

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Contribution à l'étude de l'athérogenèse. 7: Mise au point d'un modèle de coculture de cellules endothéliales et de cellules de lignées myélocytaires

Dominguez, Michel

*Award date:*  
1989

*Awarding institution:*  
Universite 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.

250889

Unité de cytologie

Promoteur: Professeur M-F. Ronveaux-Dupal.

Contribution à l'étude de l'athérogenèse.

VII. Mise au point d'un modèle de coculture de cellules endothéliales et de cellules de lignées myélocytaires.

Dominguez Michel

Année 1988-1989

<u>II. L'ATHÉROSCLÉROSE</u> .....	1
A. Histopathologie de la lésion athéroscléreuse.....	2
1) Lésions initiales.....	2
2) Lésions confirmées.....	2
B. Hypothèses pathogéniques de l'athérosclérose.....	3
1) L'hypothèse monoclonale.....	3
2) L'hypothèse de la réponse à un traumatisme.....	3
3) L'hypothèse lysosomiale.....	3
4) L'hypothèse de l'infiltration lipidique.....	4
5) L'hypothèse de Steinberg (1987).....	4
<u>III. ENDOTHÉLIUM ET CELLULES ENDOTHÉLIALES</u> .....	5
A. L'endothélium.....	5
B. La cellule endothéliale.....	5
1) Structure.....	5
2) Fonctions.....	6
<u>IV. LES MONOCYTES, MACROPHAGES</u> .....	9
A. Origine des cellules mononucléées.....	9
B. Nomenclature.....	10
C. Morphologie du monocyte/macrophage.....	11
D. Physiologie du monocyte/macrophage.....	11
E. Régulation du système des phagocytes mononucléés.....	12
F. Rôles des cellules mononucléées.....	12
1) Rôle dans la réaction inflammatoire.....	12
2) Rôle dans l'immunité.....	13
<u>V. MONOCYTES/MACROPHAGES ET FORMATION DE LA CELLULE SPUMEUSE</u> .....	13
A. Origine cellulaire de la cellule spumeuse.....	13
B. Rôle des facteurs chimiotactiques.....	13
C. Monocyte/macrophage et métabolisme des LDL.....	14
D. Autres rôles possibles du macrophage dans l'athérogenèse.....	15

<u>VI. LES LIGNÉES MONOCYTAIRES.</u> .....	16
A. J774.....	16
B. U937 .....	16
C. HL60.....	17
<u>VII. LA LIPOPROTÉINE LIPASE.</u> .....	18
A. Structure. ....	18
B. Maturation et sécrétion. ....	19
C. LPL et l'endothélium.....	19
D. Sécrétion de LPL par les macrophages.....	20
<u>VIII. PHÉNOMÈNE DE DIACYTOSE DES GLOBULES BLANCS.</u> .....	20
<u>I. CULTURE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES.</u> .....	23
A. Mise en culture des cellules endothéliales.....	23
B. Passage des cultures primaires de cellules endothéliales.....	24
C. Passage des cellules endothéliales sur membrane amniotique.....	24
D. Coloration des cultures au rouge neutre.....	25
<u>II. CULTURE DES MACROPHAGES.</u> .....	26
A. Culture en suspension.....	26
B. Coculture de cellules endothéliales et de macrophages sur membrane amniotique. .....	26
<u>III. PERMÉABILITÉ À L'ALBUMINE</u> .....	27
A. Marquage de l'albumine à l'I125 (par la méthode de la chloramine-T).....	27
B. Perméabilité des cellules endothéliales ou de la membrane amniotique à l'albumine I125 .....	28
<u>IV. DOSAGE DES PROTÉINES.</u> .....	28
<u>V. DOSAGE DE LA LDH.</u> .....	29
<u>VI. MORPHOLOGIE</u> .....	30
A. Fixation des cultures pour la microscopie .....	30
B. Postfixation.....	30
C. Déshydratation. ....	30

D. Imprégnation et enrobage.....	32
E. Observation des coupes .....	32
F. Passage au point critique.....	32
<u>VII. TEST D'ADHÉRENCE AUX CELLULES ENDOTHÉLIALES DES MACROPHAGES MARQUÉS AU CR51 .....</u>	<u>33</u>
A. Marquage des macrophages .....	33
B. Adhérence des macrophages .....	33
<u>VIII. DOSAGE DE LA LPL.( NILSSON-EHLE, 1976) .....</u>	<u>34</u>
A. Préparation de l'émulsion stock.....	34
B. Préparation du substrat.....	34
C. Mélange réactionnel .....	35
D. Extraction des acides gras .....	35

I. Obtention de cellules endothéliales à partir de cordons ombilicaux. ....	39
II. Choix de l'amnios comme substrat des cellules.....	40
A. Composition en collagène et en fibréctine. ....	40
B. Composition en glycosaminoglycans. ....	42
III. Destruction de l'épithélium amniotique.....	43
A. Mise au point du traitement de l'amnios.....	43
B. Traitement mécanique. ....	43
IV. Montage des membranes amniotiques.....	45
V. Mise au point de la culture de cellules endothéliales sur membrane amniotique. ....	45
A. Utilisation de l'amnios désépithérialisé. ....	45
B. Ensemencement des cellules endothéliales sur membrane amniotique à partir des cultures primaires.....	46
VI. Mise au point de la détermination de la confluence des cultures.....	46
A. Coloration vitale. ....	46
B. Perméabilité à l'albumine.....	47
C. Mesure de la résistance électrique. ....	48
1) Mise au point d'une technique de mesure de résistance électrique. ....	48
2) Calcul de la résistance électrique de la monocouche. ....	50
3) Mode opératoire. ....	51
4) Résultats ....	51
5) Commentaire	
VII. Choix des cellules transformées.....	52

I. Aspects morphologiques.....	54
A Les lignées myélocytaires.....	54
B. Les cultures sur membranes amniotiques.....	54
1) Les membranes amniotiques.....	55
2) Les cellules endothéliales.....	55
3) Les cocultures.....	55
C Phénomène de diapédèse des monocytes/macrophages.....	57
1) Coculture de J774/cellules endothéliales.....	57
2) Coculture de U937/cellules endothéliales.....	57
II. Test fonctionnel.....	58
A.Dosage de la LPL en fonction du pH.....	59
1) Résultats.....	59
2) Commentaires.....	59
B. Dosage de la LPL en fonction du temps.....	59
1) Résultats.....	59
2) Commentaires.....	60
C.Dosage de la LPL après activation des lignées myélocytaires au PMA.....	60
1) Activation des J774.....	60
2) Activation des U937.....	62
3) Activation des HL60.....	62
D Dosage de la LPL après coculture de cellules endothéliales et de cellules de lignées myélocytaires.....	62
1) Résultats.....	62
2) Commentaires.....	62
E. Quantification de l'adhérence aux cellules endothéliales et de la diapédèse des lignées myélocytaires.....	63
2) Migration dans la membrane amniotique.....	63
F. Tests d'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales en coculture.....	64
1).Perméabilité à l'albumine.....	64
2)Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu.....	64
3) Commentaires.....	64

I. Coculture.....	65
II. Confluence des cellules endothéliales.....	66
III. Morphologie des lignées myélocytaires.....	66
IV. Diapédèse des globules blancs.....	67
V. Intégrité de l'endothélium. ....	67
VI. Dosage de la LPL.....	68

INTRODUCTION

Dans les pays occidentaux, les maladies cardiovasculaires sont responsables de la majorité des décès. En Belgique, pour 1981, la proportion des décès due aux maladies cardiovasculaires était de 44% suivie de loin par les cancers avec 24% de mortalité.

L'athérosclérose (affection différente de l'artériosclérose, qui, elle, est une manifestation normale du vieillissement lié à un épaissement diffus de l'intima) se caractérise par des modifications pathologiques des vaisseaux sanguins, principalement au niveau des artères de gros et moyen calibre.

## I. STRUCTURE DES VAISSEAUX.

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques bien différentes : l'intima, la média et l'adventice.

L'intima est caractérisée par un endothélium formé d'une monocouche de cellules aplaties, en contact direct avec le sang. Ces cellules reposent sur une membrane basale, qui les sépare d'une couche sous-endothéliale conjonctive dans les grosses artères élastiques et les artères soumises à de fortes tractions. Cette couche sous-endothéliale se développe avec l'âge (Robert, 1987). On y retrouve des fibroblastes (sécrétant, entre autres, des glycosaminoglycans (GAGs), de l'élastine et du collagène), des macrophages et des cellules musculaires lisses (SMC). Une limitante élastique interne sépare l'intima de la média.

La média est constituée de SMC, de fibres élastiques et de collagène, dans des proportions variables suivant le type de vaisseaux : aorte, artères ou veines.

L'adventice consiste en tissu conjonctif lâche. Elle est séparée de la média par la limitante élastique externe, beaucoup moins individualisée que la limitante élastique interne et faisant souvent défaut. Dans les grosses artères, l'adventice renferme de nombreuses fibres nerveuses (nervi vasorum) et de nombreux vaisseaux sanguins (vasa vasorum).

## II. L'ATHEROSCLEROSE.

Cette maladie chronique se caractérise au niveau de l'intima par "une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout étant accompagné de modifications de la média" (World Heart Organisation Study Group, 1958)

Les lésions apparaissent principalement au niveau des segments proximaux des artères musculaires naissant directement de l'aorte, au niveau des bifurcations et des courbes artérielles et parfois au niveau des reins et du mésentère. Curieusement, les artères des membres supérieurs ne sont généralement pas atteintes.

### A. Histopathologie de la lésion athéroscléreuse.

#### 1) Lésions initiales.

Les lésions initiales sont de deux types :

Des coussinets musculo-élastiques forment des épaisissements de la couche sous-endothéliale aux embranchements des vaisseaux. Ils sont constitués de SMC et de protéines fibreuses dont principalement l'élastine.

Des plaques gélatineuses forment des petites stries jaunâtres sur l'intima. Elles sont constituées de dérivés plasmatiques (albumine, fibrine,...) concentrés sous l'endothélium, avec apparition secondaire de macrophages et de cellules musculaires lisses.

#### 2) Lésions confirmées.

Les lésions athéroscléreuses sont définies suivant leur stade d'évolution.

Dès le plus jeune âge apparaît souvent au niveau de l'intima des artères, une série de petites tâches, peu saillantes, allongées dans le sens du courant. Parfois il s'agit déjà de véritables plaques, de coloration jaunâtre, de consistance molle, en relief sur l'intima. C'est la "strie lipidique" constituée principalement de cellules spumeuses (foam cell), macrophages contenant un grand nombre de gouttelettes lipidiques.

A partir de trente ans, au niveau des stries lipidiques se développent les "plaques fibreuses". Epaisissements circonscrits à l'intima, de coloration blanchâtre, aux contours mal définis, les plaques fibreuses sont composées principalement de cellules musculaires lisses et de conjonctif, entourant une zone nécrotique plus

profonde constituée de lipides, de cholestérol, et de débris cellulaires. Ce noyau lipidique constitue l'athérome.

Vis à vis des plaques, apparaissent des altérations de la limitante élastique interne.

Au stade évolutif suivant, la "plaque fibro élastique" forme une saillie au niveau de la lumière des vaisseaux, entraînant différents troubles ischémiques cliniques. La plaque fibrolipidique est formée d'une bouillie athéromateuse constituée de débris cellulaires et de lipides, entourés d'une structure plus dure qui envahit au fur et à mesure toute la plaque.

La "plaque compliquée" ou "calcaire", est caractérisée par l'apparition de dépôts calcaires qui englobent la totalité de l'implantation de la plaque. La plaque compliquée peut s'accompagner de thromboses, d'embolies ou d'anévrisme.

## B. Hypothèses pathogéniques de l'athérosclérose.

Différentes théories ont été proposées pour tenter d'expliquer la genèse de l'athérosclérose.

### 1) L'hypothèse monoclonale.

Benditt et al., en 1973 définissent la lésion comme un néoplasme bénin. La présence des cellules musculaires lisses dans l'intima s'expliquerait par une prolifération à partir d'une seule cellule transformée originaire de la média.

Cependant, il n'a jamais été établi si la multiplication des SMC est une cause ou conséquence des lésions.

### 2) L'hypothèse de la réponse à un traumatisme.

En 1976, Ross et Glomset reprennent la théorie proposée par Virchow au 19<sup>ème</sup> siècle, pour qui l'athérosclérose serait une réponse inflammatoire à une lésion de la paroi artérielle. Pour Ross et Glomset, l'hyperlipidémie, l'hypertension ou d'autres facteurs provoqueraient une altération de la barrière endothéliale, entraînant une agrégation des plaquettes. Celles-ci libèreraient le contenu de leurs granules (tel le PDGF : Platelet Derived Growth Factor), ce qui stimulerait la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses de l'intima.

Cependant, la mise à nu des structures sous-endothéliales n'est pas nécessaire pour le développement d'une strie lipidique. En général, la strie lipidique se développe sous un endothélium structurellement intact (Fagiotto et al., 1984;

Fagiotto et Ross, 1984). Ceci n'exclut pas d'éventuelles modifications fonctionnelles (Ross, 1986).

### 3) L'hypothèse lysosomiale.

En 1974, Peters et de Duve expliquent l'accumulation de cholestérol par une diminution de l'activité des estérases au niveau des plaques athéroscléreuses, entraînant une dégradation insuffisante des LDL (principales transporteurs de cholestérol dans le sang). Toutefois, il paraît plus probable que cette déficience soit une conséquence secondaire plutôt qu'un élément initiateur du processus

### 4) L'hypothèse de l'infiltration lipidique.

Selon cette hypothèse, la lésion est initiée par un dépôt de lipides dans l'intima. L'infiltration peut être causée par une concentration plasmatique élevée en lipoprotéines, principalement en LDL et en  $\beta$ VLDL. Cependant, les mécanismes et le rôle des LDL dans l'apparition de l'athérosclérose ne sont pas encore connus de façon précise.

Pour Carvalho et al.(1984), les LDL favorisent l'agrégation plaquettaire. Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques pour la cellule endothéliale (Munro & Cortan, 1988). L'action des lipoprotéines serait due à leur interaction avec d'autres systèmes responsables de l'apparition et du développement des lésions athéroscléreuses.

Pour Goldstein et Brown(1977), les LDL induiraient directement les lésions de l'athérosclérose par une pénétration anormale dans la paroi artérielle.

Cette hypothèse découle d'observations cliniques, génétiques ou expérimentales animales:

- Les personnes atteintes d'hypercholestérolémie familiale sont également atteintes d'athérosclérose de façon précoce.
- L'élévation de la cholestérolémie chez certains animaux entraîne l'athérosclérose.
- L'accumulation de cholestérol ainsi que la formation de cellules spumeuses (riches en gouttelettes lipidiques) au niveau des stries lipidiques (Stary, 1985) sont des caractères constants dans les lésions athéroscléreuses.
- Chez l'homme, la diminution de la cholestérolémie entraîne une réduction des accidents cardiovasculaires d'environ 20 % (Lipid Research, 1984).

### 5) L'hypothèse de Steinberg (1987).

L'hypothèse généralement acceptée actuellement est celle de Steinberg (1987) : une modification fonctionnelle de l'endothélium, lors d'une hypercholestérolémie ou par des monocytes, favoriserait la fixation des monocytes, leur diapédèse et leur maintien dans la couche sous-endothéliale conjonctive. Ces même monocytes, phagocytant l'excès de lipides (principalement le cholestérol), se transformeraient en foam cells.

### III. ENDOTHÉLIUM ET CELLULES ENDOTHÉLIALES.

#### A. L'endothélium.

L'endothélium est formé d'une monocouche de cellules pavimenteuses, aplaties. Il recouvre toutes les surfaces des tissus circulatoires formant l'interface entre le sang et les tissus interstitiels. La surface des cellules endothéliales occupe plus de 1000 m<sup>2</sup> (Jaffe, 1985). Chez l'homme adulte, le volume total des cellules endothéliales est comparable à celui du foie et pèse 1,5 à 2 Kgs (Engelberg, 1989).

Les cellules endothéliales des artères, des veines et des capillaires diffèrent par leur morphologie, leur ultrastructure et leur biochimie. De même, la structure de l'endothélium peut varier fortement suivant sa localisation dans les différents organes. Majno and Joris (1978) en ont proposé trois classes principales:

- l'endothélium continu
- l'endothélium fenestré
- l'endothélium discontinu

Quel que soit le type d'endothélium, les rôles qu'il assure sont toujours les mêmes. Parmi les caractéristiques communes, citons un rapport surface/volume très élevé, un métabolisme intense et une exposition continue de la surface des cellules endothéliales au sang circulant et à ses multiples constituants. Quant aux rôles qu'il assume, Cryer (1983) les définit comme étant

- une barrière à perméabilité sélective
- un système de synthèse participant aux fluctuations métaboliques
- ainsi qu'une thromborésistance de la paroi.

#### B. La cellule endothéliale.

##### 1) Structure.

Les cellules de l'endothélium mesurent 80 µm de long, 25 µm de large et de 3 à 1 µm d'épaisseur. Ces cellules contiennent les organites habituels, noyau ovoïde avec 1 ou plusieurs nucléoles, lysosomes, mitochondries, réticulum endoplasmique rugueux et lisse, appareil de Golgi périnucléaire important, nombreux corps multivésiculaires, les peroxyosomes y sont très rares ou absents. Elles contiennent aussi les corps de Weibel-Palade, (Weibel et Palade, 1964), structure de 3µm de long sur 0,1 µm de diamètre, composés de nombreux fins tubules d'environ 15 nm

d'épaisseur, arrangés parallèlement au plus grand axe. Ces corps de Weibel-Palade se retrouvent dans l'endothélium de plusieurs organes humains, mais leurs concentrations varient. Lorsque l'on approche du coeur, ils représentent 8 % du volume cytoplasmique contre 0,3 % au niveau des capillaires (Steinsiepe et Weibel, 1970). Ces corps de Weibel-Palade contiennent le précurseur du facteur VIII de coagulation.

Le cytosquelette, constitué de filaments intermédiaires, de filaments d'actine, de myosine et de microtubules est plus important dans les cellules artérielles et veineuses que dans les capillaires (AR).

On peut également diviser la cellule endothéliale en face luminale, face abluminale et face latérale, suivant certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles qui leur sont propres. (Wehrmacher, 1988).

La face luminale forme de nombreuses petites vésicules et est recouverte d'un coat constitué de GAGS, oligosaccharides, glycoprotéines et glycolipides. Sur cette surface, vient s'adsorber l'alpha-2 macroglobuline, les lipoprotéines, les lipases, la fibrine, le fibrinogène et l'albumine. La membrane présente des charges négatives tout comme les cellules sanguines, (dont les plaquettes), ce qui donne à l'endothélium un caractère antithrombogénique. Le rôle anti-coagulant est aussi assuré par une série d'inhibiteurs de coagulation tel l'antithrombine II, l'héparine cofacteur II, les protéines C et S également adsorbées à la surface des cellules.

La face abluminale présente moins de coated pits et de vésicules que la face luminale. On y trouve un nombre relativement plus important de filaments qui vont intervenir lors de la fixation des cellules endothéliales à la matrice de l'intima (cette fixation est primordiale pour que l'endothélium joue convenablement son rôle de barrière sélective) et lors de la formation des jonctions myoendothéliales. Cet important cytosquelette joue probablement un rôle dans la contractibilité de la cellule endothéliale.

Au niveau des faces latérales, il existe des "tight junctions" qui sont des zones d'attache entre deux cellules endothéliales jointives ainsi que des "gap junctions", formées de canaux adjacents d'environ 6 nm. de diamètre, qui sont des jonctions de communication entre cellules.

## 2) Fonctions.

### Face luminale.

## 1. Perméabilité sélective.

La surface luminale est différenciée en différents microdomaines suivant la répartition des sites anioniques, des GAGs, des sialoconjugués et des résidus monosaccharides responsables de plusieurs particularités physiologiques de l'endothélium. Elle joue probablement un rôle appréciable dans la perméabilité. Cette surface présente de nombreux sites anioniques qui n'apparaissent pas au niveau des sites de transcytose (Simionescu et al., 1981).

Cette surface présente des récepteurs pour les lipoprotéines de différentes densités: LDL, HDL, LDL acétylées, chylomicrons (Van Hinsberg et al., 1983; Brinton et al., 1985), l'angiotensine, l'insuline (Bar et al., 1978), l'épinephrine et la norepinephrine ("alpha-adrenergic-receptor"), l'acétylcholine, la sérotonine, l'histamine, les kinines et la thrombine

L'héparine, en occupant les récepteurs pour l'histamine, la bradykinine et la prostaglandine E1, diminue l'augmentation de perméabilité produite par ces molécules (Engelberg, 1988).

Des pits et vésicules interviennent dans l'endocytose des LDL médiée par récepteurs.

Les grosses particules sont endocytées par de grandes vésicules. Ces vésicules ne contiennent que peu de complexes de cholestérol; le cholestérol pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la membrane plasmique et dans la phase de séparation des vésicules lors de l'endocytose. A ces vésicules, on accorde un rôle important dans les phénomènes de transcytose puisqu'en fusionnant, elles produisent des canaux transendothéliaux de 20 à 40 nm de diamètre (Simionescu et al., 1975).

De nombreux enzymes sont présents à la surface des cellules endothéliales: monoamine oxidase, angiotensine I converting enzyme, lipoprotéine lipase fixée par interaction de charges (Wang-Iverson, 1984), alpha-2 macroglobuline qui protège l'endothélium de l'action de différentes protéases (Legrand, 1987).

## 2. Rôle antithrombotique de la face luminale.

Elle synthétise et sécrète le facteur VIII, la thrombospondine, le VWF (Jaffe, 1984), l'élastase. Elle produit la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) qui pourra agir sur le récepteur adénylcyclase des plaquettes et induire la production d'AMPc; ce dernier inhibera, non seulement le relargage des granules plaquettaires, mais aussi, l'agrégation susceptible d'être produite par l'ADP et le fibrinogène. Ainsi donc, la prostacycline, synthétisée par les cellules endothéliales grâce à la prostacycline

synthétase, inhibe l'agrégation plaquettaire et est vasodilatatrice (Levin et al., 1984). La synthèse de prostacycline est stimulée par la thrombine.

Lors d'une dégradation de l'endothélium, les cellules secrètent le facteur VIII de von Willebrand. Les plaquettes vont adhérer au facteur VIII qui reste associé à l'endothélium ou qui s'associe au collagène. Cette adhésion entraîne l'activation des plaquettes, la cascade de l'acide arachidonique avec formation de PGG2 et de TbA2. Le TbA2 accélère le processus de coagulation. Les plaquettes, par dégranulation, libèrent également du PDGF (Fox et diCorletto, 1984), de la thrombospondine (Jaffe et al., 1983), la bêta-thromboglobuline, le facteur 4 des plaquettes, le fibrinogène et la fibronectine.

Les cellules endothéliales secrètent un "tissue-type plasminogen-activator" (t-PA) en réponse à différents stimuli (Moscatelli et al., 1984). Il tend à augmenter le processus fibrinolytique au niveau du thrombus car son action est très vite inhibée par le "plasminogen activator inhibitor" (PAI). Un dysfonctionnement du PAI peut induire une augmentation du risque des maladies thromboemboliques. La concentration du PAI peut être augmentée lors d'hypertriglycémie, mais on ne peut établir de corrélation avec les autres facteurs de risque cardiovasculaires.

### 3. Rôle dans la réponse immunitaire.

Les cellules endothéliales peuvent également servir de cellules présentatrices d'antigène. Les interactions entre cellules endothéliales et leucocytes se font via des récepteurs spécifiques. Les cellules endothéliales secrètent un "colony-stimulating activity (CSA)" facteur qui agit sur les colonies granulocytes-macrophages.

Des antigènes HLA ont été identifiés à la surface des cellules endothéliales humaines (Gibofsky et al., 1983) de même que la présence d'antigènes Ia (Pober and Gimbrone, 1982).

### 4. Rôle dans l'athérosclérose.

Les cellules endothéliales sont probablement aussi les responsables de la modification des LDL, soit par oxidation des lipides (Steinbrecher, 1984) ou par dégradation de l'apo-B100 (Fong, 1987) ou par la production de dérivés actifs de l'oxygène (Steinberg, 1987).

Une nouvelle hypothèse fait intervenir une phospholipase C qui hydrolyse les LDL au niveau du pôle hydrophile de la liaison glycérol-phosphate. Les LDL ainsi modifiées sont dégradées deux fois plus rapidement que les LDL natives. (Suits, 1989)

### Face abluminale.

#### 1. Rôle dans la cohésion à la matrice extracellulaire.

Il existe des liens transmembranaires entre le cytosquelette de la cellule endothéliale et la matrice extracellulaire. On a remarqué qu'il existait un coalignement entre les filaments de la cellule et la fibronectine de la matrice extracellulaire.

L'heparan sulfate peut jouer un rôle dans l'adhésion des cellules par son interaction avec la fibronectine.

On considère généralement que l'adhésion des cellules endothéliales se fait par une série de protéines membranaires qui comportent une partie extracellulaire formée de récepteurs de surface qui s'associent aux filaments du cytosquelette dont les arrangements vont permettre l'étalement des cellules (Pytera, 1985; Rogalski, 1985).

#### 2. Rôle dans la régulation du tonus vasculaire.

L'endothélium joue aussi un rôle dans la vasodilatation des vaisseaux. Certains vasodilatateurs des cellules musculaires lisses ont une action indirecte, dépendante des cellules endothéliales. Ces vasodilatateurs entraîneraient la sécrétion, par les cellules endothéliales, de l'EDRF ("Endothelium-derived relaxing substances"); on sait actuellement que l'EDRF est l'oxide nitrique( Griffith, 1984 )

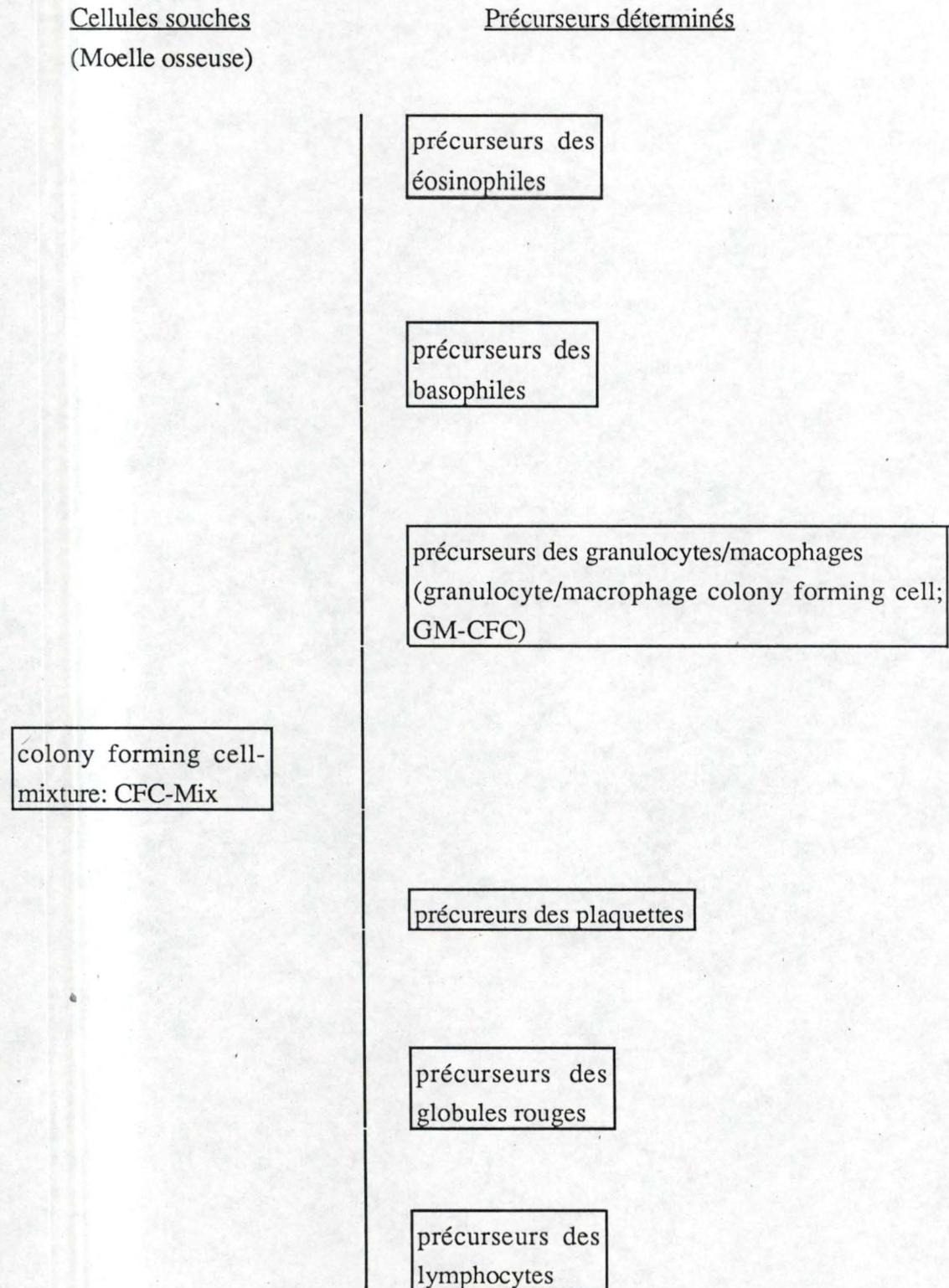
La cellule endothéliale secrète une protéine "PDGF-like" qui est mitogène pour les cellules musculaires lisses. Elle secrète également un facteur inhibiteur de croissance heparin-like pour les cellules musculaires lisses (Castello, 1984).

Les cellules endothéliales limitent, par leur perméabilité sélective, le passage de la thrombospondine vers la matrice extracellulaire.

