 2 types cellulaires. Tout d'abord, il faut tenir compte de différences entre les récepteurs aux LDL modifiées, les récepteurs « scavenger », présents sur les deux types cellulaires concernés. De plus, il est maintenant essentiel, au vue de la complexité des facteurs interagissant avec Nrf2, de supposer que les acteurs et les voies de signalisation impliquées dans les réponses des macrophages ou des cellules endothéliales aux

LDL modifiées sont différents selon le type cellulaire concerné. Ainsi, il serait utile à l'avenir de se concentrer sur le « redox signaling » : il est maintenant décrit dans la littérature que la eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase), la NADPH oxygénase et l'Hème Oxygénase sont localisées au niveau des « lipid rafts » et cavéoles (Patel et Insel, 2009). Ces plateformes de signalisation sont abondantes chez les cellules endothéliales et encore peu connues. La différence de réponse observée entre les OX et MOX pour les macrophages murins et les cellules endothéliales pourrait donc aussi s'expliquer à ce niveau. Cette première partie de travail confirme en tous les cas que les OX et MOX ont des effets différentiels sur les cellules endothéliales, avec des divergences marquées par rapport aux macrophages. L'enjeu est important puisque ces données montrent que des LDL modifiées uniquement sur la fraction protéique sont bioactives.

Après avoir utilisé un modèle d'étude en conditions statiques, nous avons tenté de mettre au point un système dynamique de « shear stress », forces de frictions générées sur l'endothélium par la circulation sanguine et de plus en plus décrit comme un acteur incontournable dans l'athérogenèse, exerçant à la fois des effets protecteurs ou délétères en fonction de son amplitude et de sa direction. Ce même « shear stress » est décrit comme activateur et inducteur de Nrf2, par la production de ROS notamment. Nous avons généré ce modèle d'étude afin de pouvoir stimuler les cellules endothéliales EAhy926 avec des LDL mais en conditions dynamiques, afin de se rapprocher encore un peu plus des conditions que rencontrent les cellules *in vivo* : en effet, on trouve fréquemment de LDL oxydées circulantes dans le sang. Elles proviendraient soit d'un efflux des lésions, soit de processus d'oxydation localisés à la surface de l'endothélium dysfonctionnel.

Le deuxième objectif de ce mémoire a été de caractériser les réponses des cellules endothéliales EAhy926 soumises à un « shear stress » physiologique et a priori plutôt athéro-protecteur. Soumises à 24 heures de flux en conditions stériles, les cellules EAhy926 ont montré trois réponses principales, à savoir un remodelage morphologique (déjà décrit et expliqué dans la littérature), une translocation nucléaire de Nrf2, conforme aux données de la littérature et qui indique bien qu'une partie de la réponse protectrice au flux généré par notre modèle passe par la production de ROS et l'activation de la voie Nrf2 et enfin des variations d'expression génique. Les gènes dont l'induction est modifiée par la mise en flux sont aussi bien des gènes encodant des acteurs athéro-protecteurs (Nrf2, KLF2, eNOS, TM, HO-1...) ou pro-athérogènes, comme des cytokines pro-inflammatoires ou molécules d'adhérence. Ces expériences n'ayant été réalisées que deux fois, il faut rester prudent au niveau de l'interprétation, et ce d'autant plus que les modifications de l'expression de ces gènes semblent complexes et nécessitent certainement une confirmation.

Signalons en plus qu'il existe probablement une hétérogénéité dans la réponse des cellules mises en flux. A cet égard, il serait très intéressant d'établir une lignée de cellules endothéliales contenant une construction GFP sous le contrôle d'un promoteur d'un gène répondant au « shear stress » ou du promoteur de *klf2*, afin de pouvoir visualiser cette hétérogénéité de réponse, en suivant l'expression de la GFP ou toute autre protéine fluorescente apparentée individuellement dans les cellules.

Le troisième objectif du mémoire a été de caractériser l'effet d'un flux additionné ou non de LDL sur les cellules endothéliales EAhy926. Nous avons ainsi appliqué un « shear stress » physiologique et en partie protecteur sur nos cellules, combiné avec des LDL natives et modifiées. Nous avons pu mettre en évidence une série de modifications dans l'expression d'un set de gènes choisis pour couvrir plusieurs aspects fonctionnels de la cellule endothéliale

pertinents dans le contexte de l'athérogenèse. Les LDL natives et modifiées peuvent à la fois renforcer ou diminuer les effets du flux sur des gènes pro-inflammatoires, protecteurs dans la pathologie ou impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Les résultats, n'ayant pas par faute de temps pu être répétés, sont encore préliminaires. Nous devons donc rester prudent quand à leur interprétation, qui semble très complexe. Concernant cette manipulation, afin de notamment faciliter les réplicats à l'avenir, nous devons certainement améliorer notre système de flux. Ainsi, au cours de ce travail, nous ne pouvions réaliser qu'un seul type de flux à la fois, ne disposant que d'un circuit simple et d'un seul réservoir. Il y a peu, nous avons pu monter deux chambres de culture en parallèle, nous permettant ainsi d'effectuer deux réplicats en même temps. Cependant, il sera essentiel à l'avenir de modifier le circuit afin d'y adapter plusieurs réservoirs, et ainsi travailler sur plusieurs conditions en parallèle. Ceci ayant été impossible pour la manipulation de flux additionné ou non de LDL, nous avons dû effectuer les différentes conditions l'une à la suite de l'autre, ce qui est lourd et consommateur de temps. En outre, cela pose plusieurs problèmes, et très certainement des problèmes au niveau de l'homogénéité de réponse des cellules EAhy926 : en effet, la complexité des résultats générés pourrait s'expliquer en partie par la variabilité cellulaire d'une condition à une autre, les manipulations étant espacées dans le temps. A ce propos, nous avons déjà pu voir une variabilité dans les abondances relatives de l'ARNm de *c-fos* au cours des deux extractions en flux simple (données non montrées). De plus, nous n'avons trouvé que peu de données dans la littérature, ce type de manipulation est encore très nouveau. Nous devons aussi vérifier si nos conditions de flux utilisées sont réellement protectrices, puisque nous avons observé certaines réponses qui semblent plutôt pro-inflammatoires.

Comme mentionné dans la discussion, un pas supplémentaire dans la meilleure compréhension de la stimulation de cellules endothéliales par un flux physiologique sera la chambre de flux développée au CHU de Charleroi par Zouaoui Boudjeltia *et al*, entièrement paramétrée. A l'avenir, ce type de chambre de flux permettra de complexifier les modèles cellulaires expérimentaux et d'éventuellement caractériser les interactions entre les cellules endothéliales et les monocytes THP-1 ou encore les plaquettes, en présence ou non de LDL modifiées ou non. Ainsi, avec une approche plus globale et intégrant les différents acteurs impliqués dans l'athérogenèse, il sera certainement possible de mieux comprendre l'importance relative des acteurs cellulaires, du « shear stress » et des LDL, modifiées ou non dans les étapes précoces de la pathologie.

En ce qui concerne les aspects moléculaires qui mériteraient d'être approfondis, on peut mentionner en priorité les interactions entre facteurs de transcription, puisque nos données montrent que les gènes cibles d'un même facteur de transcription ne se comportent pas toujours de la même manière. Dans la continuité de ce travail, il faudrait se concentrer sur les interactions entre les voies NFκB et Nrf2, récemment décrites pour avoir une influence mutuelle à plusieurs niveaux. De plus, en ce qui concerne l'aspect « shear stress », nous devons certainement nous attarder d'avantage sur KLF2, facteur de transcription caractérisé relativement récemment comme intervenant dans la réponse protectrice au « shear stress » avec Nrf2. Une perspective intéressante serait de travailler avec des cellules Knock-Out pour certains gènes cruciaux dans la réponse des cellules endothéliales au flux, comme *Nrf2*, *KLF2*, ou encore pour des gènes cibles de ces facteurs ou d'autres gènes clés pour les fonctions endothéliales, tels les gènes encodant la eNOS ou encore la cavéoline-1, de plus en plus décrites en ce qui concerne les mécanismes rédox dans les cellules endothéliales. Outre les facteurs de transcription régulés par les stress oxydatifs et le « shear stress », il faudrait aussi prendre en compte certains récepteurs nucléaires. Il est de plus en plus évident que ces récepteurs nucléaires sont capables d'intégrer les réponses inflammatoires et les signaux

métaboliques afin de maintenir l'homéostasie dans des types cellulaires comme les macrophages et les lymphocytes. Les PPAR et les LXR sont des récepteurs nucléaires activés par des dérivés d'acides gras ou du cholestérol, contrôlant ainsi une série de gènes impliqués dans l'inflammation et le métabolisme des lipides, à savoir deux composantes de l'athérosclérose (Hong et Tontonoz, 2008). Il n'est donc pas exclu qu'ils soient activés lorsque les cellules endothéliales sont incubées avec des LDL et qu'ils interfèrent avec NFκB et/ou Nrf2 par exemple, avec des effets variables selon le type de LDL considéré et le gène cible étudié.