### IV. LES MONOCYTES, MACROPHAGES.

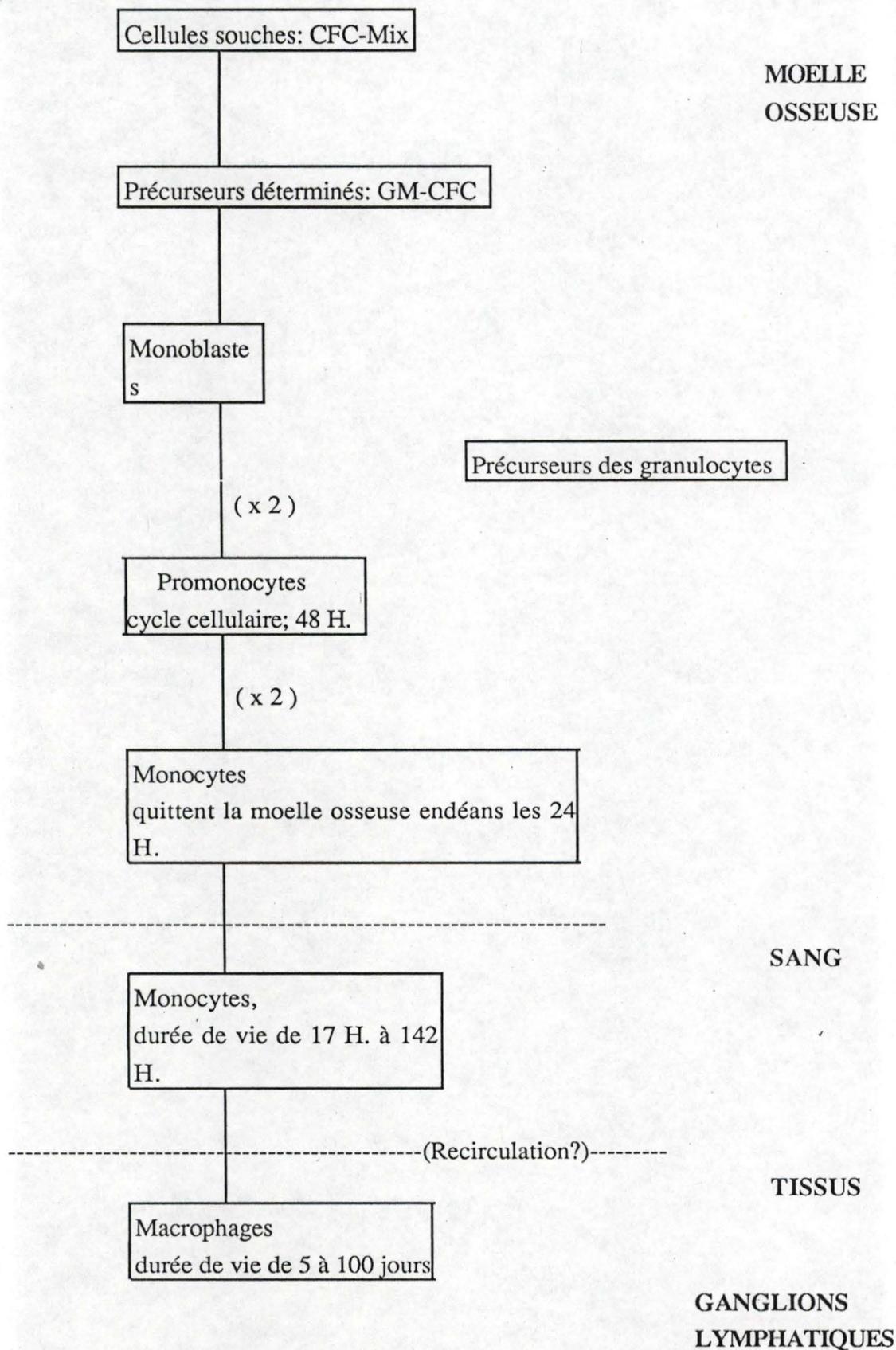
Les cellules phagocytaires sont constituées des leucocytes, divisés en cellules polymorphonucléaires et cellules mononucléaires jadis considérées comme faisant partie du système réticulo-endothélial. Van Furth (1980) définit les cellules mononucléaires comme un système de phagocytes mononucléés à haute activité

Tableau 1: Le système hématopoïétique.



(Dexter, 1983)

Tableau 2: La lignée monocyttaire.



phagocytaire suivant des critères morphologiques, fonctionnels et une origine commune. Les promonocytes, les monocytes et les macrophages font partie de ce système.

#### A. Origine des cellules mononucléées.

Les phagocytes mononucléés forment une lignée cellulaire originaire des cellules souches de la moelle osseuse (Van Furth, 1978) (tableau 1) Dans la moelle osseuse, des cellules souches se différencient en deux promonocytes (les promonocytes représentent 0,25 % de la moelle osseuse), puis, en 4 monocytes qui vont pénétrer dans le sang et y circuler pendant en moyenne 32 heures (17 à 142 heures). Ils représentent de 4 à 8 % des leucocytes sanguins. Les monocytes vont se différencier en macrophages après leur pénétration dans les tissus (tableau 2). On trouve des macrophages dans divers tissus, soit libres, soit fixés. On pense que les macrophages peuvent persister dans les tissus de 5 à 100 jours. On leur a attribué des noms différents suivant leur localisation (par ex., les cellules de Kupffer sont les macrophages du foie (Van Furth and Sluiter, 1983)).

Les monocytes et les macrophages se divisent très peu, puisque moins de 5% incorporent de la thymidine tritiée. (Van Furth, 1978). La population de macrophages se maintient donc presque uniquement par un influx de monocytes. On observe parfois une faible prolifération locale due à la présence de cellules immatures en division (e.g. promonocytes).

Il n'est pas certain que les macrophages puissent retourner dans la circulation mais on croit qu'ils peuvent migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques. Van Furth et Sluiter (1983) ont montré qu'il n'y avait pas de macrophages dans la lymphe efférente, donc, il est très probable qu'ils meurent dans les ganglions lymphatiques.

#### B. Nomenclature.

Une nomenclature des cellules provenant d'exsudats inflammatoires a été proposée par Van Furth en 1980. Il distingue les:

- macrophages résiduels : constitués de macrophages au repos localisés dans les différents tissus,
- macrophages exsudés : qui sont des macrophages tissulaires possédant encore certaines caractéristiques monocytaires.

-macrophages activés : qui présentent une activité accrue suite à un stimulus; soit une augmentation d'une fonction préexistante (phagocytose, production de lysozyme, synthèse de superoxydes, activité peroxidasique, poussée respiratoire), soit l'apparition d'une nouvelle fonction.

-macrophes stimulés : qui sont des macrophages qui se multiplient ( par exemple, suite à l'action de thioglycollate) ou qui fusionnent en cellules géantes ou épithélioïdes par action de mycobactéries, d'adjuvant huileux ou minéral

Pour d'autres auteurs (Finbloom, 1985; North, 1978), la notion de macrophages activés et stimulés a un sens plus précis. Les macrophages activés sont des cellules qui se retrouvent chez des animaux sensibilisés à des antigènes spécifiques (ex.: l'endotoxine). Comme leur nom l'indique, ils sont généralement plus actifs que les macrophages résidents. Ainsi, seules les cellules activées possèdent une activité anti-tumorale. Le terme de "macrophage stimulé" est utilisé pour décrire les cellules isolées d'un animal après administration d'une substance irritante non spécifique( ex.: l'huile minérale). Les cellules activées et (dans une moindre mesure) les cellules stimulées ont un pouvoir phagocytaire supérieur à celui des macrophages résidents (Edelson, 1975; Finbloom, 1985).

### C. Morphologie du monocyte/macrophage.

Lors de la différenciation des monoblastes en macrophages, des modifications morphologiques des cellules se produisent (Musson,1984).

Les monoblastes possèdent un noyau de grande taille, contenant une chromatine dispersée, ainsi qu'un nucléole bien visible. Les organites sont peu développés, mais le cytoplasme présente un grand nombre de ribosomes et polyribosomes (Tanaka et Goodman, 1972).

Les promonocytes sont des cellules de 14 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre, dont le rapport nucléocytoplasmique est supérieur à 1. Le noyau est le lieu de synthèse important de l'ADN. Le cytoplasme présente un grand nombre de polyribosomes et de mitochondries, un Golgi développé, peu de lysosomes et d'endosomes. La membrane plasmique forme des villosités.

Les monocytes sanguins ont un diamètre compris entre 10 et 14  $\mu\text{m}$ . Le rapport nucléocytoplasmique est plus ou moins égal à 1. Le noyau est réniforme, à synthèse d'ADN faible. Le cytoplasme ne présente pas beaucoup d'organites .

Les macrophages sont des cellules de 18 à 25  $\mu\text{m}$  de diamètre. Leur rapport nucléocytoplasmique est inférieur à 1. Le cytoplasme possède une forte concentration en mitochondries, lysosomes et vésicules d'endocytose. La surface est augmentée par la formation de lamellipodes.

Tableau 3: Facteurs intervenant dans la régulation de la prolifération des phagocytes mononucléés.

Facteur	Source	Effet	Référence
FIM Facteur augmentant la monocytopenèse	macrophages	stimule la prolifération des monocytes	Van Furth et Sluiter 1983
MPI facteur inhibant la production de monocytes	sérum	inhibe les promonocytes	Van Furth et Sluiter 1983
MIF facteur inhibant la migration	lymphocytes	inhibe la transformation monocyte/macrophage	Sorg et al. 1984
CSA colony stimulating activator	lignées de macrophages leucémiques	stimule la production de phagocytes mononucléés	Ascensao et Mickman 1984

Tableau 4: Facteurs intervenant dans la maturation des phagocytes mononucléés.

Facteur	Effet	Cellule cible	Référence
Esters de phorbol	stimulation	lignée monoblastique humaine	Hattori 1983
acide rétinoïque	stimulation	lignée monoblastique humaine	Hattori 1983
Interféron	inhibition	monocytes humains	Becker 1984

Ainsi donc, on peut récapituler les changements morphologiques qui se produisent pendant la différenciation des monocytes en macrophages in vitro:

- augmentation du nombre de lysosomes (Goldstein, 1954)
- augmentation du nombre de vacuoles lipidiques (Goldstein et Mc Cormick, 1951)
- augmentation des ondulations et des projections membranaires sous forme de microvillosités et de filopodes (Zucherman et al., 1979)
- accroissement de la taille des cellules en parallèle avec leur maturation (Johnson et al., 1977)

#### D. Physiologie du monocyte/macrophage.

Le monocyte circulant est, en général, considéré comme le précurseur du macrophage tissulaire; cependant, la nature de cette conversion phénotypique in vivo reste inconnue. La différenciation des monocytes en macrophages a été étudiée in vitro et plusieurs modifications physiologiques ont été observées: perte de l'activité myéloperoxydasique (Johnson et al., 1977), augmentation de l'activité de la phosphatase acide (Fisher et al., 1976), augmentation de l'activité de la 5'nucléotidase (Johnson et al., 1977), forte augmentation de la sécrétion de lysozyme (Johnson et al., 1977) et de l'alpha-2 macroglobuline (Littman et Ruddy, 1977), augmentation de la dégradation des LDL acétylées ou des LDL complexées au dextran sulfate suite à l'expression de récepteurs scavengers (Knight et Soutar, 1982). Les macrophages conservent plusieurs caractéristiques du monocyte comme, par exemple, les récepteurs membranaires Fc et C3 et le pouvoir de phagocytose ou l'activité pinocytaire (Davies et Lloyd, 1987).

#### E. Régulation du système des phagocytes mononucléés.

On sait que les facteurs de croissance sont nécessaires pour la prolifération des phagocytes mononucléés. On connaît le facteur de croissance CSF qui est indispensable à la formation des colonies de granulocytes ou des macrophages à partir de GM-CFC (Stanley, 1983). Un certain nombre d'autres facteurs sont également impliqués dans la régulation de la prolifération de ces cellules: ils sont repris dans le tableau 3

D'autres facteurs stimulent ou inhibent la maturation du monocyte en macrophage (cfr. tableau 4).

## F. Rôles des cellules mononucléées.

### 1) Rôle dans la réaction inflammatoire.

Les macrophages sécrètent différentes substances qui permettent la réaction inflammatoire et la phagocytose de l'"étranger".

Les macrophages sécrètent des enzymes, soit, de manière constitutive, comme le lysozyme ou la LPL, soit, après activation, comme l'activateur du plasminogène, des protéinases neutres ou cytolytiques (Adams, 1980), des collagénases (Mainardi, 1980) et de l'élastase (Werb, 1975).

Les macrophages sécrètent également de l'alpha-2 macroglobuline inhibiteur de protéinase (Movieta, 1977) et un inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Champan et al., 1981). Les macrophages ont donc un rôle de régulation de leurs propres activités.

Le macrophage produit également des protéines plasmatiques tels les composants du complément (Bentley, 1981), des facteurs de coagulation (Osterudal et al., 1981), la fibronectine (Alitado et al., 1980), l'alpha-2 macroglobuline, (Hovi, 1977) ou l'apoprotéine E (Takemura, 1984).

Ils synthétisent des dérivés actifs de l'oxygène, des prostaglandines et du PAF qui interviennent aussi dans les réactions inflammatoires, des facteurs de croissance, de l'interféron (Fleit, 1984), des facteurs cytotoxiques (Bas et al., 1974) et mitogènes (Martin, 1981) qui augmentent la croissance des fibroblastes et des cellules endothéliales.

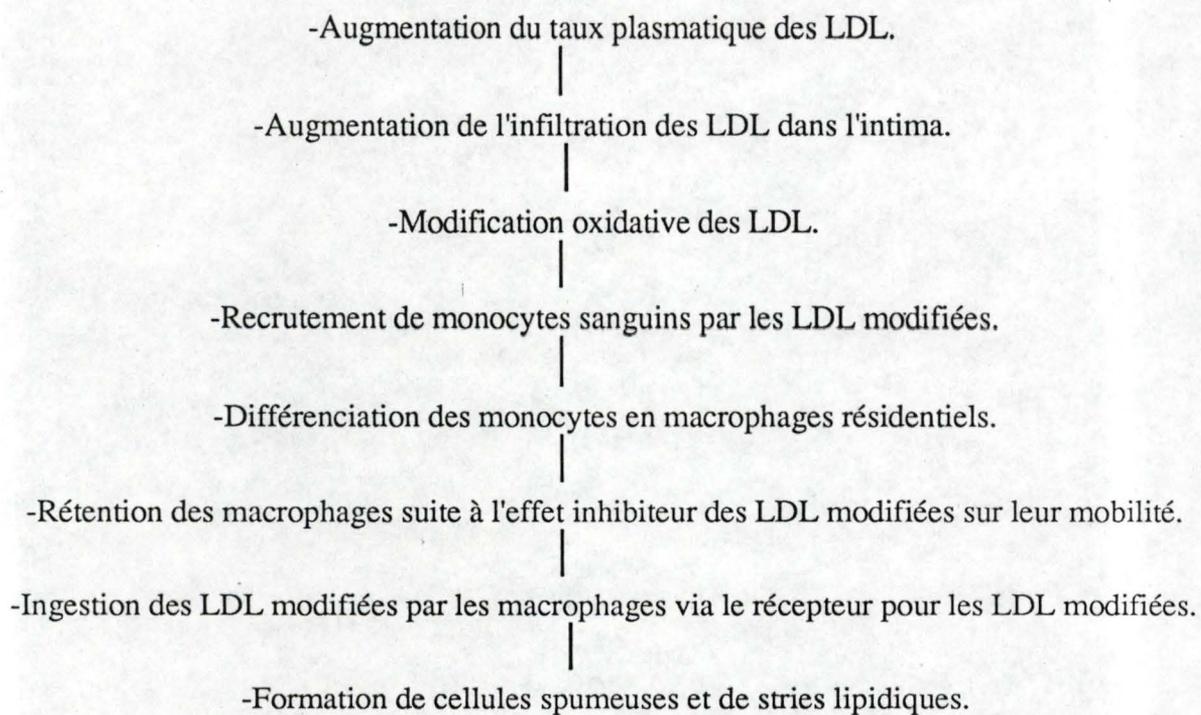
### 2) Rôle dans l'immunité.

Dans l'immunité humorale, les macrophages jouent le rôle de cellules présentatrices de l'antigène en associant des fragments d'antigènes à Ia, de plus, ils sécrètent le LAF (lymphocyte activating factor) et l'interleukine-1.

Ils jouent un rôle cytotoxique par action directe, associés aux protéines du complément ou par opsonisation des anticorps grâce au récepteur Fc. Les activateurs cytotoxiques diminuent la réponse chimiotactique (voir paragraphe subséquent) et augmentent l'activité phagocytaire (Mettzer, 1978). Harold (1978) explique l'action des LPS (activateur cytotoxique) par une modification membranaire du macrophage.

Le rôle phagocytaire des macrophages implique une adsorption des particules à la surface de la membrane plasmique grâce à des récepteurs membranaires ou des interactions de charges, suivie d'une internalisation dans laquelle les filaments

Tableau 5: Formation de la cellule spumeuse à partir du monocyte sanguin.



(Steinberg, 1987).

d'actine et de myosine sont impliqués. (Genda, 1969). Les particules ingérées sont digérées ou persistent.

## V. MONOCYTES/MACROPHAGES ET FORMATION DE LA CELLULE SPUMEUSE.

### A. Origine cellulaire de la cellule spumeuse.

Des études récentes démontrent que la plupart des cellules spumeuses proviennent de monocytes circulants qui adhèrent à l'endothélium et pénètrent dans l'espace sous-endothélial (Anitschow, 1937; Fowler et al., 1980; Gerrity, 1981; Watanabe et al, 1985; Rosenfeld et al, 1987, Shaffner, 1980).

### B. Rôle des facteurs chimiotactiques.

Les facteurs qui induisent le passage et la rétention du monocyte/macrophage dans la paroi artérielle ne sont pas encore bien connus. On a identifié et caractérisé de nombreux facteurs chimiotactiques pour les monocytes parmi lesquels citons : la thrombine (Bar-Shavit et al., 1983), l'activateur du plasminogène (Gallin et Kaplan, 1974), la fibronectine (Norris et al., 1982), le PDGF (Denel et al., 1982), le C5 du complément (Snyderman et al., 1971), la kallikréine (Gallin et Kaplan, 1974) et des fragments d'élastine et de collagène (Hunninghake et al., 1981). Gerrity et al. (1985) ont rapporté que des extraits d'aorte de porc (prélevés dans des zones athérogènes) manifestent une activité chimiotactique pour des monocytes isolés de cochons hyperlipidémiques (mais non pour des monocytes isolés de cochons normolipidémiques).

Selon Steinberg, les monocytes sont attirés dans l'intima par action chimiotactique des LDL modifiées lors de leur passage à travers l'endothélium. (Quinn et al., 1987). Ces monocytes se transforment alors en macrophages et la phase finale est une phagocytose intensive des LDL modifiées grâce à la présence de récepteurs scavengers qui induisent la formation des cellules spumeuses (constituant principal des stries lipidiques) (cfr. tableau 5). La modification des LDL est probablement due aux radicaux libres car ces modifications sont totalement inhibées par la présence d'antioxydants tels que l'alpha-tocophérol ou le BHT (Evenson et al., 1983; Morel et al., 1983).

Cette modification consiste en une peroxydation lipidique, une hydrolyse de la phosphatidylcholine en lysophosphatidylcholine (due à l'activité de la phospholipase A2 associée aux LDL après oxydation des acides gras en position 2 (Sevanion, 1983)) et une dégradation de l'apoprotéine B (Steinbrecher et al., 1984; Parthasarathy et al., 1985;).

L'hydrolyse des acides gras oxydés en position 2 pourrait augmenter la propagation de la peroxydation des phospholipides conduisant ainsi à un cercle autocatalytique.

La pénétration des monocytes est précédée par l'attachement aux cellules endothéliales. Cette adhérence est augmentée, *in vivo*, lors d'hypercholestérolémie chez le rat (Roger, 1986) et, *in vitro*, par un enrichissement du milieu en cholestérol dans des cultures de cellules endothéliales bovines (Alderson, 1986). Le mécanisme reste inconnu, mais implique des molécules d'adhésion leucocytaires (complexe Ag CD<sub>w</sub>/18) et endothéliales (Endothelium Leucocyte Adhérence Molécule, E-LAMS).

### C. Monocyte/macrophage et métabolisme des LDL.

Une modification biologique des LDL se produit si l'on incube des LDL natives avec des macrophages (Parthasarathy et al., 1986), des monocytes (Cathcart et al., 1985), des cellules musculaires lisses (Heinecke et al., 1984, 1986) ou des cellules endothéliales en culture (Henriksen et al., 1981, 1983, Steinbrecher et al., 1987)

In vivo, la modification des LDL ne peut se produire ni dans le plasma, ni dans l'intima car, d'une part, les LDL modifiées sont éliminées très rapidement par le foie et, d'autre part, par la présence d'antioxydants. La présence de LDL modifiées a pourtant été observée dans les lésions athéroscléreuses humaines. On peut expliquer leur production par l'existence, dans l'intima, de microenvironnements très localisés-formés par le contact intime entre des macrophages et des cellules endothéliales- auxquels les antioxydants n'auraient pas accès.

Il faut remarquer que, in vitro, l'addition de LDL modifiées inhibe la sécrétion de facteurs chimiotactiques par les cellules endothéliales (Quinn et al., 1987). Mais Steinberg a montré que les LDL modifiées comportent des lipides chimiotactiques pour les monocytes et possèdent une activité inhibitrice de la mobilité pour les macrophages résidentiels, même en présence de C5a (Quinn et al., 1987).

Les LDL modifiées auraient donc un rôle de recrutement et de rétention des macrophages .

Les macrophages dégradent principalement les LDL modifiées. En effet, la formation de cellules spumeuses est possible par incubation de macrophages en présence de LDL modifiées par acétylation (Brown et al., 1979), acétoacétylation, incubation en présence de cellules endothéliales (Henriksen, 1981) ou incubation avec la phospholipase-C (Suits et al., 1989).. Les LDL modifiées sont dégradées 3 à 10X plus rapidement par les macrophages que les LDL natives. Les LDL modifiées sont cytotoxiques, non seulement, pour les cellules endothéliales, mais aussi, pour les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. ( Henriksen, 1979, Hessler, 1983 ). Les macrophages pourraient donc être responsables de la nécrose centrale des plaques athéroscléreuses.

#### D. Autres rôles possibles du macrophage dans l'athérogenèse.

Outre leur participation à la formation de cellules spumeuses et leur rôle dans la modification des LDL, les macrophages sécrètent de l'IL1 (Bevilacqua et al., 1985) et du TNF qui induisent la synthèse, par les cellules endothéliales, de molécules d'adhésion pour les leucocytes. Par la synthèse de substances qui favorisent leur pénétration dans l'intima, l'action des macrophages est autocatalytique.

Ils sécrètent également du LTB<sub>4</sub>, du C3a, du transforming growth factor- $\beta$ , (Wahl et al., 1987), du granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Wang et al., 1987) et du PDGF (Denel et al., 1982) qui sont, de même que l'IL-1 et le TNF, des facteurs chimiotactiques pour les monocytes.

Les macrophages peuvent endommager le tissu conjonctif et les cellules mésenchymateuses. par l'action de protéases et de dérivés actifs de l'oxygène (Werb et al., 1980).

Les macrophages (comme les plaquettes) produisent de l'acide 12 hydroxyeicosatétraénoïque dont la sécrétion est stimulée par les LDL modifiées et qui est un facteur chimiotactique pour les cellules musculaires lisses (Nakao et al., 1982). Ils auraient donc aussi un rôle dans la formation de la plaque fibreuse.

#### VI. LES LIGNÉES MONOCYTAIRES.

**Tableau 3-3:** Caractères différentiels de quelques cellules de la lignée monocyttaire.

	Monocytes sanguins	J774	U937	HL60
Adhésion au plastique	+	+	-	-
Adhésion après stimulation au PMA	+	+	+	-
Récepteurs LDL	+	+	+++	?
Récepteurs LDL modifiées	+++	+++	+	?

#### A. J774.

Les J774 sont des cellules lymphoblastoïdes d'origine murine qui possèdent les propriétés des macrophages. Elles sont faciles d'utilisation car les lignées cellulaires sont homogènes et abondantes.

Les J774 sont des cellules arrondies d'environ 10  $\mu\text{m}$ . de diamètre. Le noyau est arrondi, légèrement excentrique ou lobulé; il contient généralement deux ou trois nucléoles. Les cellules activées contiennent un grand nombre de vacuoles dans leur cytoplasme. Au microscope électronique, le noyau présente fréquemment une ségrégation des constituants. Au microscope à balayage, les cellules sont recouvertes de lamellipodes.

La réponse chimiotactique de la lignée J774 est identique ou supérieure à l'activité similaire des macrophages péritonéaux non stimulés. De même, la migration de ces cellules est semblable à celle des cellules nonstimulées.

L'activité phagocytaire de la lignée J774 est environ 2 à 4 x supérieure à celle des macrophages non stimulés, mais inférieure à l'activité des macrophages stimulés à la PHA.

Quant aux activités enzymatiques, elles sont supérieures à celles des macrophages non stimulés, mais l'augmentation varie selon l'enzyme considéré: par exemple, elle est 4 x plus importante pour la bêta-glucoronidase et 2,3 fois seulement pour la phosphatase acide (Snyderman et al., 1977).

Ces cellules expriment une activité du récepteur pour les LDL-acétylées beaucoup plus importante que celle du récepteur pour les LDL normales, cependant présent sur ces cellules .

#### B. U937

Les U937 sont des cellules humaines provenant d'un lymphome histiocytaire établi par Sundstrom et Nilson (1976).

Au microscope optique, les cellules apparaissent rondes ou polygonales. Les U937 ont un diamètre compris entre 8,1 et 16,9  $\mu\text{m}$ ., avec un cytoplasme modeste contenant un grand nombre de granules eosinophiles, et quelques vacuoles. Le noyau de forme variable, parfois lobulé, contient un ou plus rarement deux nucléoles. La chromatine y est grossièrement granuleuse.

Au SEM, la plupart des cellules U937 sont rondes présentant à leur surface plusieurs blebs et quelques projections lamellaires.

Le TEM permet de remarquer, dans le cytoplasme, des mitochondries gonflées, un appareil de Golgi bien développé, un réticulum endoplasmique peu abondant et de nombreux polysomes libres (Sundström et Nilson, 1976).

#### Origine histiocytaire:

En surface, les cellules possèdent des récepteurs Fc et C3, mais ne possèdent ni ne sécrètent un récepteur Ig. Les U937 sécrètent du lysosyme et des  $\beta$ 2-microglobulines. Elles possèdent une activité phagocytaire importante et une forte activité estérasique (Sundström et Nilson, 1976).

La lignée U937 non stimulée présente les mêmes caractéristiques acide estérasique que les monocytes sanguins non stimulés. Après activation au TPA (12-O tétradécanoylphorbol-13-Acétate), l'activité acide estérase est totalement analogue à celle de macrophages péritonéaux (H. Kreip, 1986).

Les U937 ne possèdent pas d'activité anti-tumorale (anticorps indépendante) inductible (Koren, 1981).

Ces cellules expriment une importante activité du récepteur pour les LDL et une faible activité du récepteur pour les LDL-acétylées. En effet, ces cellules sont auxotrophes pour le cholestérol (Esfahani et al., 1986).

#### C. HL60.

Les HL60 sont une lignée prémyélocytaire dont 10% de la population se différencie spontanément en polymorphonucléaires neutrophiles et, dans une moindre mesure, en macrophages (Collin, 1977).

Les HL60 sont des cellules de 9 à 25  $\mu$ m de diamètre (moyenne de 13  $\mu$ m). Elles contiennent un noyau rond, généralement excentré avec une hétérochromatine qui tend à devenir chromatine marginalisée et contenant de 2 à 4 nucléoles. Le cytoplasme est basophile et héberge parfois quelques granules azurophiles. Les cellules différenciées en monocytes présentent un noyau en fer à cheval et un cytoplasme pâle.

Elles ne présentent pas de marquage pour la phosphatase alcaline (marqueur des neutrophiles). Elles présentent un marquage pour le PAS et occasionnellement, pour les phosphatases acides, mais pas pour l'alpha-naphtol A-S-D acétate estérase.

Puisque 10 % de la population se différencie spontanément, on a une population hétérogène contenant des promyélocytes, des myélocytes, des promonocytes, des monocytes, des neutrophiles.

Tableau 6: Masse moléculaire de la lipoprotéine lipase isolée de différents tissus et d'espèces différentes.

Source	Espèces	Poids moléculaire	Activité spécifique (pmole ng <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Plasma post-héparine	humaine	67000	160
		62500	50
		77000	30
	rat	37000	50
		69250	70
	Coeur	humaine	60000
rat		60000	5
		34000	10
porc		73000	10
Tissus adipeux		rat	67000
	56000		280
	porc	60000	60
	poulet	73900	1540
Lait	humaine		85
	bovine	48300	620
		55000	480
	cochon d'inde	62000	580
Aorte	bovine	60000	60

D'après Smith L.C. and Pownall H.J.(1984).

Des études cytogénétiques révèlent des mitoses aneuploïdes avec formation de 45 (20%) ou 46 (5%) chromosomes (entre 43 et 48 chromosomes suivant l'âge des cultures).

Les HL60 présentent le récepteur Fc et C3b ainsi que l'Ag HLA, HLA Bw17 à tous les passages, HLA A1 prédominant et HLA A2 , variable.

Elles synthétisent et sécrètent du lysozyme mais à une concentration moindre que les cultures de monocytes sanguins.

La déoxynucléotidyl transférase, un marqueur pour les lymphocytes T, n'est pas présente. Elles ne possèdent pas de transcriptase inverse..

La présence de virus Herpes ou de retrovirus n'a pu être mise en évidence.

Dix pour cent des cellules jouissent d' une activité phagocytaire, ce qui représente la même proportion que les cellules qui se différencient. Elles présentent une activité chimiotactique analogue à celle des neutrophiles matures.

## VII. LA LIPOPROTEINE LIPASE.

La lipoprotéine lipase est une glycoprotéine qui a pour rôle d'hydrolyser les triglycérides.