Enfin, pour mieux comprendre les effets différentiels observés entre LDL et entre macrophages/cellules endothéliales, il faudra aussi vérifier si les miARN ne pourraient pas jouer un rôle modulateur. Il est encore peu décrit dans la littérature comment les gènes impliqués dans les maladies cardiovasculaires sont régulés en amont de leur expression. Les microARNs sont une classe émergente de petits ARN non codant et ultra-conservés, qui peuvent réguler l'expression des gènes à un niveau post-transcriptionnel, en empêchant la traduction des ARNm en protéines. Plus de 500 miARNs ont été identifiés jusqu'à présent, avec des preuves de plus en plus évidentes que ces miARNs jouent un rôle dans la cardiogenèse, la différenciation hématopoïétique ou encore les pathologies inflammatoires cardiovasculaires. L'identification des miARNs impliqués dans ces pathologies, permettrait à terme une meilleure compréhension de l'athérosclérose, et pourquoi pas de générer des traitements ciblés pour cette pathologie.

La pathologie de l'athérosclérose, par son aspect multifactoriel, présente une évidente complexité qui ne facilite pas son étude. Il est clair qu'à l'avenir, afin de pouvoir caractériser les réponses des types cellulaires impliqués dans cette pathologie, il sera essentiel non plus de se concentrer sur un seul aspect, mais d'intégrer les différents concepts que sont le stress oxydatif, le « shear stress », la dys- ou hyperlipidémie, le métabolisme des lipides et l'inflammation, tout en tenant compte des interactions inter-cellulaires, afin de mieux comprendre les mécanismes et cellulaires à la base de l'athérogenèse.

6. Bibliographie

6. Bibliographie

- Adachi, H. and M. Tsujimoto (2006). "Endothelial scavenger receptors." Prog Lipid Res **45**(5): 379-404.
- Aukrust, P., B. Halvorsen, et al. (2008). "Chemokines and cardiovascular risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1909-19.
- Badimon, L., G. Vilahur, et al. (2009). "Lipoproteins, platelets and atherothrombosis." Rev Esp Cardiol **62**(10): 1161-78.
- Bengoechea-Alonso, M. T. and J. Ericsson (2007). "SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 215-22.
- Bjorkhem, I., O. Andersson, et al. (1994). "Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8592-6.
- Bloom, D. A. and A. K. Jaiswal (2003). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression." J Biol Chem **278**(45): 44675-82.
- Bonaventura, D., C. N. Lunardi, et al. (2009). "Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase." J Inorg Biochem **103**(10): 1366-74.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, et al. (2003). "Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 168-75.
- Boon, R. A. and A. J. Horrevoets (2009). "Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress." Hamostaseologie **29**(1): 39-40, 41-3.
- Borchi, E., V. Bargelli, et al. (2009). "Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure." Biochim Biophys Acta.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-7.
- Boudjeltia, K. Z., I. Legssyer, et al. (2006). "Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL." Biochem Cell Biol **84**(5): 805-12.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell **89**(3): 331-40.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, et al. (2006). "Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo." J Clin Invest **116**(4): 1052-62.
- Bubici, C., S. Papa, et al. (2006). "Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance." Oncogene **25**(51): 6731-48.
- Burkitt, M. J. (2001). "A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin." Arch Biochem Biophys **394**(1): 117-35.
- Burleigh, M. C., A. D. Briggs, et al. (1992). "Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations." Atherosclerosis **96**(1): 71-81.

- Cai, W. and W. Schaper (2008). "Mechanisms of arteriogenesis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(8): 681-92.
- Chait, A., C. Y. Han, et al. (2005). "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease?" J Lipid Res **46**(3): 389-403.
- Chatzizisis, Y. S., A. U. Coskun, et al. (2007). "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior." J Am Coll Cardiol **49**(25): 2379-93.
- Chen, X. L., S. E. Varner, et al. (2003). "Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism." J Biol Chem **278**(2): 703-11.
- Cheng, C., D. Tempel, et al. (2006). "Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress." Circulation **113**(23): 2744-53.
- Chien, S. (2003). "Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall." Prog Biophys Mol Biol **83**(2): 131-51.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, et al. (2003). "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7198-209.
- Cunningham, K. S. and A. I. Gotlieb (2005). "The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis." Lab Invest **85**(1): 9-23.
- da Luz, P. L. and D. Favarato (1999). "Chronic coronary artery disease." Arq Bras Cardiol **72**(1): 5-38.
- Dardik, A., L. Chen, et al. (2005). "Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells." J Vasc Surg **41**(5): 869-80.
- Davies, P. F., K. A. Barbee, et al. (1997). "Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction." Annu Rev Physiol **59**: 527-49.
- Dekker, R. J., S. van Soest, et al. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." Blood **100**(5): 1689-98.
- Dhakshinamoorthy, S. and A. K. Jaiswal (2000). "Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene." J Biol Chem **275**(51): 40134-41.
- Dhakshinamoorthy, S. and A. K. Jaiswal (2001). "Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." Oncogene **20**(29): 3906-17.
- Dhakshinamoorthy, S., D. J. Long, 2nd, et al. (2000). "Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens." Curr Top Cell Regul **36**: 201-16.
- Ding, S., M. Zhang, et al. (2008). "The role of carotid plaque vulnerability and inflammation in the pathogenesis of acute ischemic stroke." Am J Med Sci **336**(1): 27-31.
- Elbirt, K. K. and H. L. Bonkovsky (1999). "Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role." Proc Assoc Am Physicians **111**(5): 438-47.
- Espenshade, P. J. and A. L. Hughes (2007). "Regulation of sterol synthesis in eukaryotes." Annu Rev Genet **41**: 401-27.
- Esterbauer, H., J. Gebicki, et al. (1992). "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." Free Radic Biol Med **13**(4): 341-90.

- Fearon, I. M. and S. P. Faux (2009). "Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight." *J Mol Cell Cardiol* **47**(3): 372-81.
- Fledderus, J. O., R. A. Boon, et al. (2008). "KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(7): 1339-46.
- Fledderus, J. O., J. V. van Thienen, et al. (2007). "Prolonged shear stress and KLF2 suppress constitutive proinflammatory transcription through inhibition of ATF2." *Blood* **109**(10): 4249-57.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." *Circulation* **113**(13): 1708-14.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." *J Clin Invest* **94**(6): 2493-503.
- Getz, G. S. and C. A. Reardon (2008). "SAA, HDL biogenesis, and inflammation." *J Lipid Res* **49**(2): 269-70.
- Gimbrone, M. A., Jr., J. N. Topper, et al. (2000). "Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **902**: 230-9; discussion 239-40.
- Girard, P. R. and R. M. Nerem (1995). "Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins." *J Cell Physiol* **163**(1): 179-93.
- Glagov, S., E. Weisenberg, et al. (1987). "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries." *N Engl J Med* **316**(22): 1371-5.
- Gleissner, C. A., N. Leitinger, et al. (2007). "Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis." *Hypertension* **50**(2): 276-83.
- Gustin, C., E. Delaive, et al. (2008). "Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(3): 491-7.
- Hahn, C. and M. A. Schwartz (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 53-62.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1147-50.
- Heinecke, J. W. (2003). "Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis." *Am J Cardiol* **91**(3A): 12A-16A.
- Hiatt, W. R., S. Hoag, et al. (1995). "Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study." *Circulation* **91**(5): 1472-9.
- Holvoet, P., J. Vanhaecke, et al. (1998). "Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease." *Circulation* **98**(15): 1487-94.
- Hong, C. and P. Tontonoz (2008). "Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors." *Curr Opin Genet Dev* **18**(5): 461-7.
- Hsieh, C. Y., H. Y. Hsiao, et al. (2009). "Regulation of shear-induced nuclear translocation of the Nrf2 transcription factor in endothelial cells." *J Biomed Sci* **16**: 12.
- Hsieh, H. J., C. C. Cheng, et al. (1998). "Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression." *J Cell Physiol* **175**(2): 156-62.
- Huddleson, J. P., N. Ahmad, et al. (2005). "Induction of KLF2 by fluid shear stress requires a novel promoter element activated by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent chromatin-remodeling pathway." *J Biol Chem* **280**(24): 23371-9.