Elle est d'un PM d'environ 60.000 chez l'homme ( cfr tableau 6 ) et de 120.000 pour la protéine active chez le rat soit deux sous-unités de 55.000 de PM. La Km varie suivant les tissus: Km = 0,07 mM dans le coeur et Km = 0,7 mM. pour les adipocytes de rat (Fielding, 1977)

La LPL est secrétée par de nombreux tissus, que ce soit le tissu adipeux (Cisar et al., 1989), les cellules musculaires lisses (Vance et al., 1982; Jonasson et al., 1987) et squelettiques (Hollenberg, 1960) ou d'extrait de coeur. On la retrouve également à faible concentration dans le sang et à la surface des cellules endothéliales.

Elle a été localisée dans différentes espèces animales, aussi bien chez les mammifères que chez les poissons et les oiseaux.

### A. Structure.

La LPL mature est une glycoprotéine à liaison N glycosidique, contenant 8 % de glucides chez l'homme ( de 3 à 8,5% selon les espèces et l'origine tissulaire) dont 2% de galactose, 2% de mannose, 3% de glucosamine et 1% d'acide sialique mais pas de galactosamine.

Comme l'ont démontré Bengston et Olivecrona, le Pi des LPL n'a pu être défini car, suivant les conditions expérimentales, l'enzyme forme avec l'ampholite un complexe qui se stabilise à Pi intermédiaire de l'ampholite

La LPL hydrolyse préférentiellement les triglycérides, mais elle peut aussi dégrader des monoglycérides et des phospholipides. Quel que soit le substrat, le site actif de la protéine est le même ( Twu et al., 1976) et l'hydrolyse se fait spécifiquement pour tous les substrats au niveau de la liaison ester.

### B. Maturation et sécrétion.

Plusieurs travaux ont tenté de déterminer le mécanisme de maturation et sécrétion de la LPL.

Vannier (1986) a remarqué que le traitement des cellules au carboxylcyanide-m-chlorphenyl-hydrazone (CCCP) qui inhibe le passage entre RES et Golgi, entraîne une accumulation de LPL dans le réticulum. La tunicamycine qui diminue (50%) l'incorporation de mannose dans la protéine, entraîne l'accumulation d'une protéine inactive, non sécrétable (Friedman, 1987). Quant au traitement des cellules à la monensine, il bloque l'élaguage d'un intermédiaire riche en mannose, entraînant l'accumulation d'une enzyme active mais non sécrétable.

On peut donc admettre que ,si la glycosilation est nécessaire à l'activité de l'enzyme, la glycosylation terminale a pour rôle de permettre la sécrétion de l'enzyme.

### C. LPL et l'endothélium.

La LPL, que l'on retrouve au niveau de la face luminale de l'endothélium, provient probablement des SMC de l'intima et de la média ainsi que des monocytes dérivés de macrophages. Le passage de la cellule sécrétrice à la surface des cellules endothéliales reste encore inconnu. Il pourrait se faire soit par transcytose, (Williams et al., 1984) soit, comme le propose Anderson et Farnbrouhh ( 1982), par diffusion latérale, en longeant les membranes de cellules en cellules.

#### Site de fixation.

Williams (1985) a montré qu'après trypsinisation, la fixation des LPL à la surface de l'endothélium est diminuée. Il faut donc admettre que l'enzyme s'adsorbe

au niveau des chaînes de glycosaminoglycans. L'affinité de la LPL pour les différents GAGs a été déterminée par Bengtsson et Olivecrona (1980). La LPL se fixe préférentiellement sur (par ordre d'affinité décroissante) l'héparine, l'héparan sulfate, les dermatan sulfates et la chondroïtine sulfate (Margelin et al., 1989). L'héparan sulfate serait le principal site de fixation de la lipoprotéine lipase sur les cellules endothéliales (Cheng 1981) à raison de 1,24 E11 molécules d'enzyme pour 5,3 E11 chaînes d'héparan sulfate (Williams, 1984)

#### D. Sécrétion de LPL par les macrophages.

Mahoney (1982) a observé la synthèse et la sécrétion de LPL par des monocytes récemment isolés et mis en culture. Pour Mahoney, la sécrétion de LPL par les macrophages est constitutive et apparaît lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Une partie des LPL synthétisées est fixée à la surface des macrophages (I.J. Golberg, 1988) Elle joue peut être un rôle lors de l'endocytose. Aviram (1988) a, en effet, montré que les LDL sont modifiées par la LPL et que ces LDL-LPL modifiées ont une vitesse d'endocytose deux fois plus rapide que les LDL natives. Il est probable que la LPL réduit la concentration en triglycérides des LDL, ce qui modifie la présentation du domaine de fixation LDL-récepteur des apolipoprotéines B. Cette modification favorise la reconnaissance par les récepteurs natifs et l'endocytose cellulaire. La sécrétion de LPL par les macrophages péritonéaux résidents de souris peut être modulée par une série de stimulés: le thioglycollate et l'huile minérale augmentent la sécrétion de LPL, respectivement 10 et 6 fois. Par contre, la sécrétion de LPL est inhibée de 30% par une concentration en LPS de 1ng/ml et de 68% par 500ng/ml. Le TNF inhibe la sécrétion de LPL par les macrophages. (Goldberg et al, 1987)

Les J774 sécrètent aussi la LPL (Khoo et al., 1981). Cette LPL est identique à celle qui est produite par les macrophages normaux; elle est dépendante de l'apo C2, inhibée à 90% par le NaCl et le Protamine sulfate à 0,5 M et retenue sur gel héparine-sépharose (Mahoney, 1985). Le taux de synthèse et de libération de LPL par les J774 est fonction de la densité des cellules et du temps d'incubation des cellules depuis le dernier changement de milieu. La concentration optimale de synthèse et de sécrétion de LPL est réalisée à partir de 1 à 1,5 10<sup>6</sup> cellules par millilitre (Goldman, 1989).

Chez les J774, le TNF n'a pas d'influence sur la sécrétion de LPL (Friedman 1988).

Ni les U937, ni les HL60 ne secrètent de LPL de manière constitutive et jusqu'à présent, la synthèse de LPL par ces lignées myélocytaires n'a pu être mise en évidence.

#### VIII. PHÉNOMÈNE DE DIACYTOSE DES GLOBULES BLANCS.

La réaction inflammatoire est une réaction qui intervient dans de nombreux états pathologiques. Elle se caractérise, dans sa phase primaire, par une augmentation de la perméabilité de l'endothélium et par l'extravasation des globules blancs (d'abord les PMN, puis les monocytes qui, dans les tissus, vont se différencier en macrophages et enfin, les lymphocytes). L'extravasation commence par l'adhérence des globules blancs aux cellules endothéliales (voir chapitre concernant l'adhérence des différentes lignées) suivie de leur passage à travers l'endothélium.

Le passage à travers l'endothélium se fait au niveau des jonctions cellulaires. Plusieurs études (Hurley, 1984), (Lewis and Granger, 1986) ont montré que la perméabilité de l'endothélium et l'extravasation des macrophages font intervenir des processus différents. Le passage des macrophages se ferait par écartements des jonctions (Territo et al., 1984).

Un autre processus d'extravasation existe. Ce processus, appelé empéripolèse, est caractéristique de la diapédèse des lymphocytes. (Farr et al, 1980) Ce processus est également utilisé par les PMN. (Hammersen and Hammersen, 1987)

L'apparition de cellules chargées de lipides dans l'intima des artères constitue l'un des premiers symptômes de l'athérosclérose. Ces cellules, remplies de lipides (ou cellules spumeuses), dérivent très probablement des monocytes sanguins.

La prévention de la progression de l'athérosclérose passe par la connaissance intime de ce processus initial.

Afin d'en étudier les premières étapes (c'est à dire l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, leur passage dans l'intima et leur transformation en cellules spumeuses), nous avons décidé de mettre au point un modèle de coculture *in vitro* de cellules endothéliales et de macrophages et dont la structure se rapprochât le plus possible de la situation *in vivo*.

Nous souhaitons tester la validité de ce modèle d'un point de vue morphologique et fonctionnel.

Lors des tests morphologiques, nous observerons la coculture au microscope optique, au microscope électronique et au microscope à balayage.

Nous déterminerons la proportion de cellules adhérentes aux cellules endothéliales et essayerons de déterminer l'action des lignées sur la perméabilité de l'endothélium.

Les tests fonctionnels consisteront en l'étude de la sécrétion de lipoprotéine lipase par les macrophages. Le choix de la LPL s'explique par son rôle dans la régulation des lipoprotéines et par le fait que ce travail s'intègre dans un programme de recherche plus vaste qui tentera de définir l'action de différents agents chimiotactiques sur les monocytes et les macrophages.

MATERIEL ET METHODES

## I. CULTURE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES

Les cordons ombilicaux sont prélevés immédiatement après l'accouchement et stockés à 4°C dans du "cord buffer" (140 mM NaCl-4 mM KCl-11 mM D-glucose-tampon phosphate 1 mM pH 7,4), contenant 500 U/ml de colimycyne (Laboratoire Roger Bellon S.A ) et 5 mg/ml de gentamicine (Gibco).

Ils seront utilisés dans les quatre jours.

### A. Mise en culture des cellules endothéliales.

#### Solutions:

PBS (phosphate buffered saline) :

10 gr. NaCl (Merck)

0,25 gr. KCl (Merck)

1,44 gr. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

0,25 gr. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

pH 7,4

+ extemporanément : 100 U/ml.de pénicilline (Gibco)

100µg./ml.Streptomycine (Gibco)

Collagénase : (Gibco : 0,175 U./mg.) 0,1% dans du PBS.

Milieu de culture RPMI : (1 litre)

10,4 gr. RPMI 1640 (Gibco)

5,95 gr. HEPES ( 25 mM) (Gibco)

300 mgr. L-Glutamine (Gibco)

10 ml. Sodium Pyruvate (Gibco)

1 ml. Fungizone (250 µg./ml.) (Gibco)

pH 7,4

+ extemporanément : 100 U./ml.de pénicilline (Gibco)

100 µg./ml Streptomycine (Gibco)

20% Newborn Serum (Gibco)

Toutes les solutions sont stérilisées (sur filtres Millipores : Sterivex-GS) et stockées à 4°C (-20°C pour la collagénase)

Mode opératoire :

Toutes les manipulations se font sous hotte à flux laminaire en utilisant du matériel stérile.

Un trocard est introduit dans la veine ombilicale et le vaisseau est perfusé avec 20 ml de cord buffer.

La veine est ensuite remplie de 10ml de collagénase et incubée dans du C.B., 20 minutes à 37°C.

Après l'incubation, la veine est rincée avec 40 ml de C.B. La solution de rinçage est récoltée dans des tubes Nunc de 50 ml et centrifugée à 172 g.

Le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans 5 ml de milieu de culture RPMI.

Les cellules, ainsi récupérées, sont déposées dans des boîtes multipuits Nunc de 35 mm de diamètre, prétraitées avec de l'eau gélatineuse (gélatine Merck , 0,2% dans de l'eau bidistillée.) pendant 1 heure à température ambiante.

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont réensemencées soit dans d'autres puits, soit sur amnios.

B. Passage des cultures primaires de cellules endothéliales.

Lors d'un repiquage, le surnageant des cultures est éliminé et les cellules sont rincées avec 2 ml. de solution BSA/EDTA (respectivement 0,5% et 0,02% dans H<sub>2</sub>O), puis incubées 20 minutes à 37°C dans 2 ml. de collagénase.

Le milieu est récupéré et centrifugé 10 minutes à 172 g.

Le culot est resuspendu dans du RPMI , puis réparti dans trois puits , préalablement traités à l'eau gélatineuse.

C. Passage des cellules endothéliales sur membrane amniotique.

Préparation des membranes amniotiques.

Le placenta est recueilli le plus stérilement possible et utilisé immédiatement.

La membrane amniotique est découpée et placée dans un récipient contenant du PBS. L'amnios est séparé mécaniquement du chorion et incubé 45 minutes dans une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>OH 0,25 M.

La couche épithéliale de l'amnios est grattée à l'aide de compresses stériles. Les membranes sont alors montées et tendues entre 2 anneaux qui s'emboîtent l'un dans l'autre (à la manière d'une peau de tambour), en veillant à ce que le côté épithélial soit dirigé vers l'extérieur.

Les amnios sont lavés dans 3 bains successifs de PBS pendant 45 minutes et stockés à 4°C.

### Repiquage des cellules endothéliales.

Les cultures, après élimination du surnageant et rinçage par 2 ml. de BSA/EDTA, sont incubées 5 minutes dans 3 ml d'une solution trypsine/EDTA (trypsine 0,1%, EDTA 1 mM dans du PBS)

Le milieu est agité vigoureusement, récupéré et centrifugé à 172 g. pendant 10 minutes.

Le culot est resuspendu dans du RPMI à raison de 300000 cellules par ml.

Les membranes amniotiques sontensemencées côté chorion avec 0,5 ml de milieu ( $1,5 \cdot 10^6$  cellules endothéliales/cm<sup>2</sup>) et placées sur des supports plastiques. (supports qui permettront de déterminer la résistance électrique des membranes avec plus de précision).

### D. Coloration des cultures au rouge neutre.

#### Solution stock

0,2 gr de Neutral red CI 50040 (Sigma) sont dissous dans 5 ml d'éthanol 95% . La solution est ensuite filtrée ( filtre Millipore 0,22µm).

#### Coloration des cultures

Les membranes sont rincées avec du PBS à 37°C, colorées pendant 5 minutes au rouge neutre ( solution stock diluée 30 x dans du PBS) à 37°C, puis observées au microscope à contraste de phase.

### X. Isolement et caractérisation des glycosaminoglycans de la membrane amniotique.

#### 1) Extraction des GAGS.

Les membranes amniotiques sont déshydratées par 2 bains d'acétone (1 nuit et 2 H.) puis séchées à 37°C.

L'extraction des GAGs consiste en une digestion protéolytique. Les membranes sont incubées 48 H. à 56°C dans du tampon Tris 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,4 M, (pH 5,6) contenant de la protéase (Sigma, type XIV) à une concentration de 0,5 mg / ml.

La réaction est bloquée par chauffage 2 min. à 100°C. Les résidus insolubles sont éliminés par centrifugation à 10000 g pendant 20 min. Le surnageant contenant les GAGs est dialysé une nuit contre de l'H<sub>2</sub>O dist. afin d'éliminer les molécules de faible poids moléculaire résultant de la digestion protéolytique.

Les GAGs sont ensuite précipités par le chlorure de cetylpyridinium (CPC). Le principe est basé sur les caractères polyanionique et acide des GAGs. Les GAGs forment avec certains détergents cationiques, tel le CPC, des complexes insolubles dans l'eau.

La précipitation est réalisée dans une solution de CPC 1% dans une solution de NaCl 0,03M pendant 16 H. à 37°C, le NaCl facilitant la floculation. Les complexes GAGs-CPC sont récupérés par centrifugation à 5000 g pendant 30 min. à 20°C, puis solubilisés à 37°C par du NaCl 1,25 M en présence de CPC 0,1 %.

Les complexes GAGs-CPC sont ensuite précipités par 3 volumes d'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium à 5 % pendant 16 H. à 4°C. Le précipité de GAGs est isolé par centrifugation pendant 30 min. à 5000 g à 4°C, puis séché sous vide dans un dessiccateur.

### Identification des GAGs.

Les GAGs sont identifiés par séparation électrophorétique. (Gardais et al., 1969) sur bande d'acétate de cellulose gélatinisée (Cellogel Chemetron) sous une différence de potentiel de 150 V pendant 45 min. dans un tampon de formate de pyridine 0,1 M à pH 3.

Après migration électrophorétique, les bandes sont colorées au bleu alcian 0,5 % dans un mélange acide acétique / eau / méthanol (1/4/5). La décoloration s'effectue dans des bains successifs du mélange acide acétique / eau / méthanol (5/50/45).

L'hydrolyse enzymatique spécifique permet l'identification des GAGs. La chondroïtinase AC (Miles Seravac) hydrolyse les chondroïtines 4 et 6-sulfates et partiellement l'acide hyaluronique, tandis que la chondroïtinase ABC hydrolyse les chondroïtine 4 et 6 sulfates et le dermatan sulfate. L'hydrolyse est effectuée selon la technique de Yamagata et al. (1968). Le milieu d'incubation est constitué de :

- 10 µl de tampon Tris 0,1 M à pH 8
- 10 µl d'enzyme: 0,1 U de chondroïtinase
- 30 µl d'échantillon à tester

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 2 H. Les réactions sont bloquées par chauffage à 100°C pendant 1 min. et les hydrolysats sont déposés sur les bandes d'acétate

de cellulose. La perte de coloration au bleu d'alcian reflète la sensibilité du GAG à l'enzyme et permet son identification.

### 3) Dosage métachromatique des GAGs.

Les zones colorées correspondant aux GAGs sont découpées et dissoutes dans 1 ml d'acide acétique à 80%. L'absorbance des solutions est observée à 675 nM. La quantité de produit présent est déterminée grâce à des courbes d'étalonnage, précédemment établies à l'aide de GAGs standards séparés par électrophorèse dans les mêmes conditions

## II. CULTURE DES MACROPHAGES

Les U937 proviennent de l'Américan Type Culture Collection réf : CRL 1593

Les J774 nous ont été données par le Dr. J.C. Mazière CHU Paris XI.

Les HL60 nous ont été fournies par le Dr. J.C. Sibille de l'I.C.P.

### A. Culture en suspension

#### Milieu de culture :

RPMI macrophages.(1 litre)

10,4 gr. RPMI 1640

0,85 gr. NaHCO<sub>3</sub> (Merck)

4,77 gr. HEPES

10 ml. Sodium Pyruvate

pH 7,4

+ extemporanément : 100 U./ml.de pénicilline

100µg./ml.Streptomycine

10% Fetal Calf Serum (FCS)

décomplémenté (30 min à 56°C)

#### Mode opératoire :

Les cellules sont suspendues dans le milieu RPMI et incubées à 37°C, sous atmosphère O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5% dans des boîtes Falcon de 75 cm<sup>2</sup>.

Pour renouveler le milieu, la suspension est centrifugée à 552 g. pendant 10 minutes et le culot est ressuspendu dans du milieu frais, à  $3 \times 10^5$  cellules /ml.

#### B. Coculture de cellules endothéliales et de macrophages sur membrane amniotique.

Les cocultures sont réalisées sur des cultures de cellules endothéliales sur membrane amniotique de 8 jours. La confluence des cultures est vérifiée par coloration au rouge neutre de 1 ou 2 membranes. Les macrophages sontensemencés à raison de  $7 \times 10^5$  cellules / 700 $\mu$ l / membrane.

### III. PERMÉABILITÉ À L'ALBUMINE

Pour déterminer la perméabilité de l'endothélium à l'albumine, nous avons utilisé de l'albumine bovine (BSA grade V) marquée à l'iode 125

#### A. Marquage de l'albumine à l'I<sup>125</sup> (par la méthode de la chloramine-T).

##### Solutions :

Iodine 125 (Amersham) est ajusté à un volume de 1 mCi/5  $\mu$ l avec du NaOH 0,1 N.

Tampon phosphate K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,5

Solution de BSA grade V (Sigma) 1mg./ml.dans le tampon phosphate.

Solution de chloramine T 1mg/ml dans le tampon phosphate.

Solution de métabisulphite (Merck) 1mg/ml dans le tampon phosphate.

##### Mode opératoire :

Dans un Eppendorf sont mélangés 100  $\mu$ l de la solution de BSA, 100  $\mu$ l de chloramine-T et 5 $\mu$ l d'iode 125 (1mCi). Après avoir agité pendant deux minutes, la réaction est arrêtée avec 100  $\mu$ l de la solution de métabisulfite.

Le mélange est déposé sur une colonne à tamis moléculaire G25 préalablement équilibrée avec 30ml de tampon phosphate de potassium. L'Eppendorf est lavé avec 3X100  $\mu$ l de tampon qui sont aussi déposés sur la colonne. On ajoute 1,8 ml de tampon afin de remplir le volume mort de la colonne (2,4 ml).

## Matériel & Méthodes

L'albumine est éluée avec 11 x 300 µl de tampon. Des 11 fractions récupérées, on prélève 5 µl qui sont passés au compteur gamma. Les fractions possédant les plus fortes activités sont rassemblées, aliquotées et stockées à -20°C.

La vérification du couplage se fait par précipitation au TCA. (acide trichloroacétique)

A 5 µl de la solution à tester sont ajoutés 200 µl de la solution de BSA puis 1000 µl de TCA 10%. Le mélange est centrifugé 7 minutes à 12000 rpm (centrifugeuse Janetzki). Le culot contient l'albumine marquée, le surnageant, l'iode libre. Il suffit de faire le rapport entre la concentration du surnageant et celle du culot, pour déterminer l'efficacité du couplage.

### B. Perméabilité des cellules endothéliales ou de la membrane amniotique à l'albumine I<sup>125</sup>

La solution stock d'albumine I<sup>125</sup> est amenée à une concentration de 10<sup>6</sup> cpm/700 µl avec du RPMI (pour cellules endothéliales) Le milieu albuminé I<sup>125</sup> est compté.

700 µl de milieu albumine I<sup>125</sup> sont déposés sur les cellules endothéliales (au dessus de la membrane amniotique) et 5 ml de milieu RPMI/NBS sont déposés autour de l'anneau..

A chaque prélèvement seront récupérés 150 µl de milieu en-dessous de la membrane et 21 µl au-dessus de la membrane, afin de garder constant le rapport des volumes au-dessus et en-dessous de la membrane .

Le flux d'albumine est calculé (en %) par:

$$\frac{[\text{albumine}] \text{ en-dessous de la memb.}}{[\text{albumine}] \text{ à l'équilibre}} \times 100$$
$$\text{où } [\text{albumine}] \text{ à l'équilibre} = \frac{10^6 \text{ cpm}}{\text{volume total}} = \frac{10^6 \text{ cpm}}{5,7 \text{ ml}}$$

#### IV. DOSAGE DES PROTEINES

##### Méthode de Lowry (1951)

##### Principe:

Les protéines sont dégradées avec du NaOH 0,5M. Leur structure native est détruite, elles présentent ainsi tous leurs groupements réactionnels.

La coloration est due:

- à la formation d'un complexe entre le cuivre et les liaisons peptidiques
- à la réduction d'un complexe phosphomolybdique en complexe phosphomolybdeux par les groupements tyrosine et tryptophane de la protéine.

##### Réactifs

- NaOH 1N et 0,5N
- solution A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, tartrate NaK 2%, CUSO<sub>4</sub> 1% (v/v/v : 100,1,1)
- réactif de Folin dilué 1x dans H<sub>2</sub>O

##### Mode opératoire

Dans un tube à essai, est déposé 0,2ml d'échantillon à doser ou 0,1 ml de solution étalon et 0,1 ml de NaOH 1N (étalon) ou 0,2 ml de NaOH 0,5N (blanc).

Après 30 min., on ajoute 1 ml de solution A, puis, après 15 min., et de 30 sec. en 30 sec., on ajoute 0,1 ml de Folin dans chaque tube.

Après 30 min., de 30 sec. en 30 sec., on lit l'absorbance à 540 nm.

Le calcul de la concentration en protéines se fait par

$$\text{Abs échantillon} \times \text{Abs. blanc} \times \text{dilution} \times 0,4$$

---

$$\text{Abs. étalon} - \text{Abs. blanc}$$

#### V. DOSAGE DE LA LDH.

##### Principe

L'activité de la LDH est déterminée par la mesure de la vitesse de réduction de NADH en NAD lors de la transformation du pyruvate en lactate. ( Cabaud and Wroblewski, 1958 )

### Mode opératoire

On ajoute dans une cuvette 100 µl d'échantillon à 2,85 ml de pyruvate 730 µM dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,5 et 50 µl de NADH 3 mM dans le tampon phosphate (concentration finale de NADH de 150 µM). La diminution de l'absorbance à 340 nm est enregistrée pendant au moins 5 min.

Pour évaluer le pourcentage de l'activité LDH libérée par les cellules, c'est-à-dire la proportion de cellules lésées, on mesure l'activité de la LDH après destruction des cellules par 0,2 % de triton X-100 c'est-à-dire l'activité totale de la LDH.

le pourcentage de la LDH libérée est calculé par

$$\frac{\text{Act. LDH libérée}}{\text{Act LDH libérée} + \text{act. LDH non libérée}} \times 100 = \% \text{ de cellules lysées}$$

## VI. MORPHOLOGIE

### A. Fixation des cultures pour la microscopie

Les cultures sont fixées par une solution de glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1M (pH 7,4), CaCl<sub>2</sub> 0,1%. La solution de glutaraldéhyde est amenée à 37°C avant d'y déposer les échantillons afin d'éviter les chocs thermiques qui entraîneraient un décollement des macrophages. Les cultures sont incubées pendant 120 min. à t° ambiante.

Après l'incubation, les cultures fixées sont rincées dans 3 bains successifs de tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4), CaCl<sub>2</sub> 0,1% pendant 5 minutes.

### B. Postfixation

Si les cultures sont réalisées sur membrane amniotique, celle-ci est découpée de manière à ne garder que la surface sur laquelle a été faite la culture.

La postfixation est réalisée en plaçant les cultures dans une solution de tétr oxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>) 1% dans le tampon cacodylate 0,1M (pH 7,4), CaCl<sub>2</sub> 0,1%. pendant 30 min. à t° ambiante.

### C. Déshydratation.

Les cultures sont déshydratées dans des solutions de plus en plus concentrées d'éthanol:

alcool (°)	Nbre de bains	Durée des bains
25	2	5 min.
50	2	5 min.
70	2	10 min.
90	2	10 min.
100	3	20 min.

Les échantillons vont être soit enrobés dans l'Epon pour être utilisés en MO ou en ME, soit vont être déshydratés par la méthode du point critique , puis recouverts d'une couche d'or en vue de l'observation au MB.

### D. Imprégnation et enrobage.

L'imprégnation est réalisée en remplaçant l'alcool par des solutions d'Epon de plus en plus concentrées. Les échantillons sont d'abord incubés pendant 4H sur rotor dans une solution alcool/épon (v,v : 3,1) récipient fermé, à température ambiante, puis dans une solution alcool/épon (v,v : 1,1) pendant 12h, et ensuite dans une solution alcool/épon (v,v : 1,3) pendant 4h..

La polymérisation se fait dans des couvercles de plastique de 25 mm de diamètre et 4 mm d'épaisseur. Les échantillons sont placés dans de l'épon pur pendant 2 x 2h sur rotor, flacon ouvert, puis les échantillons sont placés dans les couvercles plastiques. La polymérisation se fait 8h à 37°C, 24h à 45°C et 48h à 60°C.

### E. Observation des coupes

Des coupes semi-fines et ultra-fines sont réalisées au microtome et à l'ultratome perpendiculairement à la surface de culture.

Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine (0,2 % dans une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5 % dans de l'H<sub>2</sub>O bidist.) pendant 5 minutes puis rincées à l'eau . Ces coupes seront observées au microscope optique.

Les coupes ultra-fines sont incubées dans l'acétate d'uranyl pendant 30 minutes. Ces coupes sont examinées au microscope électronique Philips EM301 et EM201 à 60Kv.

## F. Passage au point critique

Pour dessécher l'échantillon, la préparation est placée dans une enceinte résistant à de hautes pressions contenant de l'éthanol 100°. La pression est amenée à 75 bars (atmosphères) et à la température de 45°C. A ce niveau, la densité du liquide est identique à celle du gaz, donc il n'y a plus de phase entre la partie liquide et la partie gazeuse.. L'enceinte est ouverte afin de libérer le CO<sub>2</sub>, mais de manière à ce que la pression de 75 bars ne diminue pas avant que l'entièreté du CO<sub>2</sub> liquide ne soit passé à l'état gazeux.

Les échantillons sont collés sur les supports au moyen de collant double face. (les supports sont de petits disques de 10 mm de diamètre), puis recouverts d'une couche d'or de 20nm.

Les cultures ont été observées au microscope Jeol JSM -840 A

## VII. TEST D'ADHÉRENCE AUX CELLULES ENDOTHÉLIALES DES MACROPHAGES MARQUÉS AU CR<sup>51</sup>

### A. Marquage des macrophages

On incube dans 1ml de milieu RPMI sans sérum 20 106 macrophages, avec 20μCi de Cr<sup>51</sup> (1μCi/106 Macrophages/50μl RPMI sans sérum) pendant 1heure à 37°C sous agitation douce.

Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec 20ml de RPMI sans sérum (les macrophages sont suspendus dans 20ml de RPMI, centrifugés à 552g pendant 5 minutes), puis resuspendus dans 20ml de RPMI contenant 20% de NBS décomplémenté 30 minutes à 56°C.

### B. Adhérence des macrophages

Les macrophages sont ensemencés sur les puits avec cellules à raison de 7 105 cellules/cm<sup>2</sup>.

Après 6h ou 24h, pour chaque puits, le milieu est enlevé et les cellules sont rincées avec 1ml de PBS à 37°C. Les milieux et les solutions de rinçage sont centrifugés à 552 g pendant 5minutes. Les surnageants sont séparés des culots. Surnageants et culots seront comptés au compteur gamma.

Les puits sont incubés avec 1ml de solution acide acétique 0,6%, NaCl 0,1% pendant 10 minutes à 4°C, puis rincés avec 1ml de solution acétique. Les solutions seront comptées au compteur gamma.

L'amnios est détaché des anneaux et passé au compteur gamma.

- Le 1° surnageant contient le chrome relargué après 6 ou 24h par les macrophages
- Le culot contient les macrophages qui n'ont pas adhéré aux cellules endothéliales.
- La solution d'acide acétique contient les macrophages qui adhèrent aux cellules endothéliales.
- L'amnios contient les macrophages qui ont traversé l'endothélium.

#### VIII. DOSAGE DE LA LPL.( NILSSON-EHLE, 1976)

Le dosage de la LPL se base sur la capacité de l'enzyme à hydrolyser les triglycérides. Nous avons utilisé comme substrat pour la LPL une émulsion stable de triglycérides (Trioléin glycerol) et de lécithine (ou phosphatidylcholine). L'activité de l'enzyme est évaluée par la libération d'acides gras.