- Immenschuh, S. and G. Ramadori (2000). "Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target." Biochem Pharmacol **60**(8): 1121-8.
- Itabe, H. (2003). "Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified." Biol Pharm Bull **26**(1): 1-9.
- Itoh, K., T. Chiba, et al. (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 313-22.
- Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." Free Radic Biol Med **36**(10): 1199-207.
- Jin, W., H. Wang, et al. (2008). "Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor-kappaB activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury." Mediators Inflamm **2008**: 725174.
- Jin, W., L. Zhu, et al. (2008). "Influence of Nrf2 genotype on pulmonary NF-kappaB activity and inflammatory response after traumatic brain injury." Ann Clin Lab Sci **38**(3): 221-7.
- Katritsis, D., L. Kaiktsis, et al. (2007). "Wall shear stress: theoretical considerations and methods of measurement." Prog Cardiovasc Dis **49**(5): 307-29.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, et al. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.
- Lan, Q., K. O. Mercurius, et al. (1994). "Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress." Biochem Biophys Res Commun **201**(2): 950-6.
- Lehoux, S., Y. Castier, et al. (2006). "Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces." J Intern Med **259**(4): 381-92.
- Leonard, M. O., N. E. Kieran, et al. (2006). "Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury." Faseb J **20**(14): 2624-6.
- Léoni, J. (2001). Physiopathologie de l'athérosclérose: Mécanismes et prévention de l'athéromatose, Facultés de médecine et de pharmacie de Besançon.
- Lessner, S. M., H. L. Prado, et al. (2002). "Atherosclerotic lesions grow through recruitment and proliferation of circulating monocytes in a murine model." Am J Pathol **160**(6): 2145-55.
- Li, Y., H. Bi, et al. (2005). "Effects of oxidized low density lipoprotein on the expression and function of ABCA1 in macrophages." J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci **25**(2): 113-6.
- Liao, H., T. Langmann, et al. (2002). "Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(1): 127-32.
- Malek, A. M., S. L. Alper, et al. (1999). "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." Jama **282**(21): 2035-42.
- Mann, G. E., J. Niehueser-Saran, et al. (2007). "Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia." Sheng Li Xue Bao **59**(2): 117-27.
- McNally, J. S., M. E. Davis, et al. (2003). "Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2290-7.

- Moguilevsky, N., K. Zouaoui Boudjeltia, et al. (2004). "Monoclonal antibodies against LDL progressively oxidized by myeloperoxidase react with ApoB-100 protein moiety and human atherosclerotic lesions." Biochem Biophys Res Commun **323**(4): 1223-8.
- Mohan, S., K. Koyoma, et al. (2007). "Low shear stress preferentially enhances IKK activity through selective sources of ROS for persistent activation of NF-kappaB in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C362-71.
- Ng, C. J., D. M. Shih, et al. (2005). "The paraoxonase gene family and atherosclerosis." Free Radic Biol Med **38**(2): 153-63.
- Niture, S. K., J. W. Kaspar, et al. (2009). "Nrf2 signaling and cell survival." Toxicol Appl Pharmacol.
- Nykjaer, A. and T. E. Willnow (2002). "The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife?" Trends Cell Biol **12**(6): 273-80.
- Pagano, P. J., Y. Ito, et al. (1995). "An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta." Am J Physiol **268**(6 Pt 2): H2274-80.
- Patel, H. H. and P. A. Insel (2009). "Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling." Antioxid Redox Signal **11**(6): 1357-72.
- Pearson, J. D. (2000). "Normal endothelial cell function." Lupus **9**(3): 183-8.
- Pepine, C. J. (2001). "Why vascular biology matters." Am J Cardiol **88**(8A): 5K-9K.
- Pluddemann, A., C. Neyen, et al. (2007). "Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands." Methods **43**(3): 207-17.
- Qiu, Y. and J. M. Tarbell (2000). "Interaction between wall shear stress and circumferential strain affects endothelial cell biochemical production." J Vasc Res **37**(3): 147-57.
- Russell, J. C. and S. D. Proctor (2006). "Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis." Cardiovasc Pathol **15**(6): 318-30.
- Russell, J. C., G. Shillabeer, et al. (1998). "Development of insulin resistance in the JCR:LA-cp rat: role of triacylglycerols and effects of MEDICA 16." Diabetes **47**(5): 770-8.
- Ryter, S. W., J. Alam, et al. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." Physiol Rev **86**(2): 583-650.
- Sakakura, Y., H. Shimano, et al. (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis." Biochem Biophys Res Commun **286**(1): 176-83.
- Sanan, D. A., D. L. Newland, et al. (1998). "Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a)." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4544-9.
- Sankaranarayanan, K. and A. K. Jaiswal (2004). "Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." J Biol Chem **279**(49): 50810-7.
- Sawamura, T., N. Kume, et al. (1997). "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein." Nature **386**(6620): 73-7.
- Schachinger, V. and A. M. Zeiher (2000). "Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction." Z Kardiol **89** Suppl 9: IX/70-4.
- Shah, P. K. (2003). "Mechanisms of plaque vulnerability and rupture." J Am Coll Cardiol **41**(4 Suppl 5): 15S-22S.
- Shah, P. K. (2009). "Inflammation and plaque vulnerability." Cardiovasc Drugs Ther **23**(1): 31-40.