Le dosage de la LPL dans les surnageants des cocultures se fait après 6 H. de coculture. Les cultures sont placées dans de la glace, le milieu de culture est récupéré, centrifugé et le surnageant est stocké à -20°C (La LPL se conserve au moins 1 an à -20°C (Nilsson-Ehle, 1987)). Le culot de cellules et la surface des cultures sont rincés pendant 15 min. avec 1 ml de milieu de culture RPMI sans sérum, contenant de l'héparine (5U/ml), puis sont centrifugés. Les surnageants sont congelés. Le dosage est réalisé sur les milieux et les solutions de rinçage.

#### A. Préparation de l'émulsion stock.

La préparation est faite au moins 48 H. à l'avance et peut être conservée pendant 6 semaines à température ambiante.

Trioléin glycerol (TO), stockée dans du toluène à -20°C:

TO<sup>14</sup>C: 50 µl soit 0,07 mg pour 5 µCi (Amersham, CFA258)

TO: 55,3 µl soit 13,8 mg (Sigma, T-7140)

Lécithine, stockée dans du chloroforme à 4°C:

7 µl soit 0,7 mg

## Matériel & Méthodes

Le mélange est séché sous atmosphère d'azote et ajouté à 1 ml de glycérol (Janssen Chimica).

Le tout est soniqué 5 x 45 sec. à 4°C.

### B. Préparation du substrat

Le substrat, préparé extemporanément, est composé de:

- tampon TrisHCL 0,62 M, NaCL 0,15 M, SAB 5%, pH 8,6: 1 vol.
- sérum humain décomplémenté 30 min. à 56°C: 1/2vol.
- émulsion stock: 1 vol.

Le substrat est vortexé 2 min.

### C. Mélange réactionnel

A 50 µl de substrat, préparé extemporanément, à 37°C, on ajoute 100 µl de surnageant contenant l'enzyme.

Incubation à 37°C pendant 1 H.

La réaction est stoppée par addition d'un mélange méthanol, chloroforme, heptane (1,45 / 1,25 / 1)

### D. Extraction des acides gras

Les acides gras sont extraits par addition de 1,05 ml de tampon tétraborate-carbonate de K 0,1 M pH 10,5.

Les tubes sont vortexés puis centrifugés 15 min. à 2700 g.

Les acides gras saponifiés par le tampon tétraborate-carbonate de K se retrouvent dans la phase aqueuse supérieure. (76% des acides gras libérés).

0,4 ml de la phase supérieure est prélevé, ajouté à 4 ml de liquide de scintillation Aqua Luma et passé au compteur bêta.

## Matériel & Méthodes

L'activité de la LPL est définie comme la libération de 1 nanomole d'acide oléique par minute à 37°C et se calcule par:

$$\text{cpm} \times 3 \times 2,45$$

-----

$$t \times \text{act. sp.} \times 0,76 \times 0,4$$

où: cpm = radioactivité de 0,4 ml de la phase aqueuse

t = temps d'incubation en min.

act. sp. = activité spécifique du substrat c'est à dire cpm pour 1 nmole de triglycérides

De cette valeur, il faut soustraire la valeur obtenue pour le blanc (activité du milieu de culture frais).

PRELIMINAIRES

I. OBTENTION DE CELLULES ENDOTHÉLIALES À PARTIR DE CORDONS OMBILICAUX.

Les cellules endothéliales ont été obtenues à partir de cordons ombilicaux suivant la méthode de Jaffe (1973) (voir matériel et méthodes). Nous avons eu beaucoup de difficultés à obtenir des cultures à confluence régulièrement. En effet, certaines de nos cultures ont été contaminées par *Acineto bacter*. Il s'agit d'une bactérie de l'environnement, gram négatif, résistante aux antibiotiques habituellement utilisés en culture (pénicilline, streptomycine, gentamycine), sensible à la colimycine et aux sulfamidés. La contamination a probablement eu lieu lors du prélèvement des cordons et des placentas qui se fait de la manière la plus propre possible, mais non stérilement.

Nous avons d'abord décidé de tester les milieux contenant les cordons en les incubant à 37°C pendant 24 heures. Nous ne gardions pour la récupération des cellules que les cordons ombilicaux indemnes de toute contamination par l' *Acineto bacter*.

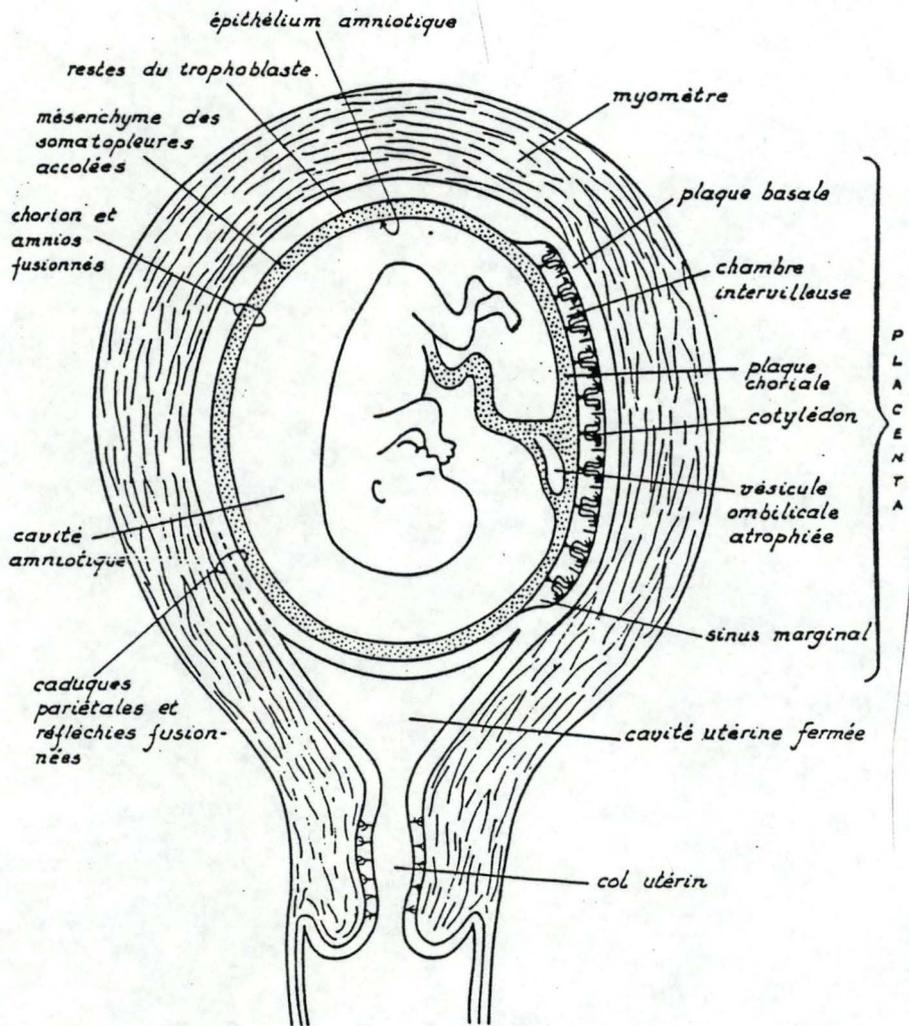
Nous avons, ensuite, essayé de cultiver les cellules dans du milieu contenant 500 U de colimycine/ml de culture ( 20500 U/mg de colymycin), concentration qui inhibe la prolifération des bactéries mais qui provoque également une diminution de la croissance des cellules endothéliales.

L'utilisation de colimycine dans le Cord Buffer (milieu servant au prélèvement des cellules endothéliales et au stockage des cordons ombilicaux) et la mise en culture des cellules en milieu RPMI contenant de la pénicilline et de la streptomycine mais sans colimycine, a permis de diminuer les contaminations par *Acineto bacter* tout en gardant un taux de croissance des cellules endothéliales normal.

Commentaires :

La colimycine est une polymixine dont l'action sur les bactéries se manifeste au niveau de la membrane cellulaire. La portion non polaire de la drogue s'insère dans la portion hydrophobe des membranes tandis que la portion polaire va se fixer sur le groupement phosphate des phospholipides. Cette liaison à la membrane va entraîner une modification de sa perméabilité et le relargage de nombreuses petites molécules dont les pentoses et les phosphates; le pool des nucléotides va donc être altéré et la croissance bactérienne stoppée (Storm et al, 1977).

La diminution de la croissance que nous avons observée au niveau des CE est un phénomène non rapporté (Dr. Zech, communication personnelle) et étonnant car les polymixines sont les antibiotiques de choix utilisés en petite chirurgie pour soigner les plaies, surtout les plaies atones du diabète. Leur intérêt réside , non seulement , dans le fait qu'on ne leur connaît pas d'acquisition de résistance, mais surtout, parce qu'elles sont réputées pour ne pas empêcher la granulation des plaies.



**Figure 3-1 :** Localisation de l'amnios.

R. Leloup (1981)

En ce qui nous concerne, nous supposons que la diminution de croissance des CE est due à la concentration trop élevée en polymyxine; les sites de liaison des cellules endothéliales pourraient être aussi utilisés par la polymyxine avec les mêmes conséquences que pour les bactéries.

Nous avons choisi une concentration 20 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est de 1µgr/ml pour cette bactérie (Edwards, 1980) soit 0,02 mg/ml de culture.

## II. CHOIX DE L'AMNIOS COMME SUBSTRAT DES CELLULES

Nous désirions travailler avec un modèle dont la structure du substrat ressemblât le plus possible à celle de la couche sous-endothéliale de l'artère. Dans ce but, plusieurs auteurs ont utilisé l'amnios de placenta humain (fig. 3-1) comme support de culture pour les cellules endothéliales (Furie et al., 1984, 1987 ; Huang et al., 1988; Migliorisi et al., 1987) (fig. 3-2).

L'épithélium de l'amnios est constitué d'une assise de cellules cubiques à cylindriques, attachées entre elles par des desmosomes. Les cellules contiennent un noyau de forme variable, des gouttelettes lipidiques et de nombreuses vacuoles. Au niveau de la face abluminale de l'amnios, les cellules endothéliales forment des villosités (dans lesquelles vient s'imbriquer le tissu conjonctif de l'amnios).

Un certain nombre de travaux ont permis de déterminer la composition de la couche sous-endothéliale en fibronectine (Linder et al., 1975), en GAGs (Ruostlhti, 1979) et en collagène (Mc Cullagh et al, 1975, 1980; Madri et al., 1979; Chung et al., 1976).

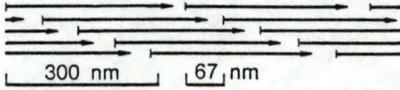
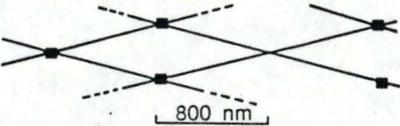
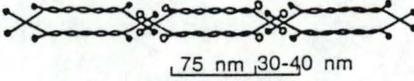
La composition de l'amnios en collagène a été déterminée par Lwebug-Mukasa et al. en 1984. Afin de pouvoir établir une comparaison avec la couche sous-endothéliale in vivo, nous avons identifié les GAGs présents dans l'amnios par séparation électrophorétique et dosage métachromatique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Dominique Margelin de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6°. Les résultats de ce travail sont repris dans le tableau ci-joint. Nous avons constaté l'absence d'heparan sulfate au niveau de l'amnios. On y trouve du dermatan sulfate, des acides hyaluroniques et dans une moindre mesure, des chondroitines sulfates.

	mg/g poids sec
dermatan sulfate	3,342 ± 0,444
chondroïtine sulfate	1,283 ± 0,209
ac. hyaluronique	3,103 ± 0,363

Commentaires :

### A. Composition en collagène et en fibronectine.

**Tableau 3-1:** Quelques collagènes vasculaires. Legrand, 1987.

TYPE	LOCALISATION PARIETALE	FORMULE MOLECULAIRE	
I	Adventice	$[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2$	 <p>300 nm 67 nm</p> <p>Ininterrompue Télopeptides sans pont disulfure Périodicité = 67 nm</p>
III	Intima	$[\alpha_1(III)]_3$	<p>Ininterrompue Télopeptide avec pont disulfure Périodicité = 67 nm</p>
IV	Membranes basales	Chaînes $\alpha_1(IV)$ et $\alpha_2(IV)$	 <p>800 nm</p> <p>Interrompue Interactions entre les extrémités : domaines 7 riches en ponts disulfure</p>
V	Intima et média (péricellulaire)	$\alpha_1(V) [\alpha_2(V)]_2$ $[\alpha_1(V)]_2 \alpha_2(V)$ $\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)$	<p>PM &gt; 300 Kd, mal caractérisée L = 300 nm</p>
VI	Intima	$\alpha_1(VI)$ $\alpha_2(VI)$ $\alpha_3(VI)$	 <p>75 nm 30-40 nm</p> <p>Hétérodimères = association antiparallèles de triple hélice par ponts disulfure Tétramères formant des fibrilles de 105 à 115 nm de périodicité</p>

La couche sous endothéliale artérielle, contient de la fibronectine, des collagènes (I,III, IV, V (tableau 3-1) des protéoglycans, des glycoprotéines ( ainsi que des GAGs) (Kadar, 1988).

La fibronectine est une protéine multifonctionnelle qui, par ses nombreuses propriétés, joue un rôle primordial dans l'attachement des cellules aux matrices extracellulaires (Hynes, 1983).

La fibronectine est une protéine de 440 Kd dont les chaînes se présentent comme une succession de domaines globulaires reliés par des extensions filamenteuses, chacun d'entre eux étant un domaine de liaison, soit pour une cellule, soit pour un constituant macromoléculaire intra- (actine par exemple) ou extracellulaire (par exemple, protéoglycans, collagène, gélatine, fibrine, héparine, etc) (Hynes et Yamada, 1982).

Linder et al. (1975) ont localisé la fibronectine dans la couche sous- endothéliale des artères. La fibronectine y possède différents domaines spécifiques de fixation non seulement pour le collagène (principalement de type V), mais aussi pour les cellules endothéliales, le facteur XIII et les glycosaminoglycans. Cette interaction, avec le collagène et la cellule endothéliale, joue un rôle important dans la fixation des cellules endothéliales au collagène. C'est au niveau de la fibronectine qu'on a pu montrer la fixation d'héparine, d'héparan sulfate et d'acide hyaluronique mais pas de chondroïtine sulfate (Ruostlahti, 1979).

Dans la couche sous-endothéliale saine, le collagène de type III est prédominant par rapport au collagène de type I également présent (Madri et al, 1980; Kadar, 1988). Le collagène de type V se situe dans l'intima aux environs de la membrane basale qui est constituée principalement de collagène de type IV (Madri et al., 1979; Mc Cullagh, 1980).

Chung et al. (1976) ont démontré la présence dans la couche sous endothéliale de collagènes "à courtes chaînes" que l'on retrouve dans de très nombreux tissus richement vascularisés dont le placenta (Furoto et al., 1980).

Dans le cas d'athérosclérose, la proportion des collagènes I et III de la couche sous-endothéliale varie (Labat-Robert et al, 1985; Kadar, 1988): elle s'enrichit en collagène de type I, probablement du fait de l'invasion de l'intima par les cellules musculaires lisses qui secrètent principalement du collagène de type I (Mc Cullagh and Balion, 1975).

La constitution de l'amnios est fort semblable à celle de la couche sous-endothéliale de l'intima. L'amnios contient lui aussi des collagènes, de la fibronectine, des glycosaminoglycans.

En effet, Lwebug-Mukasa et al. (1984) ont montré, sur pneumocytes de type II sur membrane amniotique et par immunofluorescence, la présence de laminine et de collagène IV au niveau de la membrane basale uniquement, la présence de collagène de type V au niveau de la membrane basale et dans le stroma tandis que le collagène de type III apparaît comme le constituant principal de la zone stromale de l'amnios. Ils ont déterminé également la présence

Tableau 3-2: Distribution des glycosaminoglycans dans l'intima et la média d'aorte humaine.

REFERENCES.	Klynstra et al. (1967)	Murata et al. (1968)	Gardais et al. (1973)	Stevens et al. (1976)	Toledo et Mourao (1980)
<u>INTIMA</u>					
Acide hyaluronique	7.6	15	10	4.3	-
Chondroïtine-4-SO <sub>4</sub>	66.2	33	17	0	13
Chondroïtine-6-SO <sub>4</sub>			38	64.8	67
Dermatan-SO <sub>4</sub>	6.8	28	12	16.9	10
Heparan-SO <sub>4</sub>	19.4	24	20	13.9	10
<u>MEDIA</u>					
Acide hyaluronique	13.6	6.5	9	6.7	-
Chondroïtine-4-SO <sub>4</sub>	48.6	59	14	0	15
Chondroïtine-6-SO <sub>4</sub>			34	52.8	53
Dermatan-SO <sub>4</sub>	1.4	9.5	15	16	12
Heparan-SO <sub>4</sub>	36	26	24	24.5	8

de collagène de type I ainsi que la présence de fibronectine au niveau de la membrane basale et au niveau stromal.

Comme substrat, nous aurions pu utiliser des filtres synthétiques (Nucleopore, Millipore) avec probablement beaucoup plus de facilité. Ces filtres sont, quant à eux, constitués d'esters de cellulose et sont donc fort différents de la couche sous-endothéliale. C'est pourquoi nous avons préféré travailler avec l'amnios.

### B. Composition en glycosaminoglycans.

La paroi aortique contient le dermatan sulfate, l'heparan sulfate, les chondroïtines sulfate (4 et 6) et l'acide hyaluronique. (cfr. tableau 3-2) Les valeurs mesurées par différents auteurs varient mais on peut dire que les chondroïtines sulfate sont les principaux GAGs de l'aorte humaine, suivis par l'heparan sulfate dont la concentration est plus faible dans l'intima. Bartholomew (1983) a remarqué également une diminution de la concentration générale en GAGs de la lumière vers l'extérieur du vaisseau. Une augmentation de la concentration de dermatan sulfate vers l'adventice a été observée par Toledo et Mourao (1980).

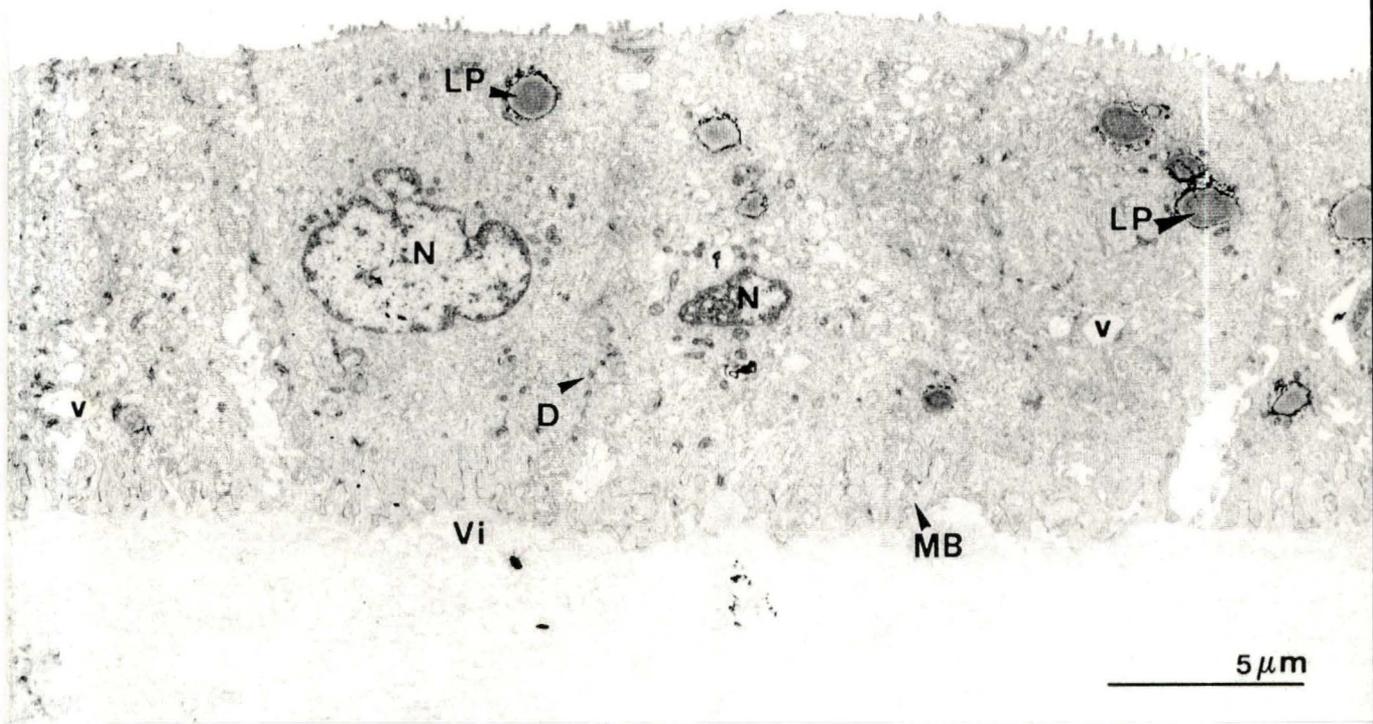
Il existe donc une différence importante entre les GAGs de la paroi artérielle et ceux de l'amnios. Ce dernier ne contient que très peu ou pas d'heparan sulfate alors que celui-ci fait partie des composants principaux de l'intima.

Dans l'intima, le rôle principal de GAGs est de fixer les macromolécules chargées positivement (qui interagissent avec les charges négatives des sulfates). Il existe peut-être une spécificité, c'est-à-dire qu'une molécule pourrait avoir tendance à être davantage fixée par un type de GAG plutôt que par un autre. (Cette hypothèse est controversée par Lindahl et Hook, 1978). Nous pensons que les autres GAGs pourraient probablement jouer aussi bien ce rôle de fixateur.

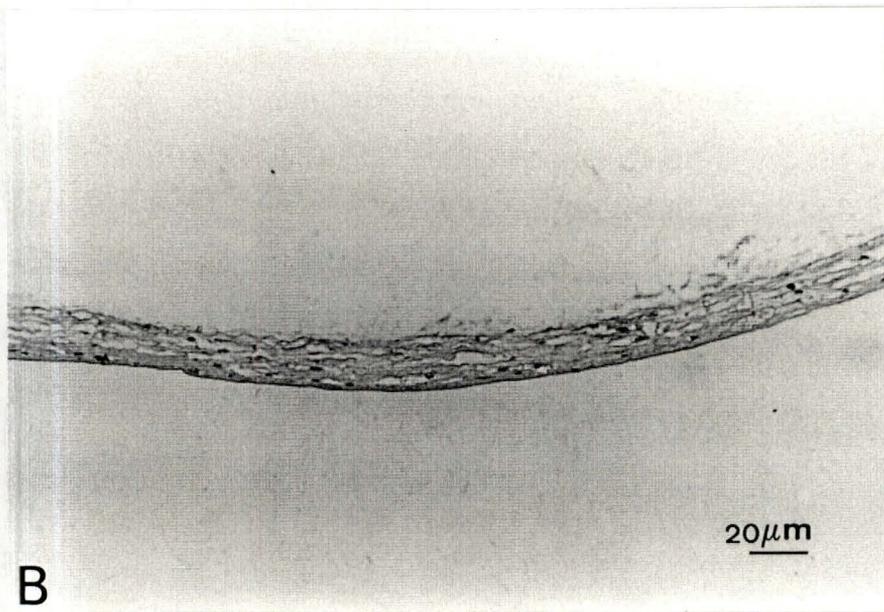
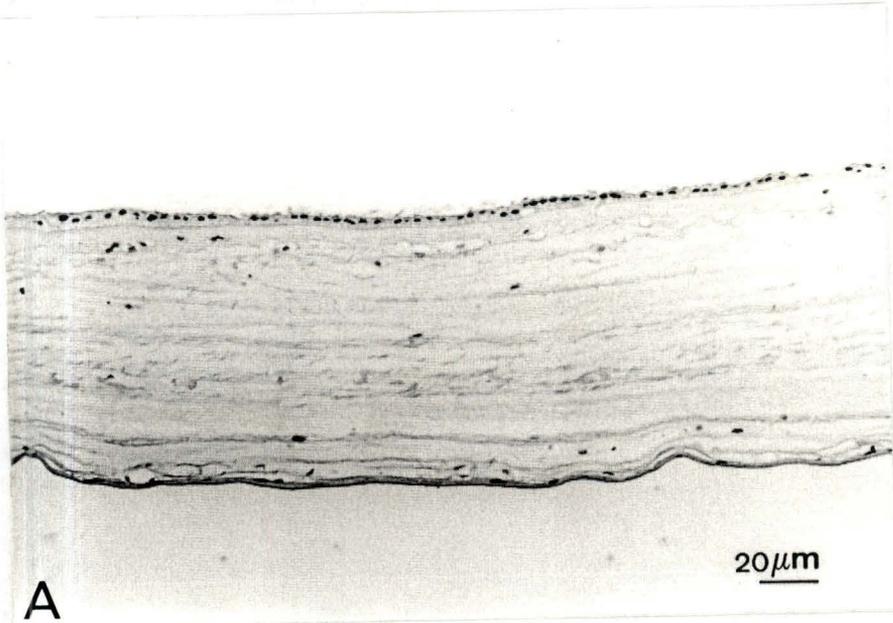
L'interaction des GAGs avec les LPL, LDL, VLDL, fibronectine, laminine, ... se fait principalement au niveau de l'endothélium, ces GAGs étant sécrétés par les cellules endothéliales (dans la membrane basale, ces GAGs sont sécrétés par les cellules endothéliales jusqu'à une concentration de  $17 \text{ mg/cm}^2$  dont 50% d'heparan sulfate. (Hassell et al., 1980)).

La concentration différente en GAGs de l'amnios ne joue probablement pas de rôle important tant que nous travaillons avec une couche de cellules endothéliales parfaitement confluite. L'amnios continue à jouer son rôle de fixateur de macromolécules.

Bien que la membrane amniotique ne recrée pas exactement la couche sous-endothéliale, ce modèle offre le grand avantage, contrairement aux filtres, de se rapprocher des conditions in vivo en reformant une couche de cellules endothéliales reposant sur un tissu conjonctif pouvant recueillir les macrophages après leur diapédèse.



**Figure 3-2** : L'épithélium amniotique. D: desmosomes; N: noyau; LP: gouttelettes lipidiques; V: vacuoles; Vi: villosités; MB: mmbrane basale.(G: 5000 x).



**Figure 3-3** Amnios avant séparation du chorion (A) et après séparation et traitement à l' $\text{NH}_4\text{OH}$  (B).

### III. DESTRUCTION DE L'ÉPITHÉLIUM AMNIOTIQUE.

Ainsi que décrit au paragraphe précédent, l'amnios possède une assise de cellules épithéliales (fig : 3-3A) qui doit être éliminée (fig : 3-3B). Nous avons essayé la destruction chimique ou enzymatique des cellules épithéliales suivie du lavage de la surface afin d'éliminer les restes de cellules. Nous souhaitons ensuite tester la croissance des cellules endothéliales sur les 2 faces de la membrane amniotique (côté membrane basale ou côté chorion).

#### A. Mise au point du traitement de l'amnios.

Les amnios ont été incubés dans différents bains préparés extemporanément pendant des temps et des températures d'incubation variables.

Trypsine 0,1%/EDTA 0,02% dans PBS	15 min	37°C
Trypsine 0,1%/EDTA 0,02% dans PBS	30 min	37°C
NH <sub>4</sub> OH 0,25 M dans PBS	30 min	37°C
NH <sub>4</sub> OH 0,25 M dans H <sub>2</sub> O (Furie 1984)	30 min	37°C
Collagénase 0,1% dans PBS	20 min	37°C
Triton-Deoxycholate-DNase (Lwebug-Mukasa et al., 1984)		

#### B. Traitement mécanique.

Ce traitement a pour but d'éliminer les restes de cellules épithéliales attachées à l'amnios. Le traitement est réalisé après le montage de la membrane sur les anneaux (voir paragraphe ultérieur). L'épithélium détruit est éliminé avec un coton tige (Furie, 1984) ou avant le montage des membranes à l'aide d'une compresse stérile

**Figure 3-4** Cellules endothéliales cultivées sur amnios ayant été traité pendant 45 minutes au  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,25 M, et dont on a gratté l'épithélium.

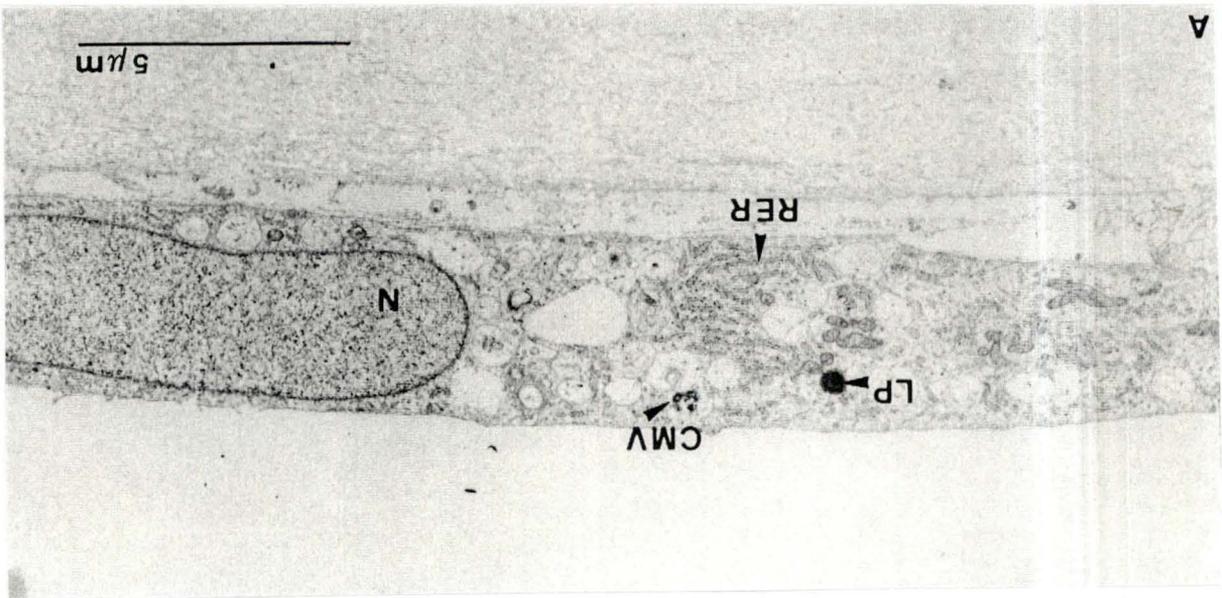
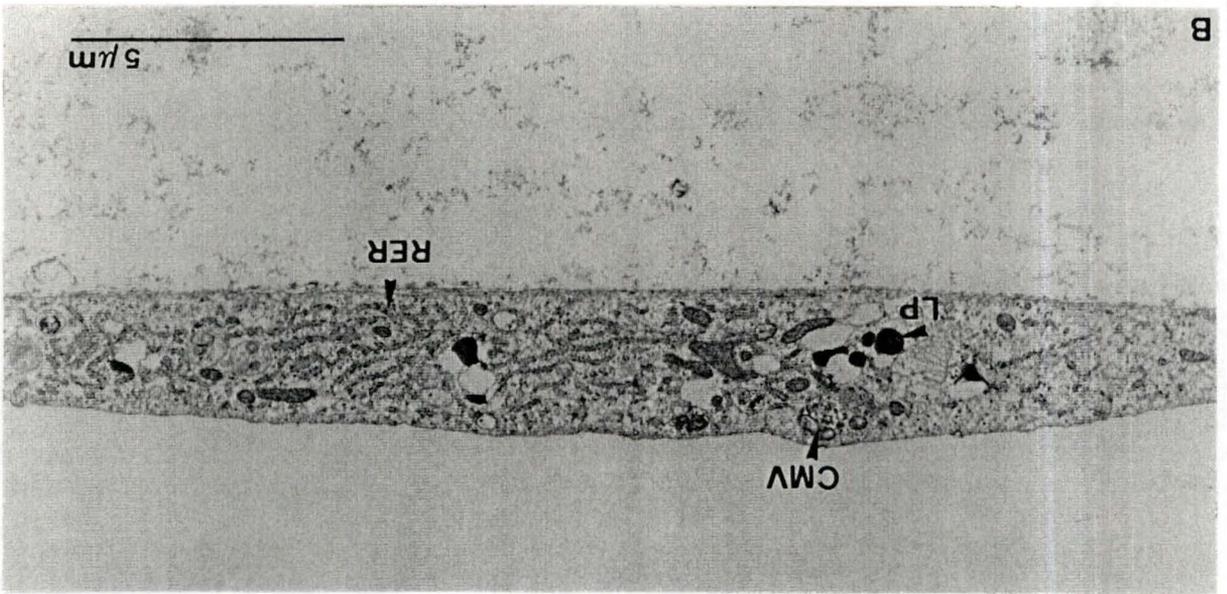
(G : 7000X)

Les cellules ont étéensemencées côté épithélial (A) ou côté chorion (B). Quel que soit le côté d'ensemencement, les cellules contiennent des corps multivésiculaires (CMV), des gouttelettes lipidiques (LP), un réticulum endoplasmique rugueux (RER) bourré de produits de sécrétion.

Cultures de 7 jours

-A : les cellules endothélialesensemencées côté épithélium sont décollées de la membrane amniotique.

-B : Lorsque les cellules endothéliales sont repiquées côté chorion, elles se déposent parfaitement sur la membrane amniotique, sans espace intermédiaire.



## Résultats

L'épithélium est entièrement éliminé pour les amnios traités au  $\text{NH}_4\text{OH}$ / PBS ou au  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  ou au Triton-Désoxycholate. La croissance des cellules endothéliales y est semblable après les trois traitements: les cellulesensemencées côté chorion se développent bien sur l'amnios, tandis que les cellulesensemencées du côté de la membrane basale ne reposent pas directement sur le substrat amniotique; on observe un petit espace entre la monocouche de cellules endothéliales et la membrane basale de l'amnios (figure 3-7).

## Commentaires.

La destruction des cellules pouvait être soit enzymatique soit chimique.

Notre but, en utilisant la trypsine ou la collagénase, était de "détacher" les cellules épithéliales de l'amnios, comme on le fait pour récupérer les cellules endothéliales à partir des cordons ombilicaux. La trypsine agit au niveau du glycocalyx, en coupant les protéines de surface au niveau des lysines et des arginines (Lehninger, 1970). La collagénase a une action beaucoup plus douce puisqu'elle ne digère que la triple hélice des fibres de collagène natives en fragments de 600 à 700 daltons (Peterkofsky B., 1982). Elle détruit le support des cellules endothéliales. Ces traitements, aux concentrations et aux temps d'incubation utilisés, ne se sont pas révélés très efficaces quant à la destruction de l'épithélium.

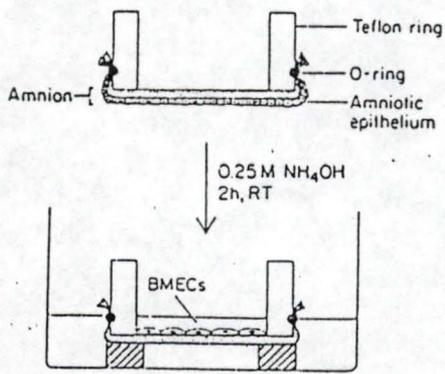
Les traitements à l'ammoniaque et au Triton ont pour but de détruire les cellules. Le  $\text{NH}_4\text{OH}$  hydrolyse les liaisons ester des triglycérides en amides (d'acide gras) et en glycérol. Le Triton X100 est un détergent. Le  $\text{NH}_4\text{OH}$  et le Triton vont donc dégrader les membranes plasmiques.

Nous avons choisi de traiter les amnios à l'ammoniaque car la technique est simple et rapide. Nous n'avons pas cherché à déterminer d'autres conditions pour les traitements enzymatiques puisque le  $\text{NH}_4\text{OH}$  fonctionnait bien.

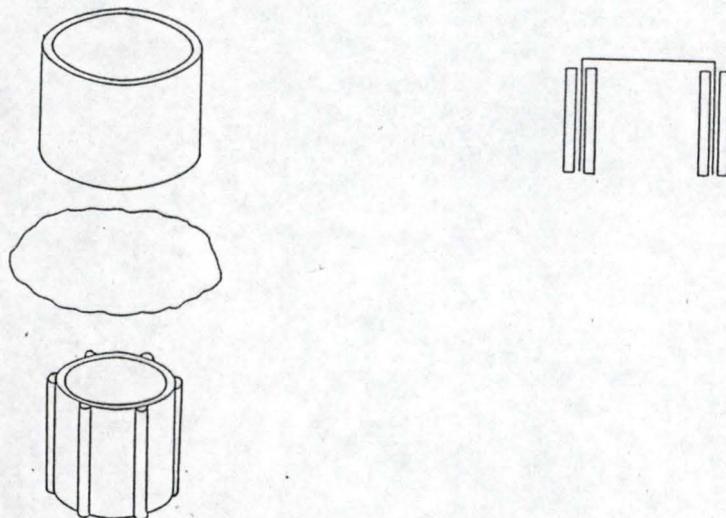
En ce qui concerne l'élimination des débris cellulaires, nous avons choisi de traiter les amnios avant le montage des anneaux. Le traitement de l'amnios après le montage sur les anneaux augmente le risque de déchirement des membranes. De plus, il est difficile d'éliminer l'épithélium détruit à leur périphérie.

Un autre avantage du traitement avant montage des anneaux est la possibilité de nettoyer efficacement les deux côtés de l'amnios. Le côté chorial présente souvent des fibres de collagène lâches provenant de la somatopleure, qui gêne l'adhérence et la croissance des cellules endothéliales. Ces lambeaux, non complètement détachés, ne peuvent pas être éliminés efficacement lorsque l'amnios est déjà monté sur les anneaux.

Nous utiliserons les amnios côté chorion puisque, contrairement au côté membrane basale, les cellules forment une monocouche intimement appliquée au tissu conjonctif.



**Figure 3-5:** Montage des membranes amniotiques avec un O-ring. (Furie, 1984)



**Figure 3-6:** Montages des membranes amniotiques entre 2 anneaux.

#### IV. MONTAGE DES MEMBRANES AMNIOTIQUES

A: Montage sur un anneau, la membrane étant maintenue par un O-ring (Furie 1984)

Les membranes sont maintenues sur les anneaux grâce à un O-ring (élastique).

L'expérience rappelle un peu la pêche à l'anguille main nue. De plus, le système n'est généralement étanche que jusqu'au niveau de l'O-ring (fig : 3-5)

B: Maintien de l'amnios entre deux anneaux qui s'emboîtent (Lwebug-Mukasa et al., 1984)

Il nous a fallu longtemps avant de trouver des anneaux qui s'emboîtent parfaitement. S'il y a trop de jeu entre les anneaux, la membrane glisse et le système se déboîte. S'il n'y a pas assez de jeu, la membrane amniotique se déchire. Ce système a cependant l'avantage d'être étanche et de montage facile.

Le système est formé d'un anneau extérieur rigide (découpé dans un bouchon de tube à essai) et d'un anneau intérieur (découpé dans un bouchon Falcon réf.2032) plus souple et présentant une série de stries sur la face externe (ce qui a l'avantage de bien maintenir la membrane amniotique) (fig : 3-6).

#### V. MISE AU POINT DE LA CULTURE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES SUR MEMBRANE AMNIOTIQUE.

##### A. Utilisation de l'amnios désépithérialisé.

Nous avons trouvé nécessaire, pour obtenir une bonne croissance des cellules endothéliales, de laisser les amnios dans un bain de PBS, pendant environ 15 heures à +/- 4°C avant l'ensemencement.

Commentaire:

Il se peut que le bain de PBS pendant 15 heures minimum soit nécessaire pour permettre l'élimination suffisante du NH<sub>4</sub>OH et des amides d'acides gras qui, par leur tendance électro-positive, se fixeraient sur l'amnios au niveau des charges négatives (GAGs par exemple).

## B. Ensemencement des cellules endothéliales sur membrane amniotique à partir des cultures primaires.

Le repiquage des cellules nécessite une densité d'ensemencement optimale. Cela, afin d'obtenir un bon compromis entre le temps nécessaire pour atteindre la confluence et la quantité de cellules à ensemercer. La technique habituelle de repiquage des cultures primaires utilise un mélange collagénase/EDTA qui ne permet pas une bonne séparation des cellules l'une de l'autre; ceci entraîne une très grande imprécision dans le comptage des cellules et donc, dans l'évaluation du nombre de cellules ensemençées. C'est pourquoi nous avons opté pour la technique de Huang et al.(1988) utilisant un mélange trypsine 0,1%/EDTA 1 mM qui permet une bonne séparation des cellules. Le but de la technique est de fragiliser l'adhésion des cellules endothéliales et ainsi de faciliter leur séparation par simple agitation. L'action de la trypsine est alors arrêtée par addition de milieu de culture(Freshney,1983).

Les cellules sont ensuite rincées et repiquées à la concentration désirée. La cellule endothéliale possède encore suffisamment de protéines de surface pour s'attacher à l'amnios.

Après plusieurs essais, nous avons choisi une densité de  $1,5 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> ce qui permet d'atteindre la confluence après +/- 7 jours. Ce choix tient compte d'une part de la quantité de cellules disponibles et d'autre part, du temps de culture nécessaire pour atteindre la confluence.

Commentaire:

Suivant les auteurs, la concentration d'ensemencement en cellules endothéliales peut varier de  $1,5 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> (Navab,1988; Taylor,1981) à  $5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> (Furie,1984).

## VI. MISE AU POINT DE LA DÉTERMINATION DE LA CONFLUENCE DES CULTURES.

Le modèle de culture sur amnios ne permet pas l'observation directe des cultures en microscopie à contraste de phase.

Il a donc été nécessaire de mettre au point une technique permettant de connaître l'état de confluence des cultures.

### A. Coloration vitale.

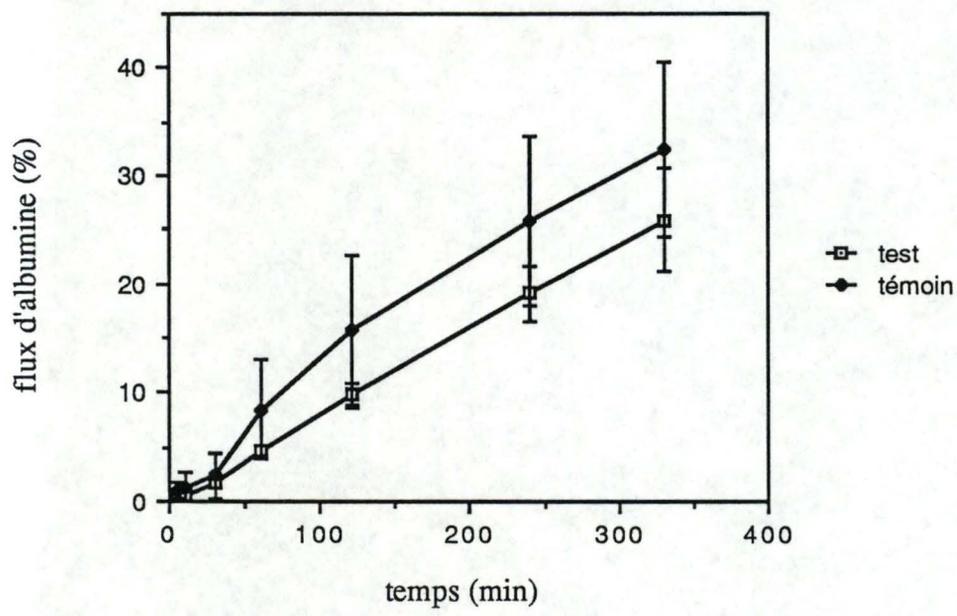


Fig. 3.7

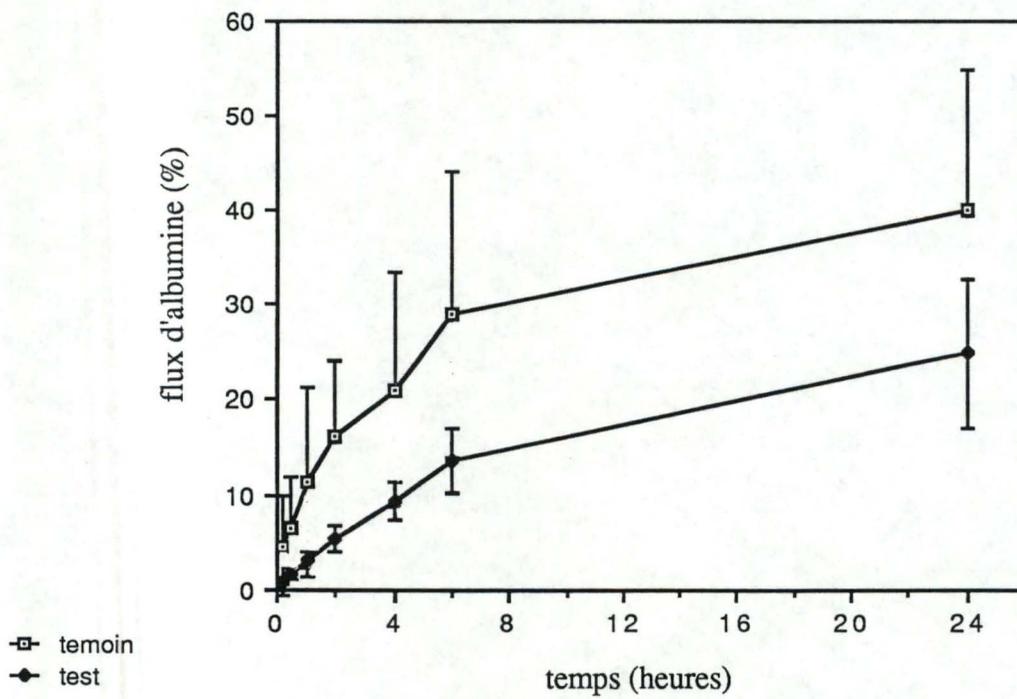
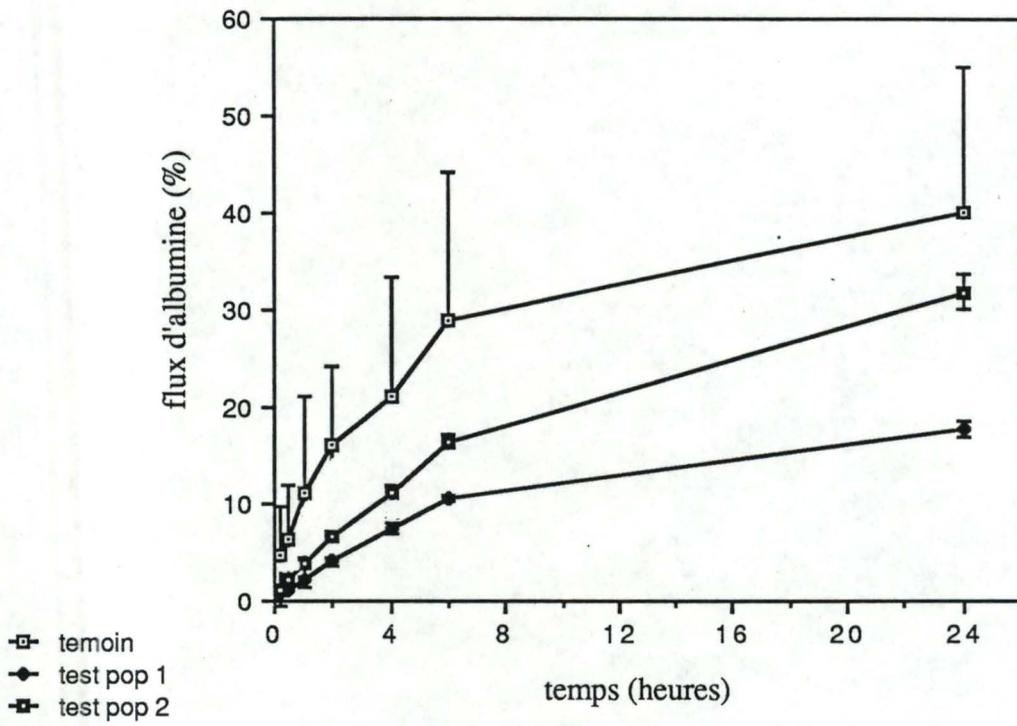


Fig 3.8

Les cellules sont colorées au rouge neutre ou 2 méthyl-3 amino-7 diméthylamino-phenazine (dilution 1/30 dans du PBS d'une solution stock à 4% dans de l'éthanol 95%) (Bulychev, 1978).

Lorsqu'elles sont colorées au rouge neutre, les cellules endothéliales apparaissent comme de petites tâches ocres de forme polygonale plus ou moins écartées les une des autres suivant le développement de la culture. Lorsque les cellules sont à confluence, les petites tâches sont accolées.

Cette technique a l'avantage d'être rapide et de bien visualiser les cultures. Mais les membranes ainsi traitées ne sont plus réutilisables.

De plus, l'état d'une culture ne reflète pas l'état de cultures similaires: ainsi, nous avons pu observer une hétérogénéité, non seulement entre les amnios, mais aussi dans un même amnios suivant la portion utilisée pour le montage des membranes. Ces variations se remarquent sur certaines cultures de cellules endothéliales: certaines zones apparaissent parfaitement à confluence, d'autres, ne comportent que quelques cellules endothéliales.

#### Commentaires

Le rouge neutre entre dans la cellule principalement par perméabilité. Le site principal de fixation du colorant se situe dans les lysosomes où il est stoppé par déprotonation à faible pH. Le rouge neutre se fixe également sur certains polysaccharides, l'acide nucléique, des protéines membranaires, ainsi que sur les ribosomes (Bulychev, 1978). Le rouge neutre détériore le RER (Weiss, 1955), ce qui provoque le dérèglement de la synthèse des protéines et l'arrêt de croissance des cellules traitées. Les cultures marquées au rouge neutre ne peuvent donc être réutilisées.

#### B. Perméabilité à l'albumine.

Nous avons déterminé la perméabilité à l'albumine de membranes amniotiques seules et de cultures de 6 et 8 jours de cellules endothéliales sur membrane amniotique.

Nous n'observons pas de différence significative entre les membranes amniotiques seules et les membranes + cellules endothéliales en culture de 6 jours (fig. 3-7). Cependant, une différence apparaît après 8 jours de culture.

Les écarts types sont très importants pour les membranes amniotiques seules (témoins).

De même, on observe une grande variabilité pour les membranes + cellules endothéliales (fig. 3-8). Ces 6 cultures peuvent être divisées en 2 catégories à l'intérieur

desquelles la variabilité est très faible (fig. 3-9): sur les 6 cultures de cellules endothéliales sur membrane amniotique, 3 présentent une diminution très marquée du flux d'albumine par rapport aux témoins. (diminution de 80 % et 56 % après 1 H et 20 H d'incubation respectivement) Les 3 autres présentent une perméabilité intermédiaire, avec une diminution du flux de 65 % et de 21 % par rapport aux témoins, après 1 H et 20 H d'incubation respectivement.

Les différences entre les témoins et les cultures sont plus importantes aux temps 10, 30, 60 et 120 min. qu'aux temps suivants.

#### Commentaires:

La grande variabilité de perméabilité des membranes amniotiques seules tend à confirmer leur hétérogénéité. Le fait que cette variance s'estompe lors de la confluence de l'endothélium souligne l'importance de cette barrière sélective.

Bien que toutes les cultures de cellules endothéliales présentent une diminution de la perméabilité à l'albumine après 8 jours de culture, le degré de perméabilité n'est pas similaire pour toutes les cultures, ce qui indique des niveaux de confluence différents entre les cultures.

Cette expérience confirme donc les résultats obtenus avec la coloration des cultures au rouge neutre. La cinétique de croissance des cellules endothéliales sur membrane amniotique varie d'une culture à l'autre du fait de l'hétérogénéité des membranes. Ces résultats nous ont conduit à rechercher un système permettant la détermination du niveau de confluence des cellules endothéliales pour chaque culture.

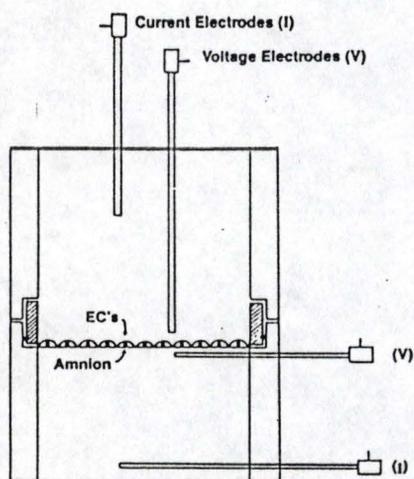
#### C. Mesure de la résistance électrique.

La mesure de la résistance électrique se base sur l'augmentation de la résistance électrique qu'entraîne une couche de cellules à confluence. La mesure de la résistance électrique permettrait de déterminer, d'une manière simple et rapide, la confluence de chaque membrane amniotique, sans léser les cellules endothéliales.

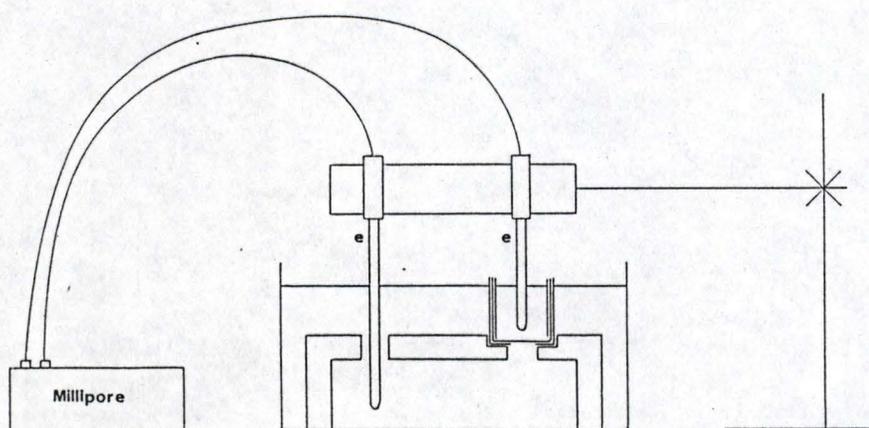
##### 1) Mise au point d'une technique de mesure de résistance électrique.

Principe: le milieu de culture contient une série d'ions et de molécules chargées, ce qui en fait un conducteur qui répond à la loi d'Ohm :  $R = V/I$ .

Lorsque la couche de cellules endothéliales atteint la confluence, elle interfère dans le mouvement des molécules chargées, provoquant une diminution de la conductibilité et donc



**Figure 3-10:** Shéma de l'appareil pour la mesure de résistance des membranes amniotiques selon Furie (1984).



**Figure 3-11:** Mesure de la résistance électrique des membranes amniotiques avec un Volthomme (Millipore). Les membranes et les électrodes sont maintenues en position fixe l'une par rapport à l'autre.

une augmentation de la résistance électrique du milieu. En mesurant cette augmentation de résistance électrique après la mise en culture, on peut donc déterminer la confluence de la culture (Furie et al., 1984).

## Appareil de mesure

### 1° Construction d'un appareil de mesure

Suivant le schéma qui nous a été fourni par le Dr. Furie (Department of Physiology and Cellular Biophysics, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York) nous avons fait construire un appareil émettant une source de courant continu constant de 100  $\mu$ A. La mesure du voltage de chaque côté de la membrane se fait au moyen d'une paire d'électrodes Ag/AgCl, maintenues en position fixe par rapport à la membrane. La variation de résistance électrique de la membrane se calcule à partir de la loi d'Ohm. (fig. : 3-10)

Le système s'est montré non fonctionnel du fait de la polarisation rapide des électrodes due à l'utilisation d'un courant continu.

### 2° Utilisation du Voltmètre (Millicell-ERS. Epithelial Voltmeter Millipore) (fig. : 3-11)

Cet appareil a l'avantage de produire un courant alternatif (ce qui évite la polarisation des électrodes) de plus ou moins 20  $\mu$ A établi au travers de la membrane par 2 fils d'Ag. La mesure du voltage de chaque côté de la membrane se fait par une paire d'électrodes Ag/AgCl. La résistance de la membrane est lue directement sur l'appareil.

## Problèmes lors de la mesure de la résistance

1° La mesure de la résistance varie très fort suivant la position des électrodes par rapport à la membrane. Il est donc nécessaire de pouvoir positionner exactement de la même manière les électrodes par rapport à la membrane lors de chaque mesure.

Les électrodes sont maintenues en position fixe sur un statif. Un support est placé dans le fond des puits de culture. Ce support permet de maintenir la membrane dans une position fixe et de positionner les électrodes toujours au même endroit. Il permet également une bonne circulation du milieu de culture sous la membrane.

2° Afin d'éliminer les variations dues à la calibration de l'appareil, les mesures de résistance se font par rapport à un blanc (moyenne de la résistance électrique de trois membranes amniotiques non ensemencées). La résistance électrique de la monocouche de

cellules endothéliales étant égale à la résistance de la culture de cellules endothéliales sur la membrane amniotique moins la moyenne des résistances électriques des membranes non ensemencées (blanc).

3°. Cette formule n'est pas correcte car elle ne tient pas compte des différences de résistance électrique que nous avons observées entre membranes avant ensemencement. De plus, nous avons mesuré une évolution de la résistance des membranes au cours du temps. Quoique les valeurs initiales de résistance diffèrent d'une membrane à l'autre, leur variation relative au cours du temps est très similaire. (Nous entendons par variation relative au cours du temps le rapport: résistance au jour X / résistance au jour 0). Pour 11 membranes, nous avons obtenu des variations relatives de  $0,09 \pm 0,01$  après 2 jours de culture et  $0,87 \pm 0,02$  après 4 jours de culture. Nous pouvons donc nous baser sur des différences de variations relatives au cours du temps entre le test (membrane amniotique ensemencée) et le blanc (membrane amniotique non ensemencée) pour détecter la confluence des cultures. La formule devient donc:

$$V = \text{RET}_X / \text{RET}_0 - \text{REB}_X / \text{REB}_0 \quad (1)$$

ou V = variation de résistance de la membrane amniotique ensemencée au jour X

$\text{RET}_X$  = résistance de la membrane amniotique ensemencée, au jour X

$\text{RET}_0$  = résistance de la membrane amniotique avant l'ensemencement

$\text{REB}_X$  = résistance d'une membrane amniotique non ensemencée, au jour X (valeur du blanc au jour X)

$\text{REB}_0$  = résistance d'une membrane amniotique non ensemencée, le jour de l'ensemencement (valeur du blanc le jour de l'ensemencement).

Nous considérons comme confluentes des cultures dont la valeur de V est supérieure à 3 x écart type (s) de la variation relative des blancs.

## 2) Calcul de la résistance électrique de la monocouche.

Pour calculer la résistance électrique de la monocouche, nous devons d'abord tenir compte de la variation normale au cours du temps représentée par le rapport  $\text{REB}_0 / \text{REB}_X$ , pour ensuite comparer ces valeurs corrigées aux valeurs mesurées au temps 0:

$$\text{RE monocouche (Ohms)} = \text{RET}_X \times (\text{REB}_0 / \text{REB}_X) - \text{RET}_0$$

On en déduit la valeur surfacique en multipliant la résistance par la surface. Cette valeur exprimée en  $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$  est indépendante de la surface de la membrane.

### 3) Mode opératoire.

Les électrodes sont stérilisées 20 minutes à l'alcool 70° stérile, rincées à l'eau bidistillée stérile et plongées dans le milieu de culture jusqu'à stabilisation de la mesure du potentiel électrique de celui-ci (environ 30 minutes). Après utilisation, les électrodes sont incubées 20 minutes dans du NaOH 0,5 N afin de les nettoyer, rincées à l'eau et stockées dans une solution saline.