- Shimano, H. (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes." Prog Lipid Res **40**(6): 439-52.
- Shyy, J. Y. and S. Chien (2002). "Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress." Circ Res **91**(9): 769-75.
- Siess, W., K. J. Zangl, et al. (1999). "Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6931-6.
- Singh, R. B., S. A. Mengi, et al. (2002). "Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process." Exp Clin Cardiol **7**(1): 40-53.
- Slager, C. J., J. J. Wentzel, et al. (2005). "The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **2**(8): 401-7.
- Smith, J. D., E. Trogan, et al. (1995). "Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8264-8.
- Spickett, C. M., A. Jerlich, et al. (2000). "The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids." Acta Biochim Pol **47**(4): 889-99.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(9): 1512-31.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-478.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2005). "New insights on oxidative stress in the artery wall." J Thromb Haemost **3**(8): 1825-34.
- Stoll, G. and M. Bendszus (2006). "Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization." Stroke **37**(7): 1923-32.
- Stone, P. H., A. U. Coskun, et al. (2003). "Effect of endothelial shear stress on the progression of coronary artery disease, vascular remodeling, and in-stent restenosis in humans: in vivo 6-month follow-up study." Circulation **108**(4): 438-44.
- Stone, P. H., A. U. Coskun, et al. (2003). "Prediction of sites of coronary atherosclerosis progression: In vivo profiling of endothelial shear stress, lumen, and outer vessel wall characteristics to predict vascular behavior." Curr Opin Cardiol **18**(6): 458-70.
- Tai, S. C., G. B. Robb, et al. (2004). "Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(3): 405-12.
- Tesic, D. S. (2009). "[Anatomic distribution of peripheral atherosclerosis and its correlation with lipid disorders]." Med Pregl **62 Suppl 3**: 75-9.
- Traub, O. and B. C. Berk (1998). "Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(5): 677-85.
- Tymoczko, J. L. S. B. T. S., Lubert; Berg, Jeremy Mark (2002). Biochemistry.
- Tzima, E., M. A. del Pozo, et al. (2001). "Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment." Embo J **20**(17): 4639-47.

- Tzima, E., M. Irani-Tehrani, et al. (2005). "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." Nature **437**(7057): 426-31.
- Van Antwerpen, P., I. Legssyer, et al. (2006). "Captopril inhibits the oxidative modification of apolipoprotein B-100 caused by myeloperoxidase in a comparative in vitro assay of angiotensin converting enzyme inhibitors." Eur J Pharmacol **537**(1-3): 31-6.
- van Thienen, J. V., J. O. Fledderus, et al. (2006). "Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization." Cardiovasc Res **72**(2): 231-40.
- von Eckardstein, A. and L. Rohrer (2009). "Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins." Curr Opin Lipidol **20**(3): 197-205.
- Wink, D. A., J. A. Cook, et al. (1997). "Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress." J Biol Chem **272**(17): 11147-51.
- Yeh, M., A. L. Cole, et al. (2004). "Role for sterol regulatory element-binding protein in activation of endothelial cells by phospholipid oxidation products." Circ Res **95**(8): 780-8.
- Yokoyama, S. (2006). "ABCA1 and biogenesis of HDL." J Atheroscler Thromb **13**(1): 1-15.
- Young, A., W. Wu, et al. (2009). "Flow activation of AMP-activated protein kinase in vascular endothelium leads to Kruppel-like factor 2 expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(11): 1902-8.
- Zadelaar, S., R. Kleemann, et al. (2007). "Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(8): 1706-21.
- Zarev, S., D. Bonnefont-Rousselot, et al. (2003). "Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization." Arch Biochem Biophys **420**(1): 68-78.
- Zhang, R., M. L. Brennan, et al. (2001). "Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease." Jama **286**(17): 2136-42.
- Zhu, Y., H. L. Liao, et al. (1999). "Low-density lipoprotein augments interleukin-1-induced vascular adhesion molecule expression in human endothelial cells." Atherosclerosis **144**(2): 357-65.