### 4) Résultats

Vu le temps qui nous a été imparti, cette mise au point s'est déroulée en parallèle avec l'étude de la coculture et s'est terminée à la fin de notre travail.

Notre dernière expérience nous a permis de vérifier l'augmentation de la résistance électrique de cultures de cellules endothéliales ensemencées sur membranes amniotique.

Après 7 jours de culture, 12 cultures sur 26 montrent une résistance électrique plus élevée que celle des témoins. Pour ces 12 cultures les monocouches présentent une résistance électrique comprise entre 8 et 43 Ohmsxcm<sup>2</sup>. Parmi 6 cultures ne présentant pas de résistance électrique après 7 jours, 4 d'entre elles, après 9 jours, montrent une résistance nettement supérieure à celles des témoins avec des valeurs comprises entre 61 et 79 Ohmsxcm<sup>2</sup> pour la résistance électrique de la monocouche endothéliale. Une coloration au rouge neutre de ces cultures a confirmé la confluence des cellules endothéliales.

### 5) Commentaire:

Etant donné que cette mise au point s'est déroulée parallèlement à notre travail, nous nous sommes référés, pour les expériences de cocultures, aux résultats obtenus lors du test de perméabilité à l'albumine. Nous avons donc utilisé des cultures de 8 jours dont nous avons vérifié la confluence par 1 ou 2 témoins colorés au rouge neutre.

Ce choix explique probablement les grandes variabilités que nous avons parfois obtenues lors des tests en coculture.

La littérature rapporte des expériences similaires de mesure de résistance électrique mais réalisées avec une technique différente, utilisant un courant continu plutôt qu'un courant alternatif.

Furie et al. (1984) rapporte des valeurs de résistance de la monocouche égales à  $69 \pm 28$  Ohms x cm<sup>2</sup>, alors que les mêmes auteurs en 1987 rapportent des valeurs de  $4,1 \pm 2,3$  Ohms x cm<sup>2</sup> et, en 1988, des valeurs de 6 à 12 Ohms x cm<sup>2</sup> (Huang et al.) sans pouvoir expliquer cette modification.

Par rapport à ces valeurs, nos résultats sont du même ordre de grandeur, ce qui ajoute à leur validité.

Un travail détaillé devrait cependant être réalisé afin d'expliquer les variations de résistance des membranes au cours du temps.

## VII. CHOIX DES CELLULES TRANSFORMÉES

Nous avons travaillé avec des lignées transformées plutôt qu'avec des monocytes sanguins car, d'une part, les monocytes sont peu représentés dans le sang et nous aurions dû utiliser de grands volumes sanguins et, d'autre part, il n'est pas possible d'obtenir une population pure de monocytes, sans autre type leucocytaire contaminant.

Nous avons choisi de travailler avec 3 lignées différentes: une lignée de macrophages murins (lignée J774), une lignée humaine de lymphome histiocytaire (lignée U937) et une lignée humaine de prémyélocytes (lignée HL60).

Les lignées transformées ont l'avantage d'être cultivées à un stade de différenciation précis; ainsi, les U937 sont cultivés au stade de monocytes qui peuvent, suite à différents stimuli, se différencier en macrophages, alors que les monocytes sanguins cultivés après isolement se différencient très rapidement en macrophages même sans stimulus extérieur.

Une autre caractéristique intéressante de ces lignées (dans le cadre du projet dans lequel ce travail s'inscrit) est leur différence au niveau des récepteurs des LDL. Les U937 présentent un nombre de récepteurs pour les LDL natives supérieur à celui des récepteurs pour les acétyl-LDL. Les J774 présentent un rapport inverse, avec un nombre de récepteurs pour les LDL natives inférieur à celui des acétyl-LDL. Nous ignorons la qualité et la quantité de récepteurs pour les lipoprotéines présentes à la surface des HL60.

Le phénomène d'adhésion est une autre propriété qui permettra de distinguer ces différentes lignées.

## VIII. CHOIX DE LA DENSITÉ D'ENSEMENCEMENT DES MACROPHAGES DANS LA COCULTURE.

Nous avons décidé de travailler avec  $0,7 \times 10^6$  macrophages/cm<sup>2</sup> dans 0,7ml, ce qui correspond, pour les monocytes, à la densité maximale de cellules n'entraînant pas de dégradation de l'endothélium. (Pawloski, 1985). Cette concentration nous a paru également idéale pour nos expériences morphologiques: à une concentration plus faible, il était difficile de trouver des images de macrophages en microscopie électronique, à une concentration

supérieure, nous avons observé un grand nombre de macrophages morts après 24 heures de culture suite à l'épuisement du milieu de culture.

## RESULTATS

## résultats

### I. ASPECTS MORPHOLOGIQUES.

#### A Les lignées myélocytaires.

Nous avons utilisé la lignée macrophagique murine J774, la lignée monocytaire humaine U937 ainsi que la lignée prémyélocytaire humaine HL60.

Les J774 apparaissent arrondies au M.O., avec un noyau important ovoïde ou en forme de "fer à cheval", contenant généralement 2 nucléoles (Figure 4-3 A et B). Au M.E., le noyau présente, que le macrophage soit activé ou non, une marginalisation de la chromatine ainsi qu'une ségrégation des constituants. On constate la présence dans le cytoplasme de vacuoles claires (visibles également au M.O.) dont le nombre augmente lorsque les cellules sont activées au PMA (Figure 4-3). Certaines cellules présentent un reticulum endoplasmique rugueux dilaté ou des figures d'aspect caractéristique de cristaux de cholestérol (Figure 4-6, 4-7).

Les U937 possèdent un noyau de forme variable contenant un nucléole. La surface des cellules est recouverte de blebs dont le nombre augmente lorsque les cellules sont stimulées. Les U937 contiennent peu de vacuoles claires (Figure 4-4). Au M.E., le noyau, d'aspect variable, ovale à lobulé, présente, comme les J774, une ségrégation des constituants. Le noyau des U937 présente une marginalisation des nucléoles et chez certaines cellules, une apparition de centres fibrillaires. Les macrophages contiennent également des crêtes mitochondriales anormales, parfois quelques gouttelettes lipidiques ainsi qu'un nombre plus ou moins important de blebs. Chez certaines cellules activées au PMA, on observe un réticulum fort dilaté (Figure 4-8, 4-9) et une augmentation de la taille des macrophages.

Les HL60 sont rondes, présentent des petits bras et un noyau de forme variable, parfois lobulé. Dans certaines cellules, on observe des figures rappelant des cristaux de cholestérol. Le M.O. n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les cellules stimulées et non stimulées (Figure 4-5). L'empreinte des cristaux de cholestérol a pu également être observée au M.E. Au niveau du noyau, on note une marginalisation des nucléoles avec ségrégation de ses constituants et l'apparition des structures fibrillaires, une marginalisation de la chromatine ainsi que la présence de chromatine périnucléaire. On peut remarquer au niveau du cytoplasme, un réticulum endoplasmique gonflé, quelques vacuoles claires ainsi que des gouttelettes lipidiques (figures 4-10, 4-11).

#### B. Les cultures sur membranes amniotiques

## résultats

### 1) Les membranes amniotiques.

L'amnios présente une grande hétérogénéité d'un placenta à l'autre mais également au sein d'un même placenta, d'un endroit à l'autre. Après désépithélialisation, la membrane amniotique apparaît plus ou moins translucide. Cette hétérogénéité existe aussi dans l'épaisseur de la membrane. La coloration au bleu de toluidine est plus importante du côté épithélial. Le bleu de toluidine étant un colorant non spécifique, l'intensité du marquage est fonction de la quantité de matériel colorable, dans ce cas, de la densité du tissu conjonctif (fig. 4-12).

A cette variabilité de densité doit probablement s'ajouter une variabilité dans la composition de la membrane amniotique: il existe en effet des zones où les cellules endothéliales se développent moins bien.

### 2) Les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales, cultivées sur membranes amniotiques, forment un tapis de recouvrement. Ces cellules, de forme hexagonale, sont reliées entre elles par des jonctions. Elles forment des bras qui s'enchevêtrent et se chevauchent (figure 4-2). Ces cellules sont caractérisées par la présence de "corps de Weibel-Palade" (Figure 4-1 A), lieu de stockage du facteur VIII de la coagulation.

La cellule endothéliale montre un noyau ovoïde, un corps de Golgi extrêmement développé ainsi qu'un réticulum endoplasmique fort dilaté, preuves d'une activité (de synthèse) importante. On peut également observer des vésicules d'exocytose ou de pinocytose ainsi que quelques gouttelettes lipidiques. Les cellules endothéliales contiennent également des corps multivésiculaires se présentant sous la forme de grandes vésicules contenant plusieurs petites vésicules.

### 3) Les cocultures.

#### a. Les cellules phagocytaires

Pour les cocultures sur l'endothélium à confluence, onensemence une des lignées, à raison de 700 000 cellules par  $\text{cm}^2$ , dans 700  $\mu\text{l}$

Les J774 forment des agrégats qui se disposent en amas sur l'assise de cellules endothéliales. Le nombre de ces macrophages adhérant à l'endothélium est important (fig.4-12 A).

## résultats

Les U937 se disposent de manière plus homogène sur l'endothélium, sans former d'agrégat. Le nombre de cellules qui adhèrent à l'assise endothéliale paraît moins important que pour les J774 (fig.4-12B).

Les HL60 ne forment pas non plus d'agrégat et le nombre de cellules qui adhèrent à l'endothélium est plus faible (fig.4-12C)

Pour les trois lignées, on peut observer des cellules qui ont traversé l'endothélium et pénétré dans la membrane amniotique.

L'observation, au microscope optique, nous montre des cellules phagocytaires ayant plus ou moins le même aspect que les cellules activées au PMA. Les J774 présentent de nombreuses vacuoles claires (fig. 4-13A), les U937 des blebs en surface (fig. 4-13B). Au microscope électronique, on retrouve les vacuoles claires dans les J774 et les blebs au niveau des U937. Dans de nombreuses cellules, le noyau paraît anormal: aspect en croix (fig. 4-14A), ségrégation de ses constituants (fig. 4-14B, 4-15).

### b Les cellules endothéliales.

Lors de cocultures, les cellules endothéliales ne semblent pas, en microscopie électronique, avoir souffert du traitement: les noyaux sont généralement arrondis, de petites vésicules d'endocytose (fig. 4-15), des corps multivésiculaires (fig. 4-14 A-B) sont bien visibles. Les cellules endothéliales restent généralement jointives. Mais, au microscope à balayage, l'endothélium paraît endommagé à divers endroits (fig.4-22, 4-15 B). Ces déchirures sont probablement dues à la technique de dessiccation par le point critique (bien que le point critique limite les tensions de surface). Mais le nombre d'artéfacts, lors de la préparation d'un endothélium n'ayant pas servi à une co-culture, est moins important. Les cellules phagocytaires, si elles ne sont pas (uniquement) responsables des déchirures, sont probablement responsables d'une fragilisation mécanique de l'endothélium.

Certaines cellules endothéliales semblent faire montre d'une activité phagocytaire. En figure 4-21, la cellule endothéliale présente une protubérance. On remarque le noyau de la cellule endothéliale. Cette enflure provient probablement d'un macrophage mort phagocyté par la cellule endothéliale. Au microscope à balayage, on peut observer une cellule macrophagique morte phagocytée par une cellule endothéliale (fig. 4-22). Après phagocytose des macrophages (probablement morts), les cellules endothéliales présentent des protubérances rugueuses.(fig. 4-23). Certaines de ces protubérances pourraient être dues à une cellule ayant traversé l'endothélium. Mais les leucocytes se trouvant sous les cellules endothéliales forment généralement des protubérances plus arrondies (fig. 4-20). Dans le cas du macrophage de la figure 4-23, nous avons observé la cellule du dessus.(fig. 4-23 B): elle présente un aspect fort rugueux. Une vue "par en-dessous" (fig. 4-23 A) nous

## résultats

montre non pas la face inférieure d'une cellule, mais une série de filaments (probablement du collagène).

### C Phénomène de diapédèse des monocytes/macrophages.

#### 1) Coculture de J774/cellules endothéliales.

Lors des cocultures, plusieurs observations nous ont fait penser que le processus d'empéripolèse pouvait également exister pour les macrophages.

Une coupe semi-fine de co-culture de J774, fixée à la glutaraldéhyde, post-fixée au tetroxyde d'osmium et colorée au bleu de toluidine nous montre une cellule endothéliale posée sur l'amnios. On remarque, à côté du noyau, une "masse" arrondie, sombre, contenant deux tâches plus foncées. La coloration est presque noire, ponctuelle. Cet aspect et la taille, nous permette de croire qu'il s'agit d'un macrophage (fig 4-19 A A et fig.4-3 ). Ce J774 se situe près du noyau. On pourrait expliquer cette localisation soit par la phagocytose du macrophage par la cellule endothéliale, soit par le passage du macrophage à travers la cellule endothéliale par un processus analogue à l'empéripolèse des PMN et des lymphocytes.

#### Commentaires

La phagocytose par les cellules endothéliales intervient principalement pour éliminer, du milieu, les cadavres des macrophages. Ces macrophages ont perdu une partie de leur contenu cytoplasmique; colorés au bleu de toluidine, ils apparaissent très pâles, signe d'une faible quantité de matériel cytoplasmique. Ici, la coloration est sombre et bien délimitée. La membrane a donc gardé son intégrité. Ceci tendrait à prouver le passage du macrophage à travers la cellule endothéliale.

#### 2) Coculture de U937/cellules endothéliales

Lors de la pénétration d'un U937 (fig. 4-19 B), on remarque un pseudopode qui passe par un hiatus ( Y), voisin de la jonction (J). On observe deux jonctions (J) très proches l'une de l'autre.

#### Commentaires

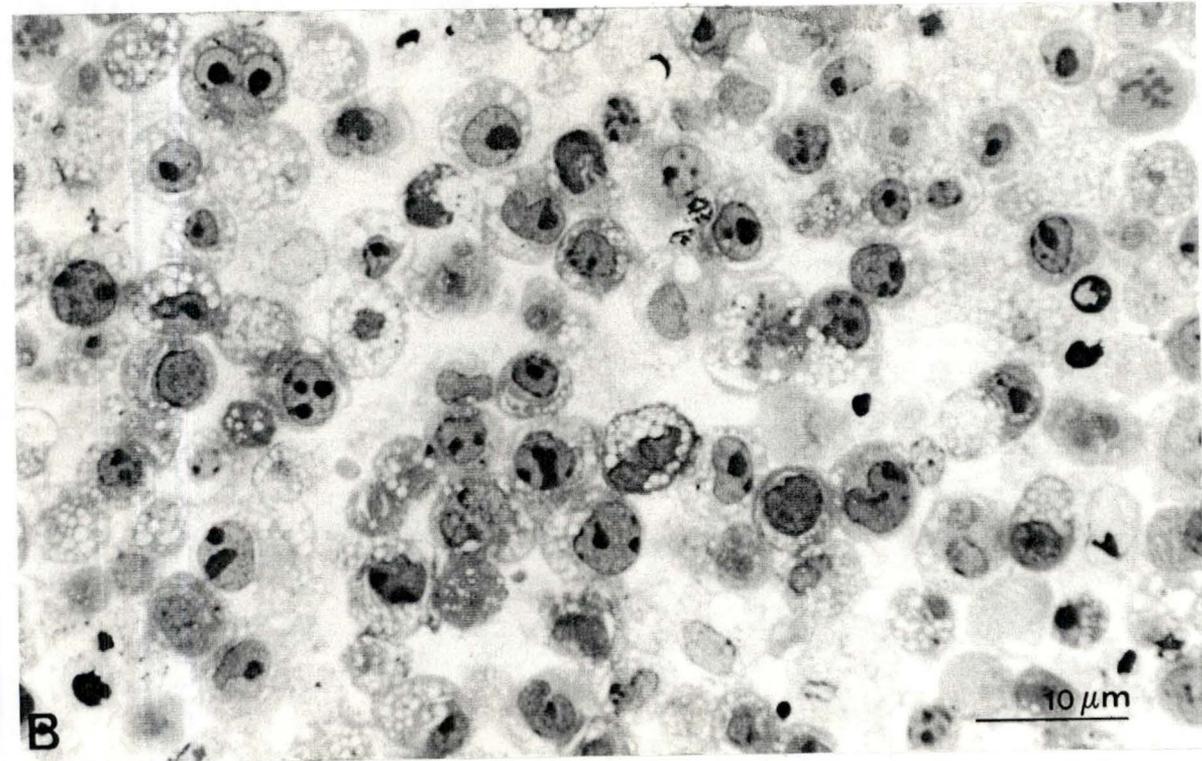
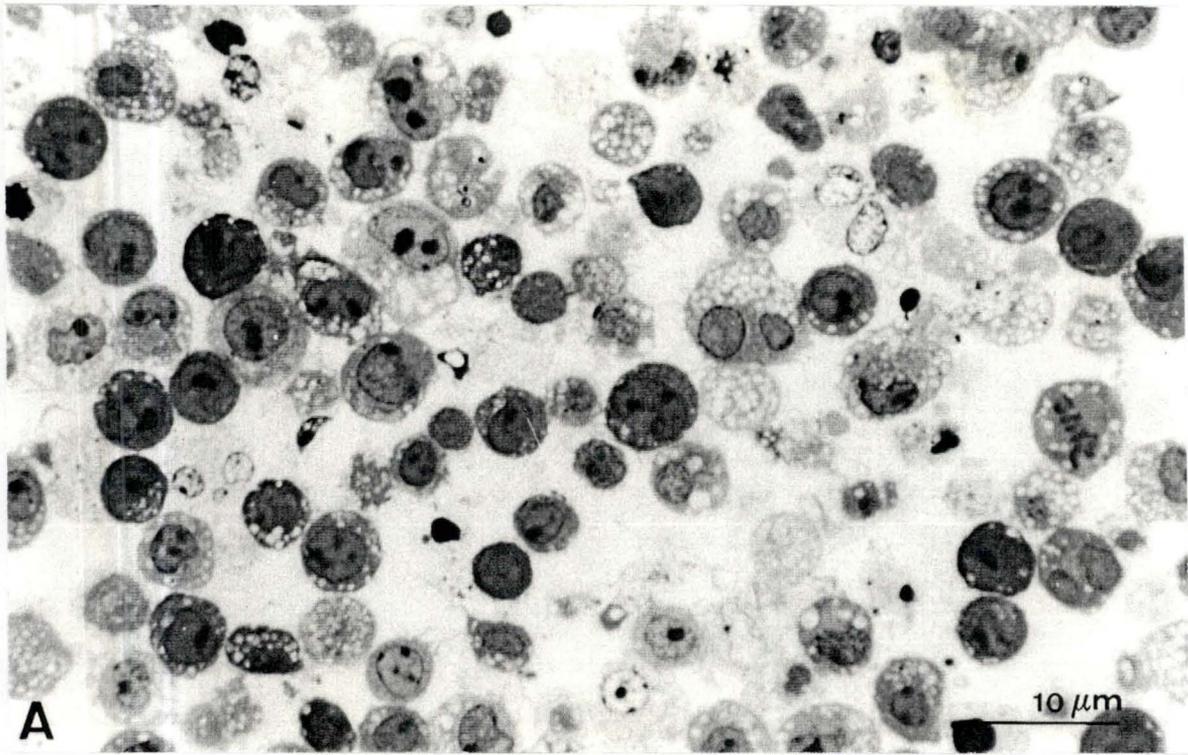
## résultats

Les observations au microscope à balayage nous ont montré que les jonctions entre les cellules endothéliales ne sont pas de simples zones de contact, mais qu'il existe des chevauchements et des bras entre les cellules. On peut observer que toutes les surfaces sont comblées (Figure 4-2)

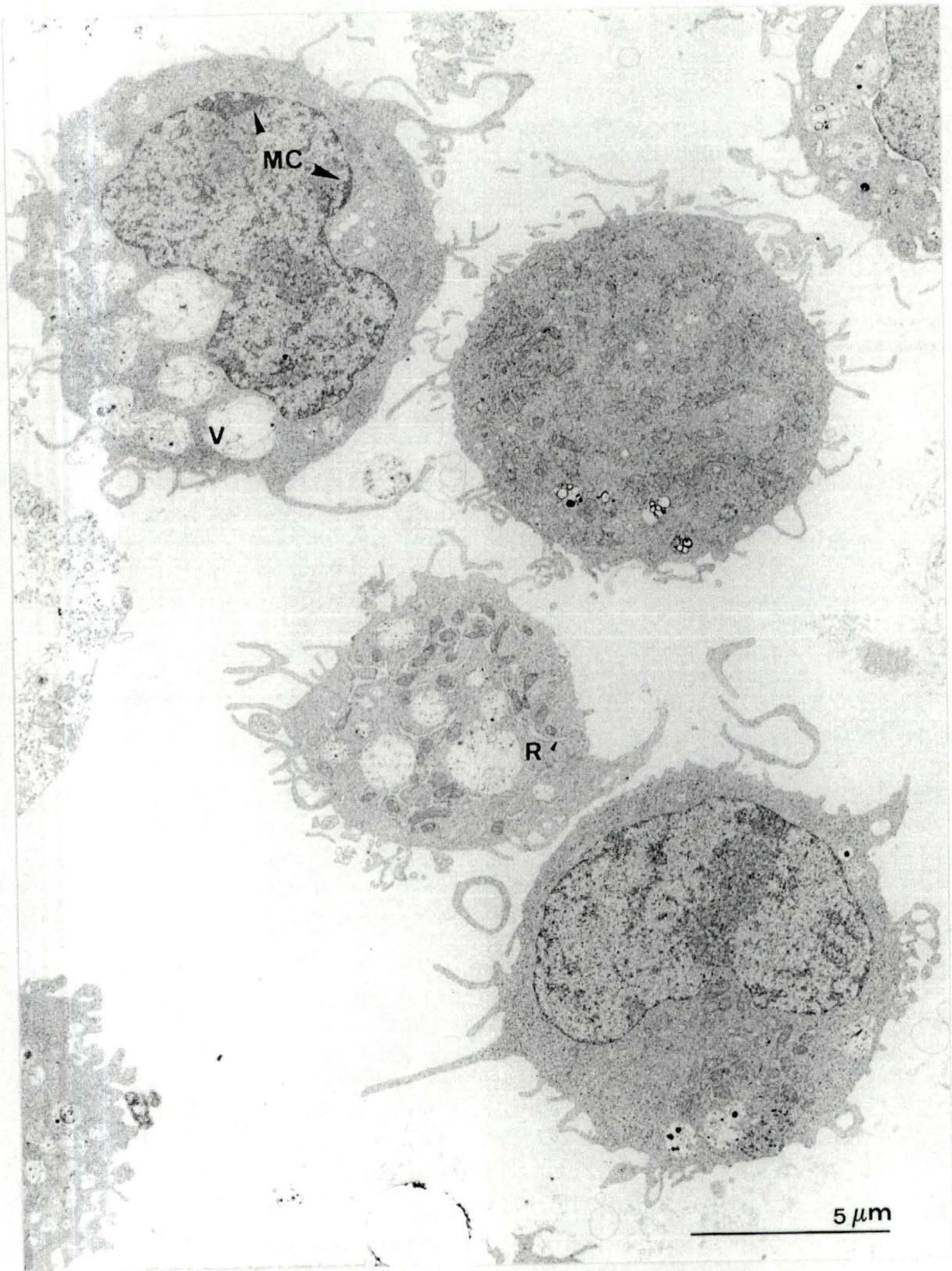
### II. TEST FONCTIONNELS.

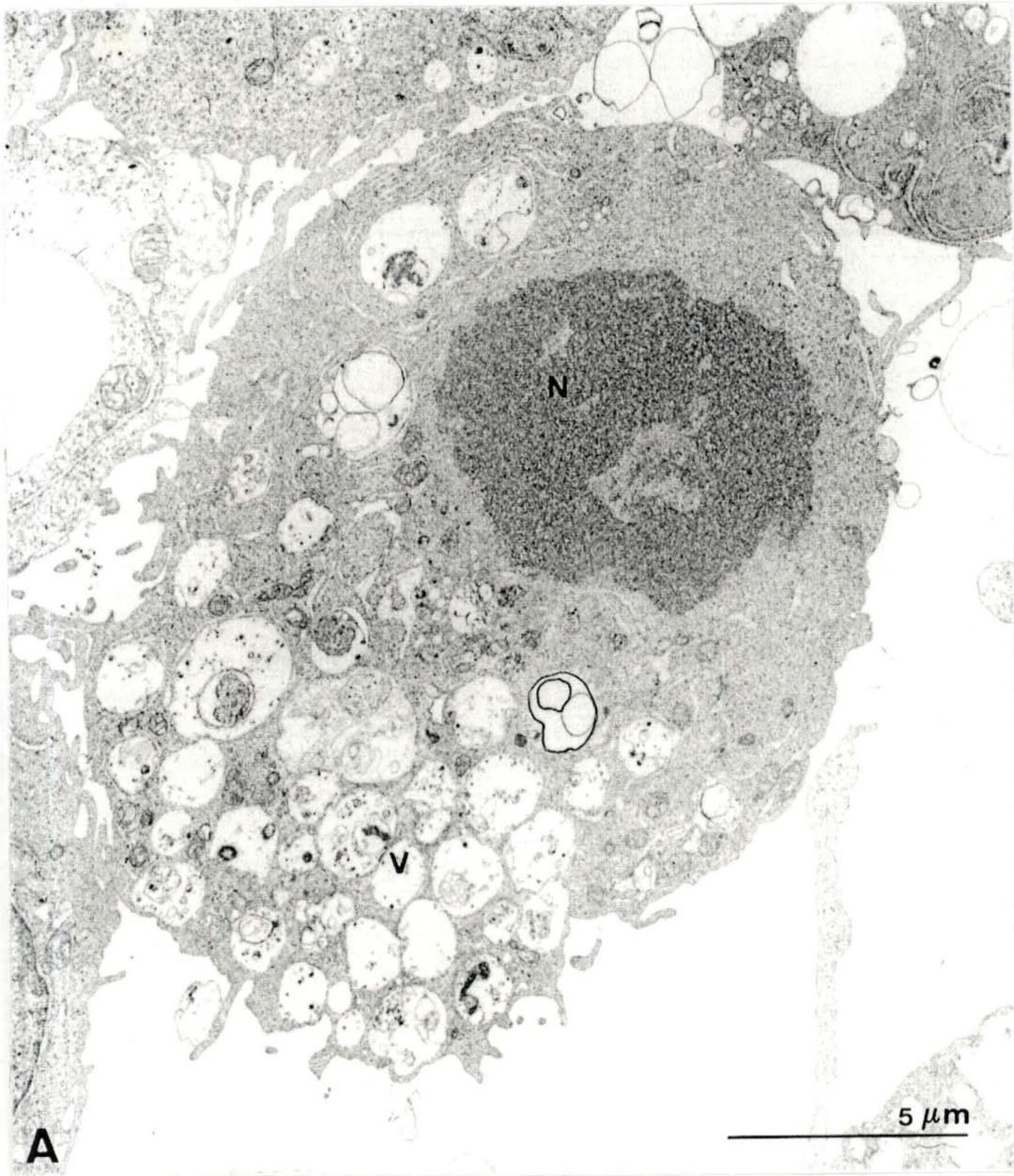
**Figure 4-3 :** Culot de macrophages murins J774 , semi-fines colorées au bleu de toluidine.  
(G : 2000 X)

**A-B :** Les J774 sont des cellules arrondies. Elles présentent un noyau ovoïde ou en forme de "fer à cheval", contenant un ou deux, plus rarement trois nucléoles. Certaines cellules possèdent des vacuoles claires intracytoplasmiques. Lors d'une stimulation au PMA (**B**), le nombre de ces vacuoles augmente par rapport aux J774 non stimulés (**A**).



**Figure 4-6** : Au microscope électronique, les J774 non stimulés présentent au niveau du noyau, une légère marginalisation de la chromatine (MC) et une ségrégation des constituants . Certaines cellules contiennent un réticulum fort dilaté (R) ou des vacuoles claires (V).  
(G : 6250 X)

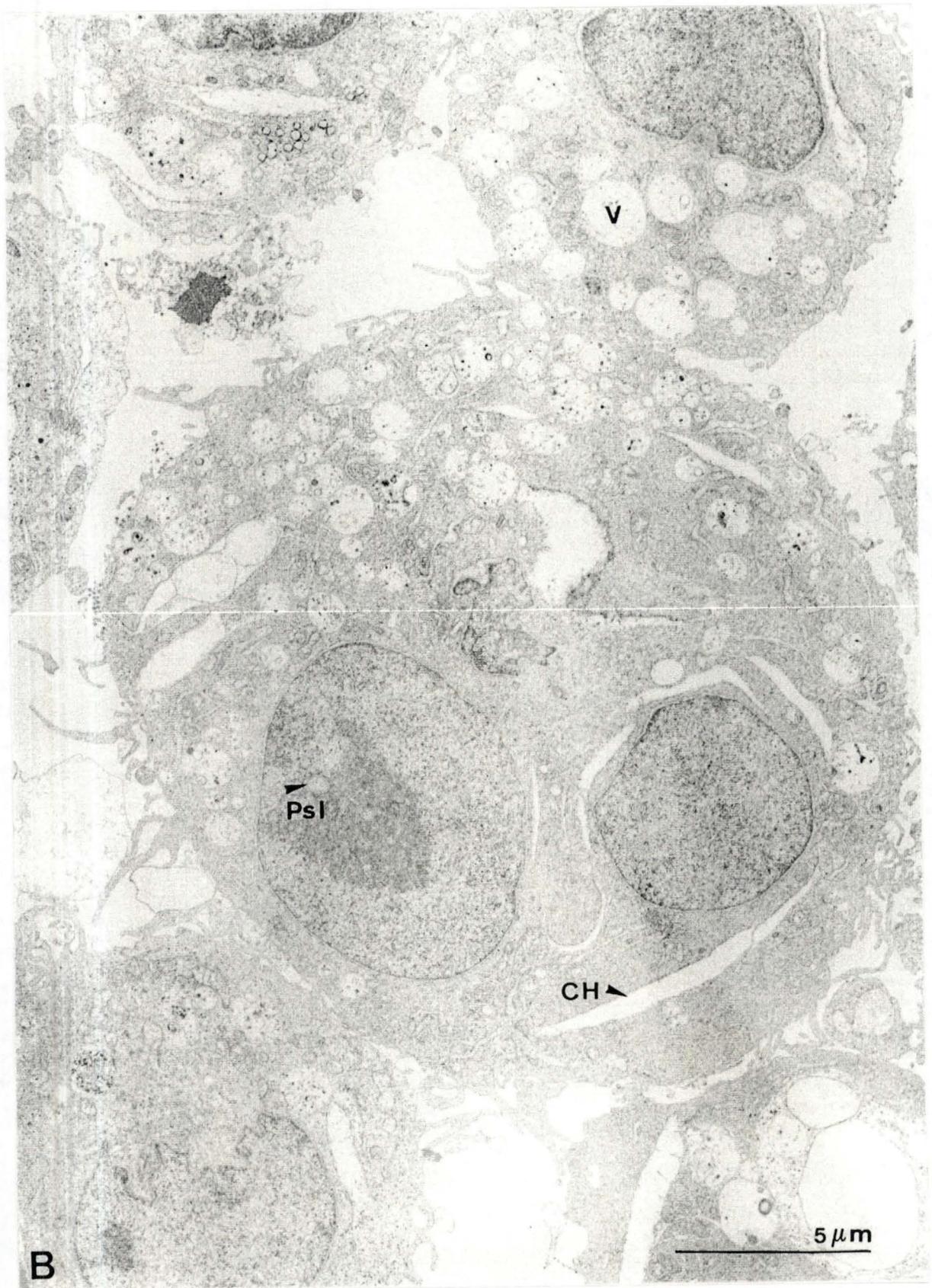


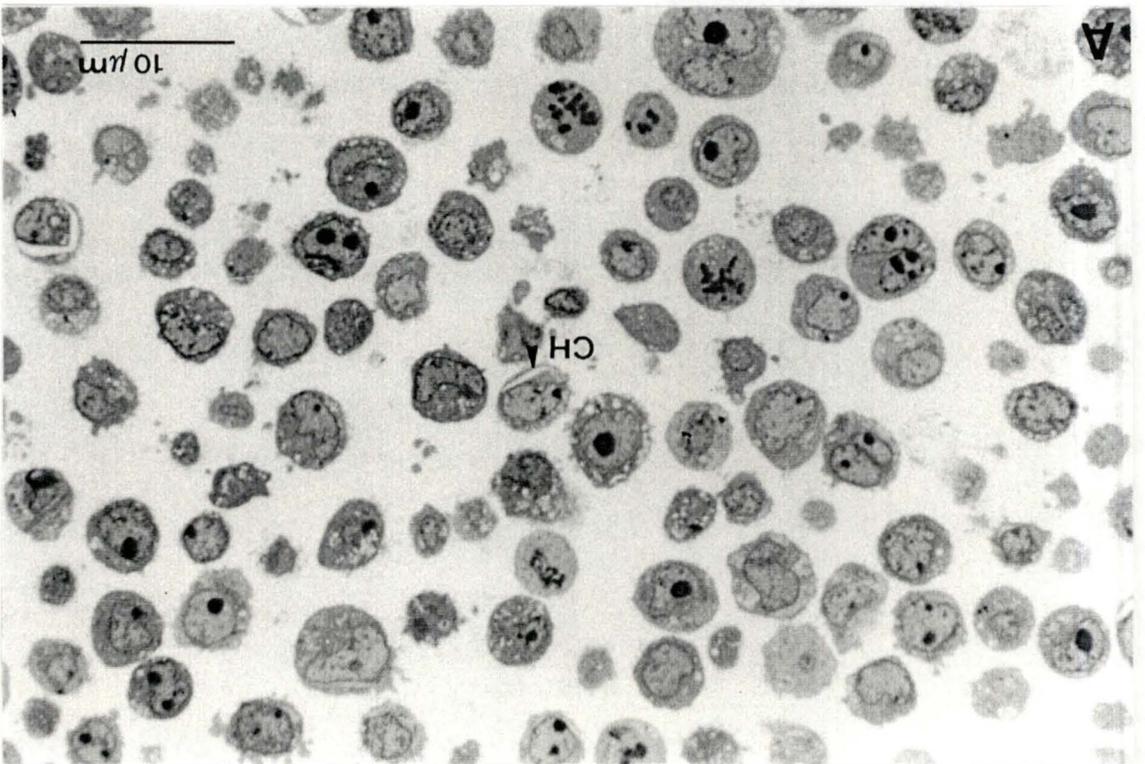
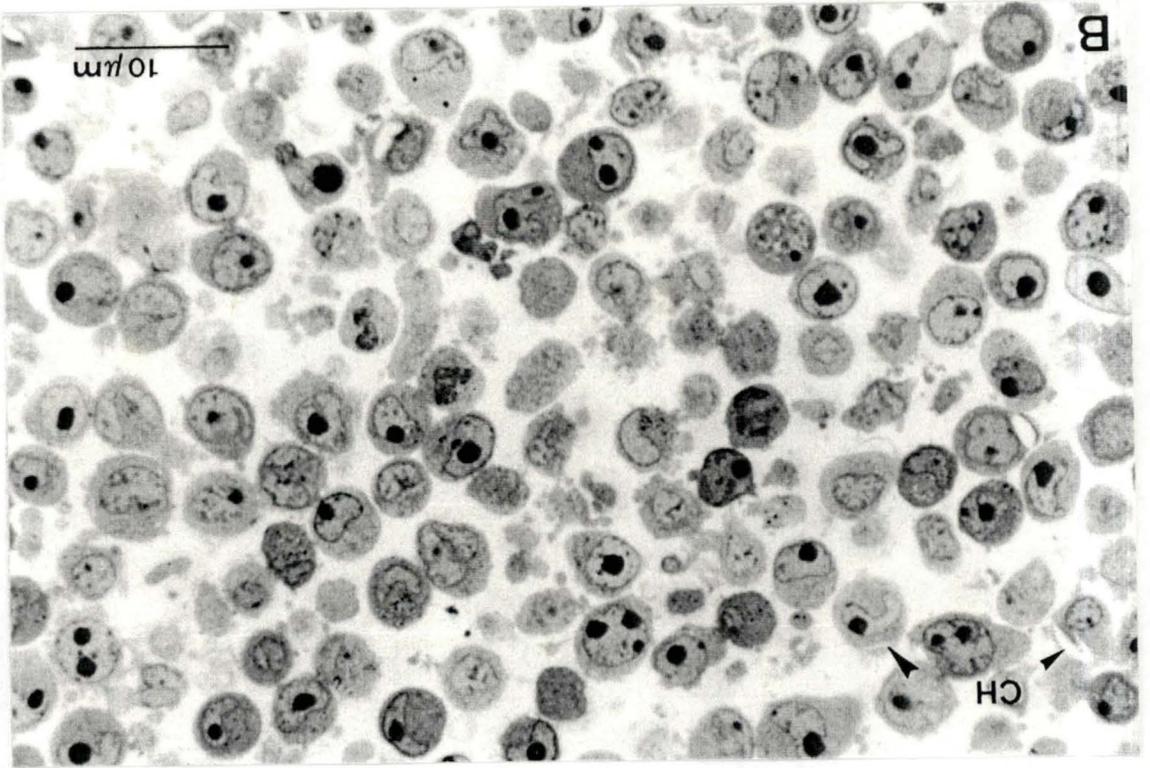


**Figure 4-7** : Les J774 stimulés au PMA présentent un grand nombre de vacuoles (V)  
-A : Malgré la stimulation, le noyau paraît être en mitose (N)

**Figure 4-7** : Les J774 stimulés au PMA présentent un grand nombre de vacuoles (V)

-B :Le noyau présente une inclusion entourée d'une double membrane (PsI). Il s'agit probablement d'une pseudo-inclusion due à l'invagination du cytoplasme dans le noyau. Cette cellule contient également des figures d'aspect caractéristique de cristaux de cholestérol (CH).  
(G : 6250 X)

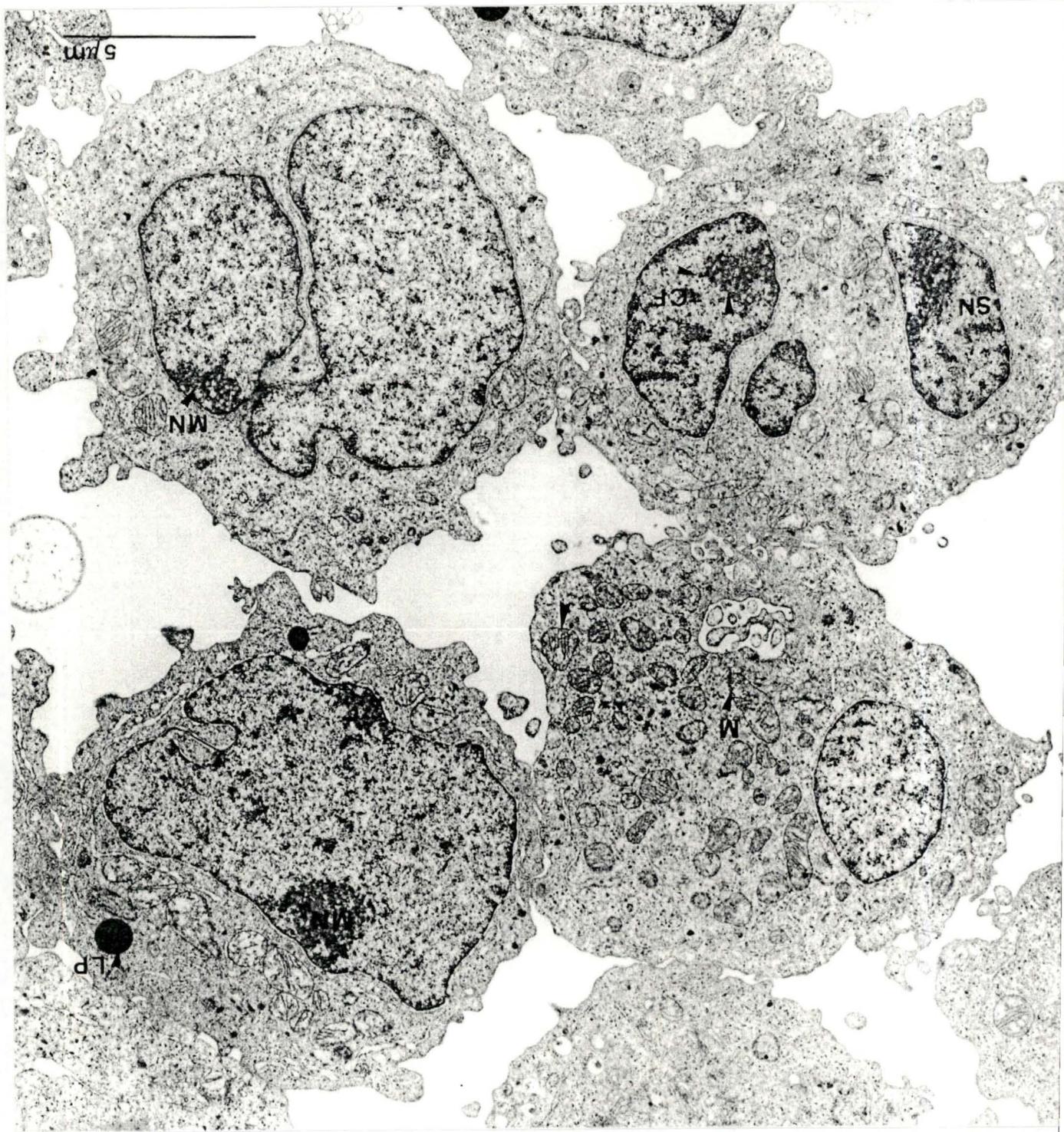




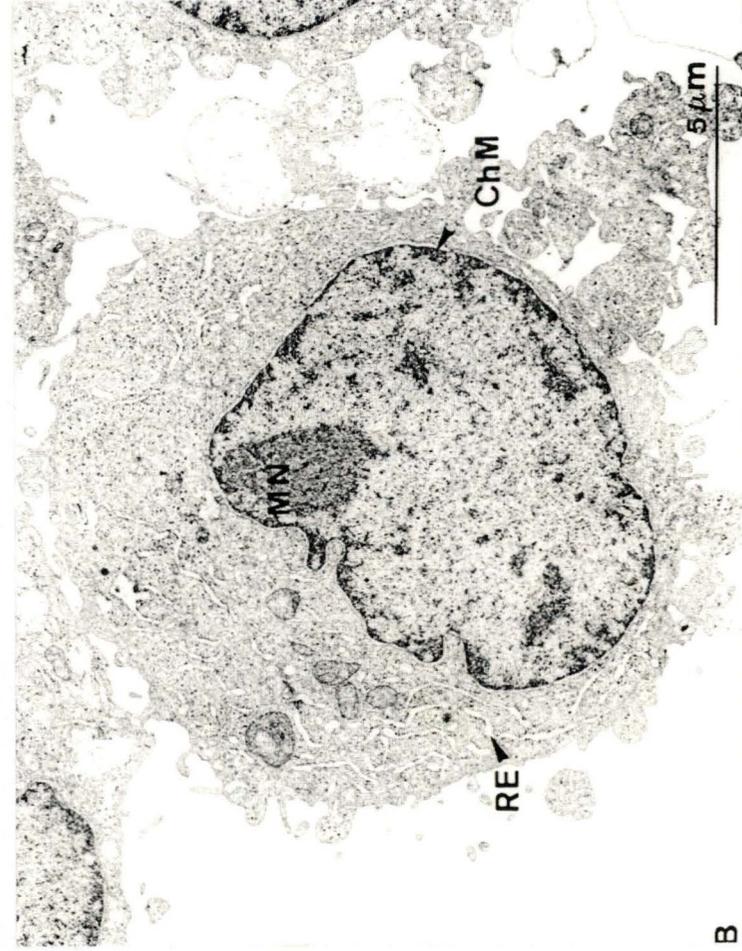
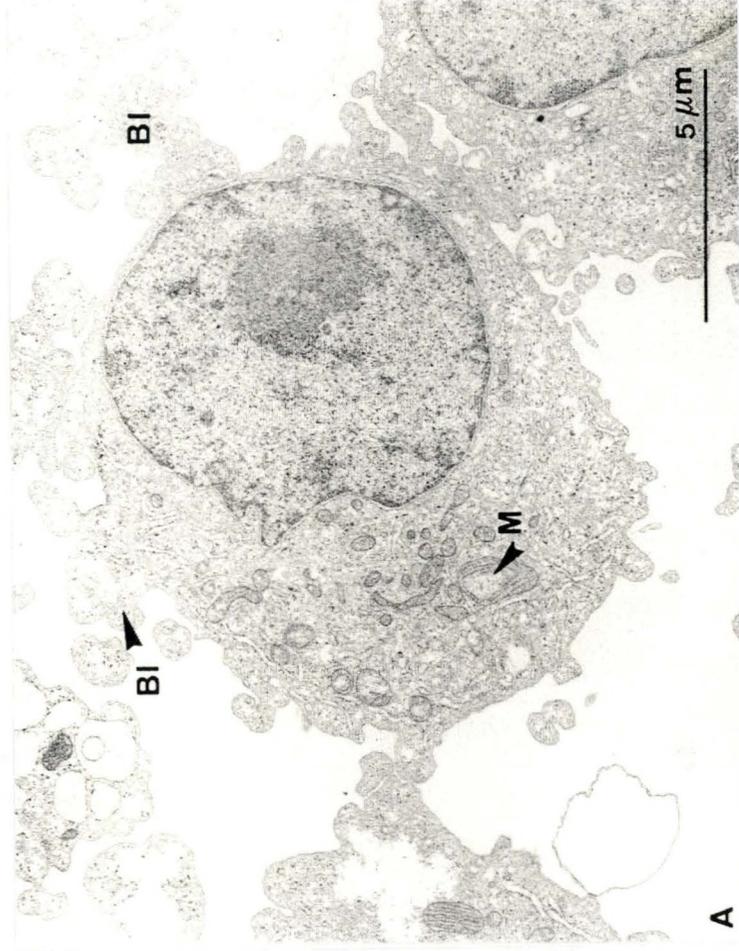
**Figure 4-5 :** Culot de prémyélocytes HL60, semi-fines colorées au bleu de toluidine.  
(G : 2000 X)

**A-B :** Les HL60 sont des cellules arrondies, au noyau de forme variable, parfois lobulé. On remarque chez certaines cellules des figures rappelant des cristaux de cholestérol (CH). Au M.O., nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les cellules stimulées (B), et non stimulées (A).

**Figure 4-8** : Au microscope électronique, les U937 non stimulés apparaissent le plus souvent arrondis. Le noyau d'aspect variable, ovale à lobulé, présente un nucléole marginalisé (MN) avec ségrégation de ses constituants (SC) et apparition des centres fibrillaires (CF). Certaines cellules possèdent des gouttelettes lipidiques (LP) ou des crêtes mitochondriales inhabituelles. (M)  
(G : 6250 X)

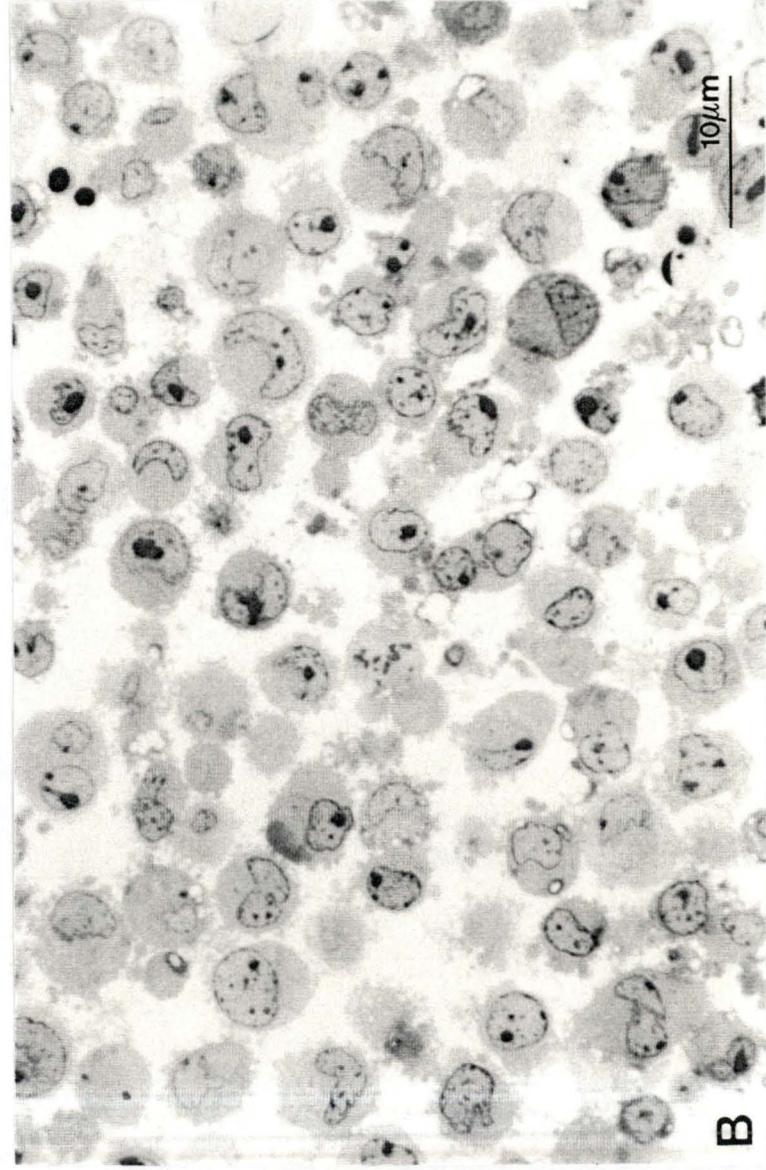
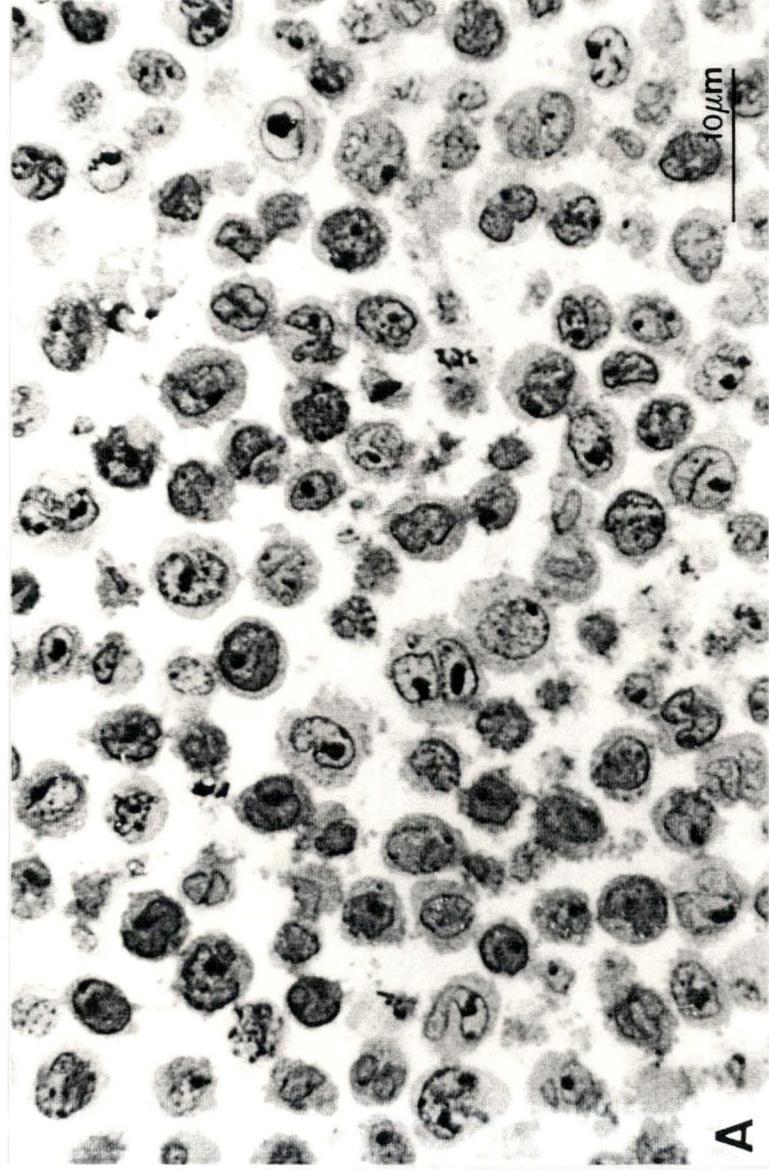


**Figure 4-9** : Dans les U937 stimulés au PMA (A, B), on retrouve, au niveau des noyaux, des nucléoles marginaux (MN), ainsi que la chromatine (ChM). On distingue également des mitochondries à crêtes "variables" (M), des blebs (Bl), et un réticulum fort dilaté.(RE)  
(G : 6250 X)



**Figure 4-4 :** Culot de monocytes U937, semi-fines colorées au bleu de toluidine  
(G: 2000 X)

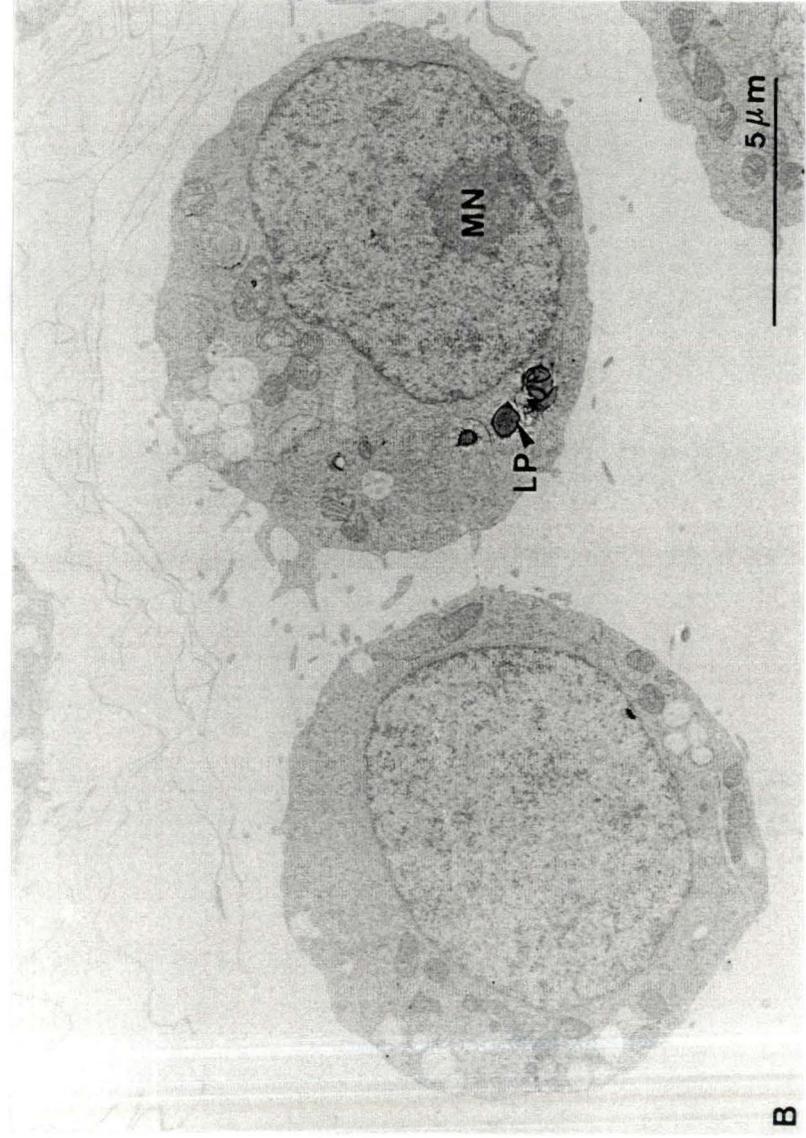
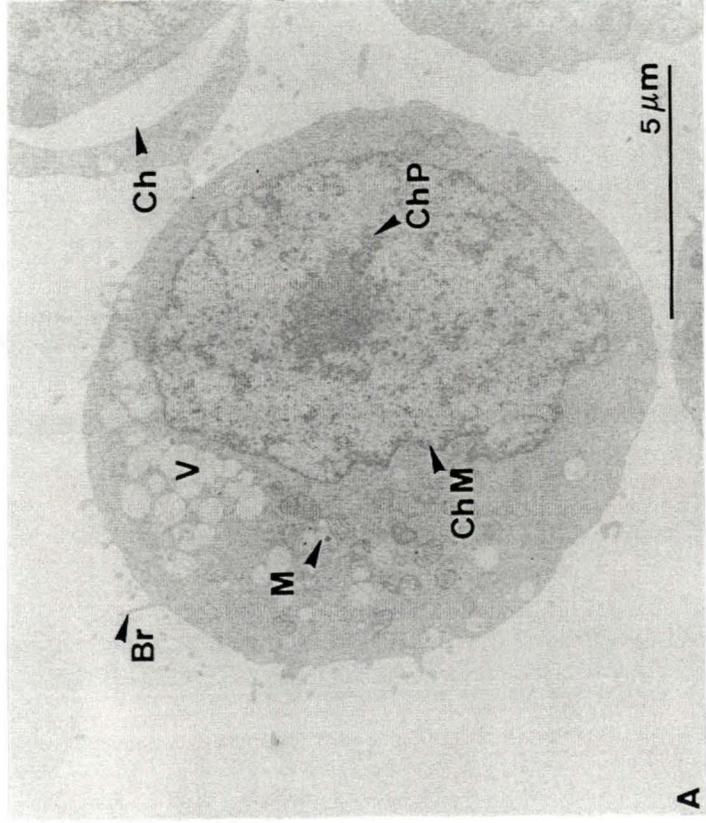
**A-B :** Les U937 possèdent un noyau de forme variable, avec généralement un nucléole. La surface des cellules est recouverte de blebs dont le nombre et la taille augmentent lorsque les cellules sont stimulées au PMA (**B**). Les U937 non stimulés (**A**), ne contiennent que peu de vacuoles claires.

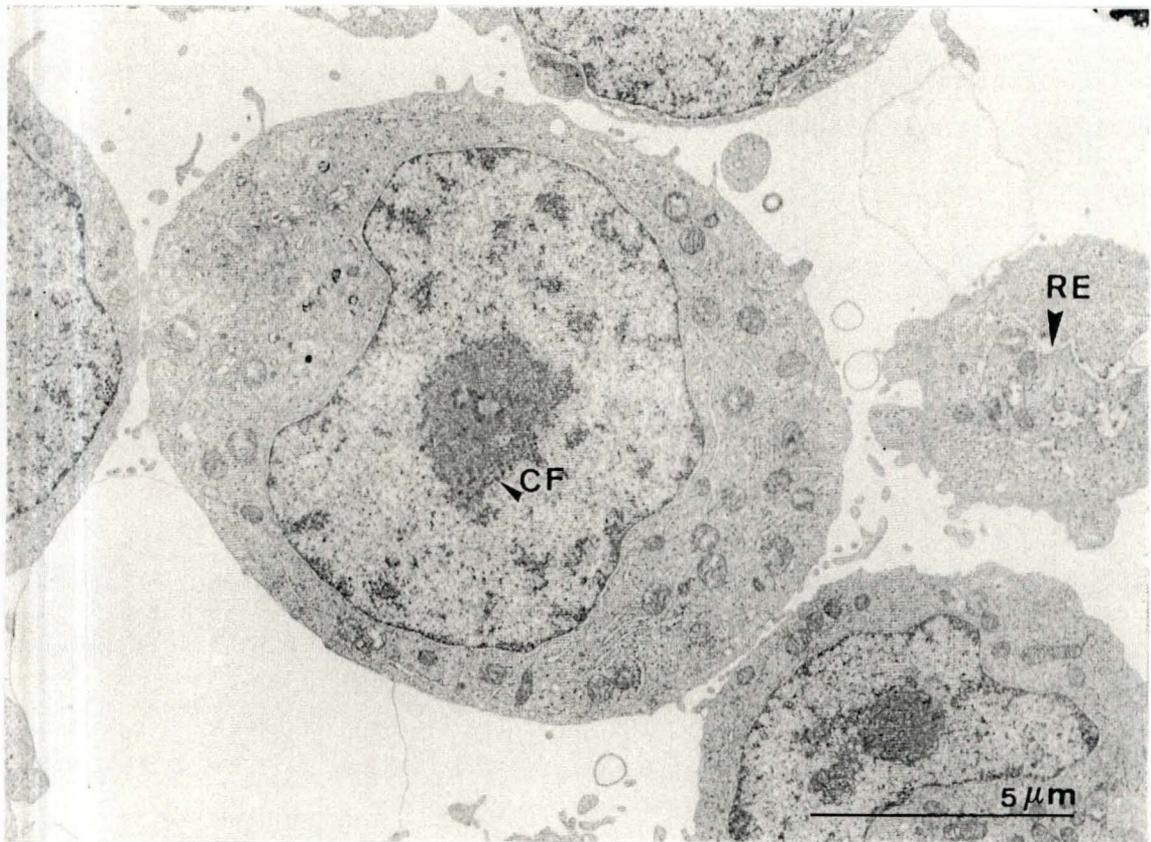


**Figure 4-10** : Les HL60 sont rondes, présentant de petits bras (Br), ainsi que des structures rappelant les cristaux de cholestérol (Ch). Les cellules présentent également des vacuoles claires (V).

-A : Notez une marginalisation de la chromatine (ChM) et la présence de chromatine périnucléolaire (ChP).

-B : Dans le cytoplasme de la cellule, quelques gouttelettes lipidiques sont visibles. (LP) Le noyau contient un nucléole marginalisé (NM).  
(G : 6250X)





**Figure 4-11** : Les HL60 activés sont de forme arrondie. Ils possèdent des mitochondries à crêtes variables. Le noyau possède un nucléole où il y a ségrégation des constituants et apparition des structures fibrillaires (CF) Certaines cellules contiennent un réticulum endoplasmique gonflé.(RE)  
(G: 6250 X).

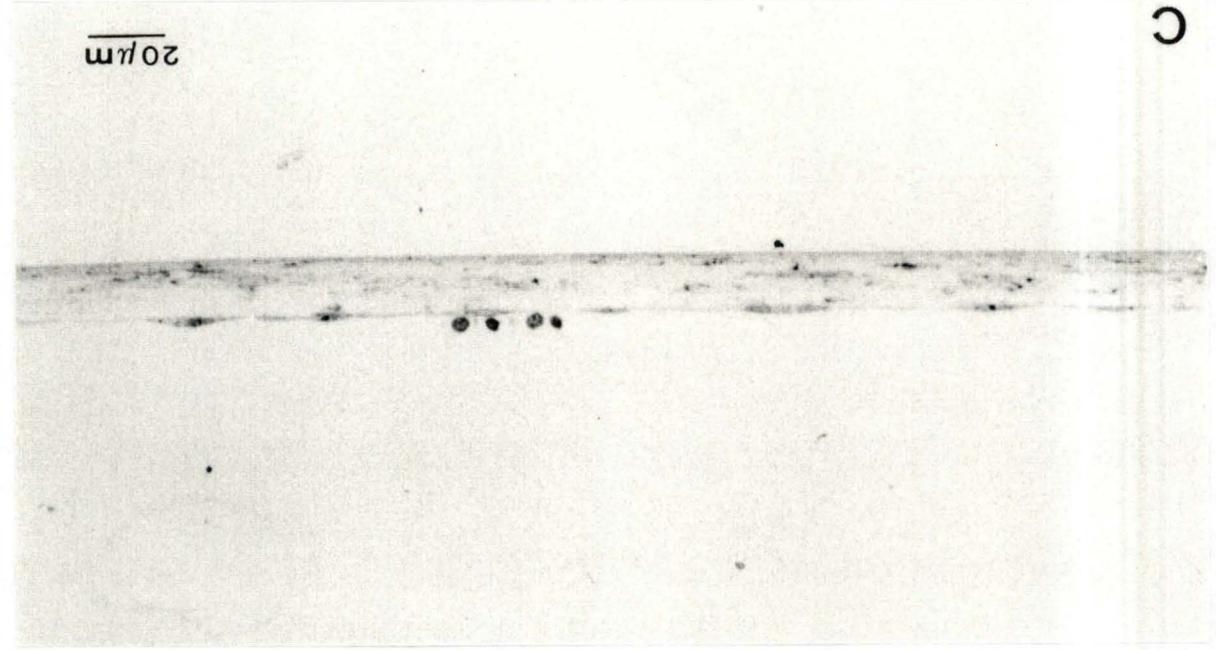
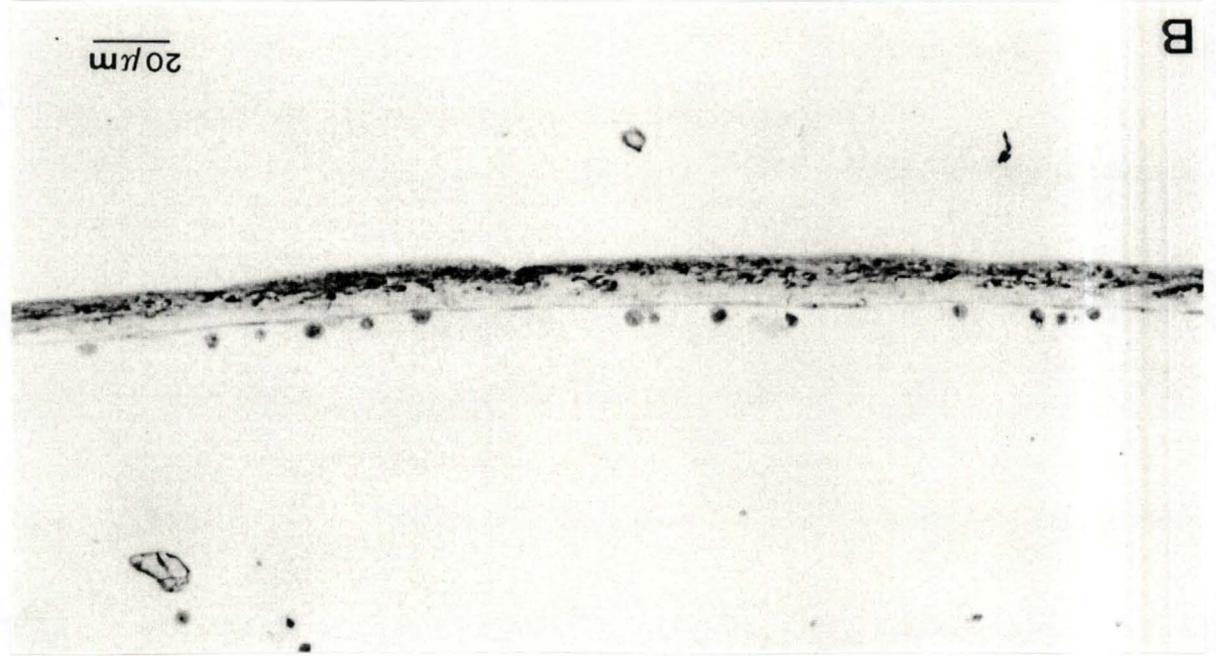
**Figure 4-12** : Cocultures de 6 heures de cellules endothéliales et de cellules de lignées monocytaires, semi-fines colorées au bleu de toluidine. Coupe transversale (G : 500 X)

La coloration est plus marquée du côté épithélial. La coloration au bleu de toluidine étant non spécifique, l'intensité du marquage est fonction de la quantité de matériel colorable, dans ce cas, de la densité du tissu conjonctif.

-A : Coculture sur membrane amniotique de cellules endothéliales et de J774 (lignée macrophagique d'origine murine). Les J774 forment des agrégats qui se disposent en amas sur l'assise de cellules endothéliales. Le nombre de macrophages adhérant à l'endothélium est important.

-B : Coculture sur membrane amniotique de cellules endothéliales et de U937 (lignée monocyttaire d'origine humaine). Les U937 se disposent de manière plus homogène sur l'endothélium, sans former d'agrégat. Le nombre de cellules qui adhèrent à l'assise endothéliale est moins important que pour les J774 (A).

-C : Coculture sur membrane amniotique de cellules endothéliales et de HL60 (lignée prémyélocytaire d'origine humaine). Le nombre de HL60 adhérentes est faible.

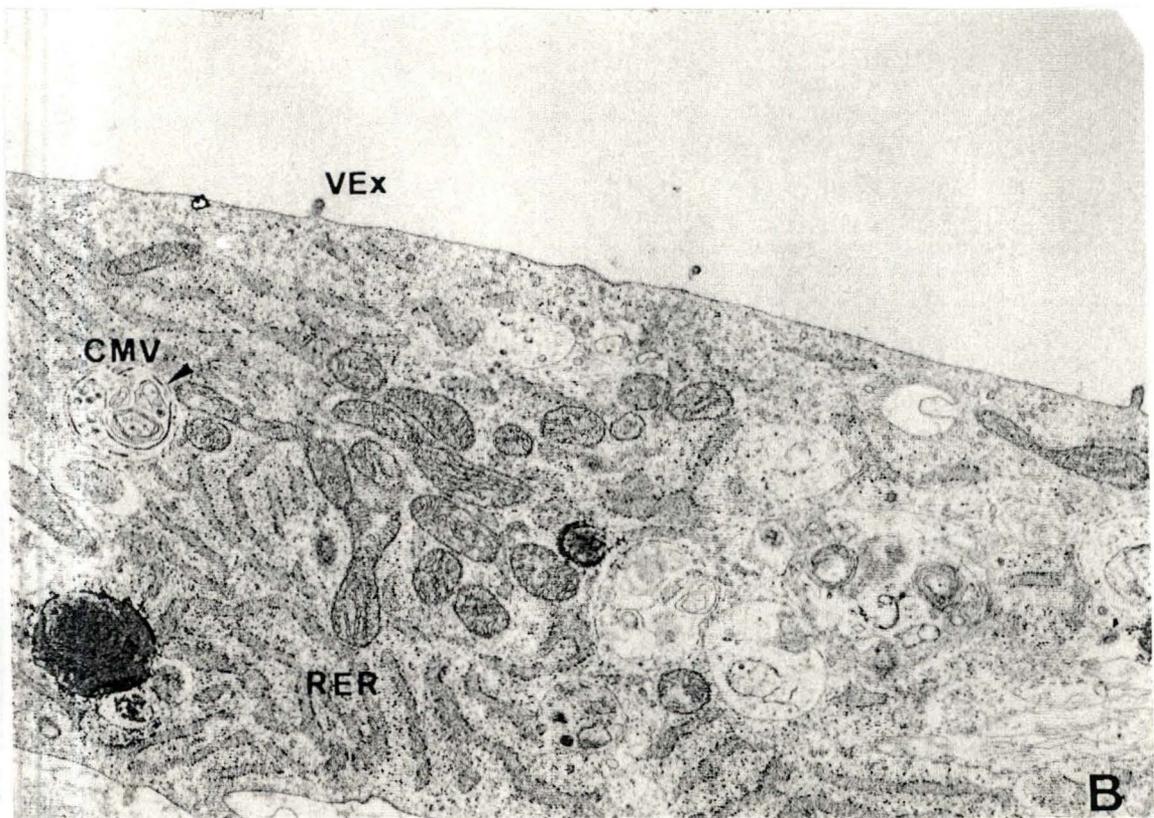
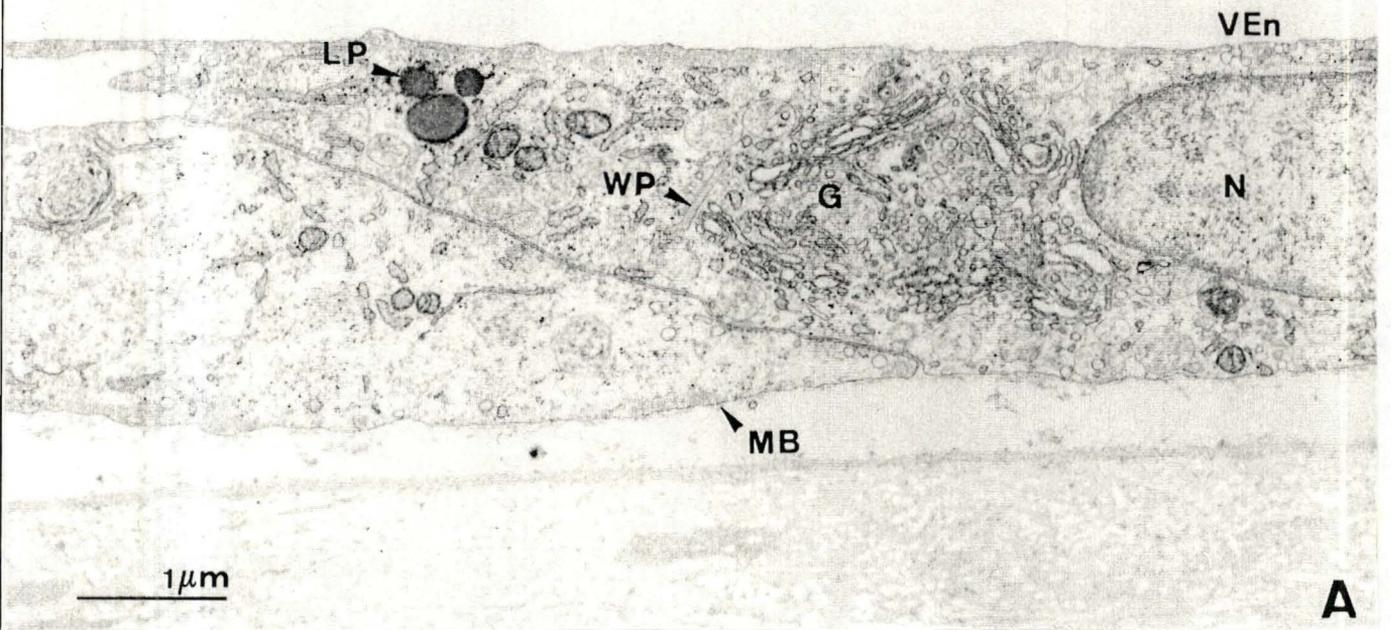


**Figure 4-1** : Cellules endothéliales sur membrane amniotique en coupe transversale.  
(G : 17500 X)

-A : Dans les cellules, on distingue un noyau ovoïde (N), un corps de Golgi extrêmement développé (G), quelques gouttelettes lipidiques (LP), des vésicules d'endocytose (VEn), et un corps de Weibel-Palade (WP).

-B : Présence de corps multivésiculaires (CMV), de vésicules d'exocytose (VEx) et d'un réticulum endoplasmique rugueux dilaté rempli de produits de synthèse (RER).

Les cellules semblent avoir synthétisé une membrane basale. (MB).





**Figure 4-2 :** Cellules endothéliales observées au microscope à balayage.  
(G : 12300 X)

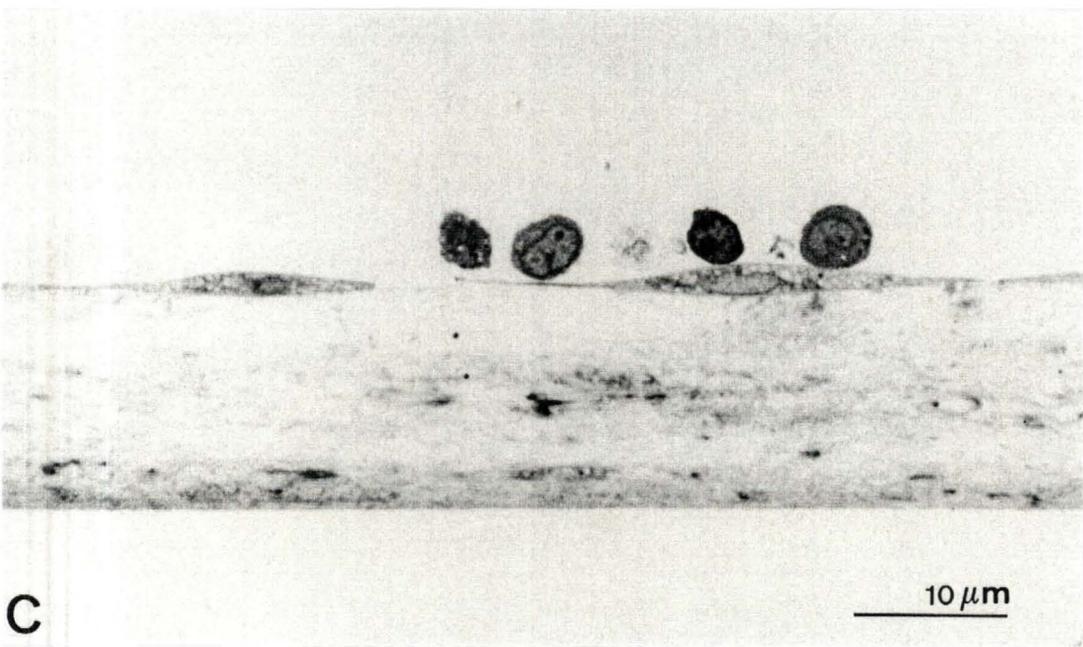
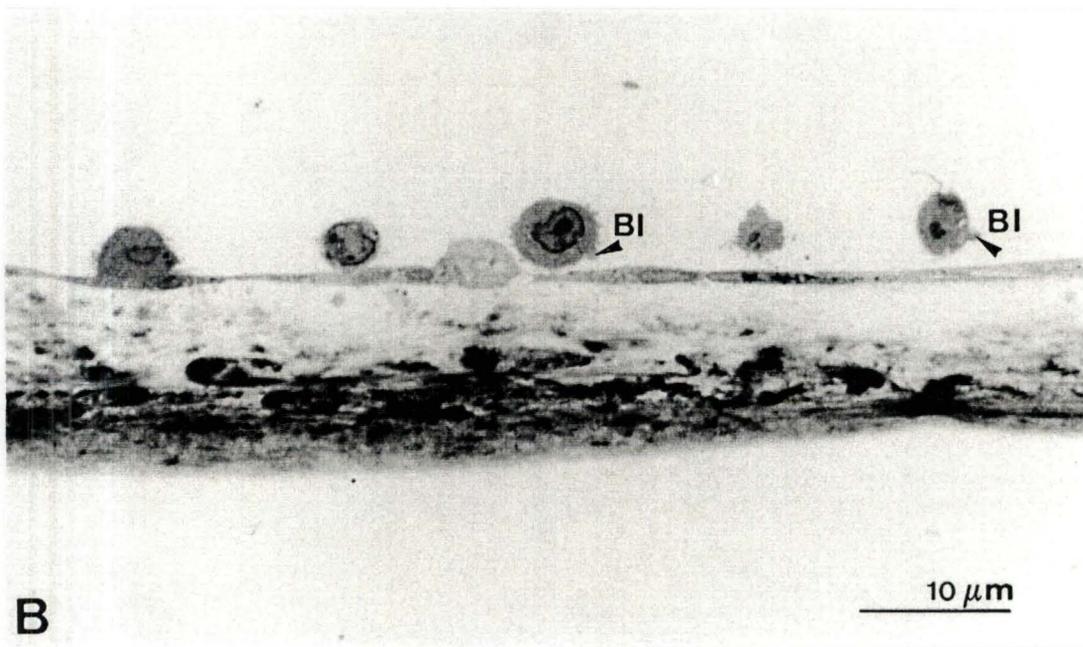
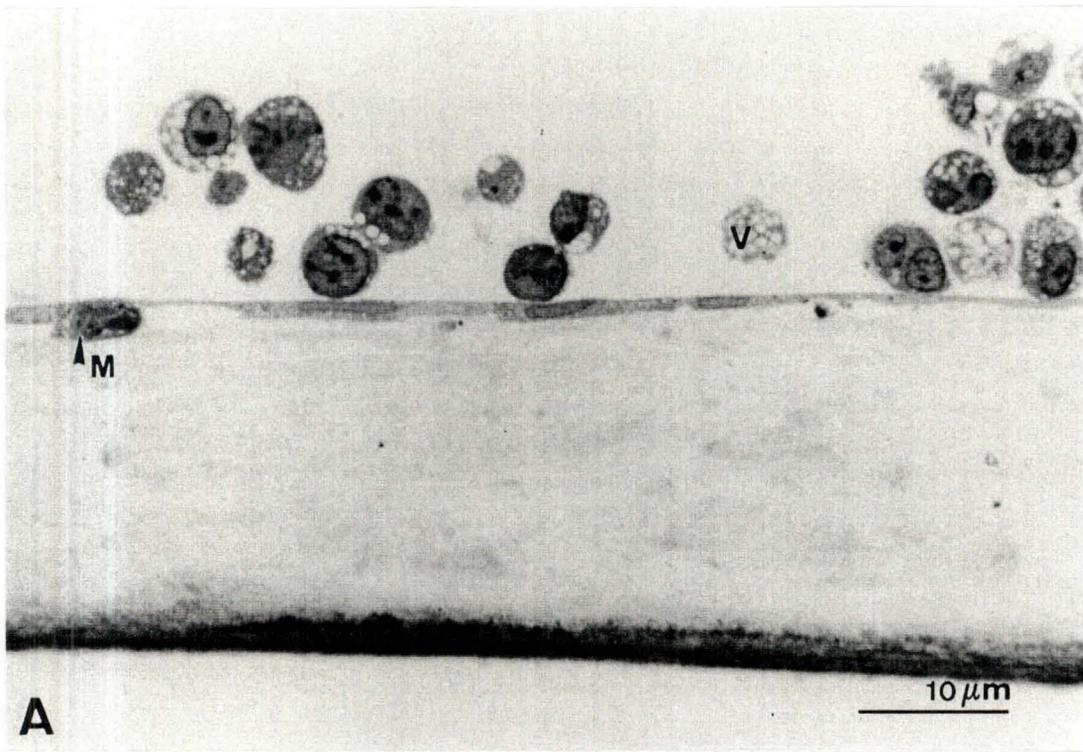
On distingue au centre le noyau légèrement saillant et rugueux (N) et les jonctions de trois cellules (J). Aux points de leur rencontre, les cellules forment des bras qui s'entrecroisent et se chevauchent.

**Figure 4-13** : Cocultures de cellules endothéliales et de cellules de lignées monocytaires, semi-fines colorées au bleu de toluidine. Coupe transversale.  
(G : 2000 X)

-**A** : Coculture sur membrane amniotique de cellules endothéliales et de J774. Les macrophages présentent un grand nombre de vacuoles claires (V). On peut distinguer les noyaux et les nucléoles. Un J774 a traversé l'endothélium (M) sans qu'il y ait dégradation apparente des cellules.

-**B** : Coculture sur membrane amniotique de cellules endothéliales et de U937. Les monocytes présentent des blebs à leur surface.(B1)

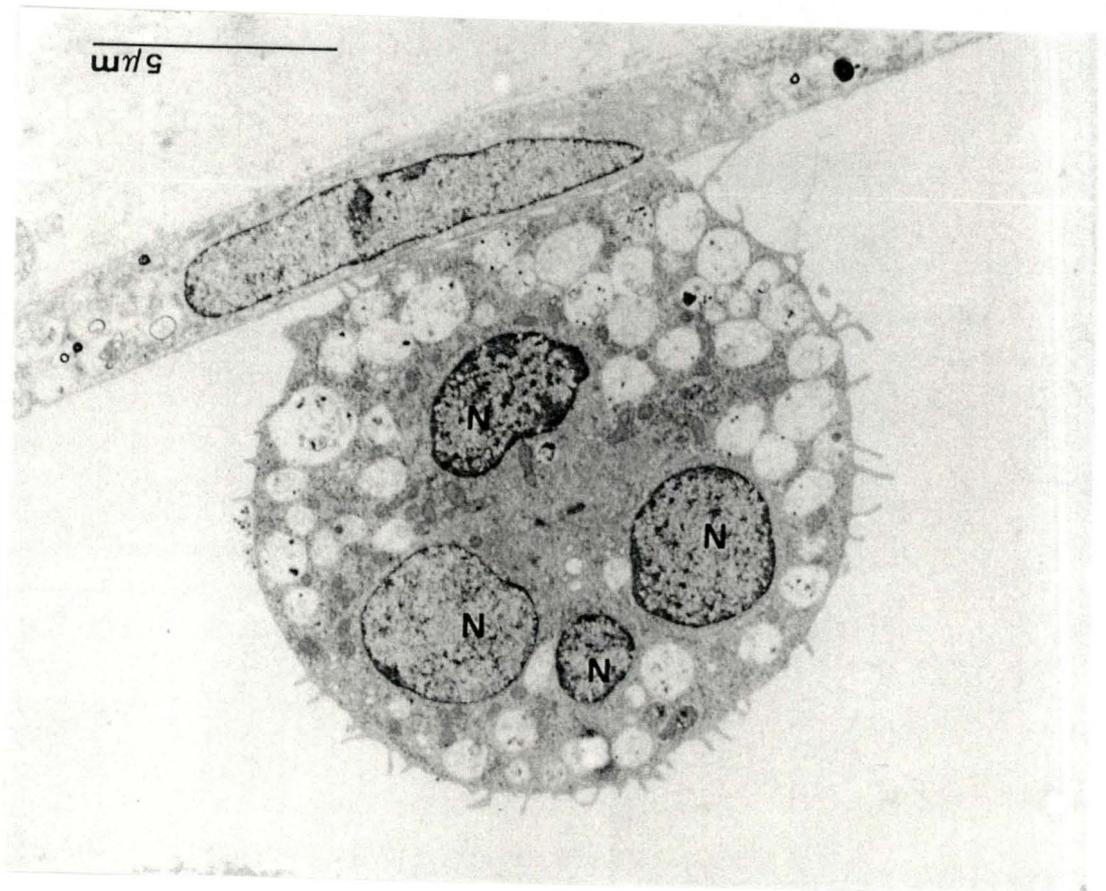
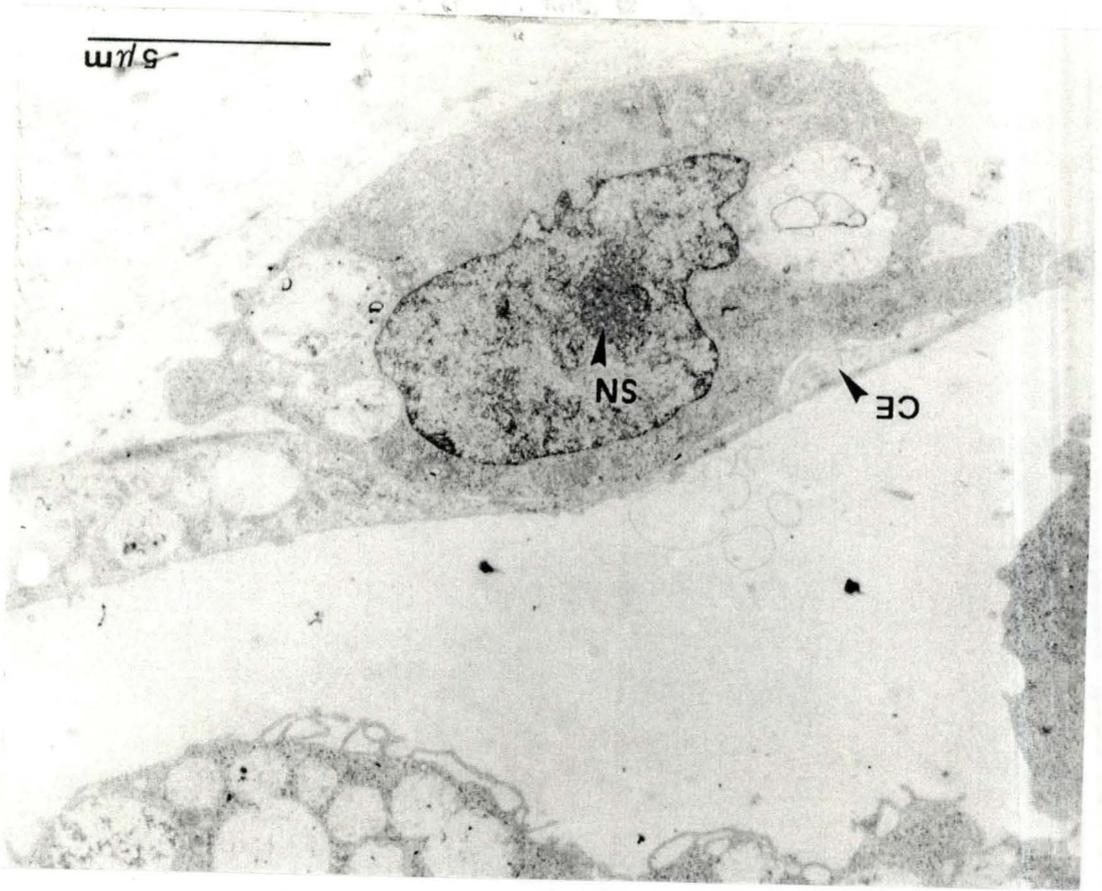
-**C** : coculture sur amnios de cellules endothéliales et de HL60. Les prémyélocytes HL60 sont de forme ovale . Le noyau est en forme de "fer à cheval".



**Figure 4-14** : Coupe transversale d'une coculture de cellules endothéliales et de J774.  
(G : 6250 X)

-A : J774 adhérant à une cellule endothéliale. On observe l'aspect en croix du noyau des cellules leucémiques myélomonocytaires (N) et la ségrégation de ses constituants. Les macrophages présentent de nombreuses vacuoles claires ainsi qu'une série de pseudopodes.

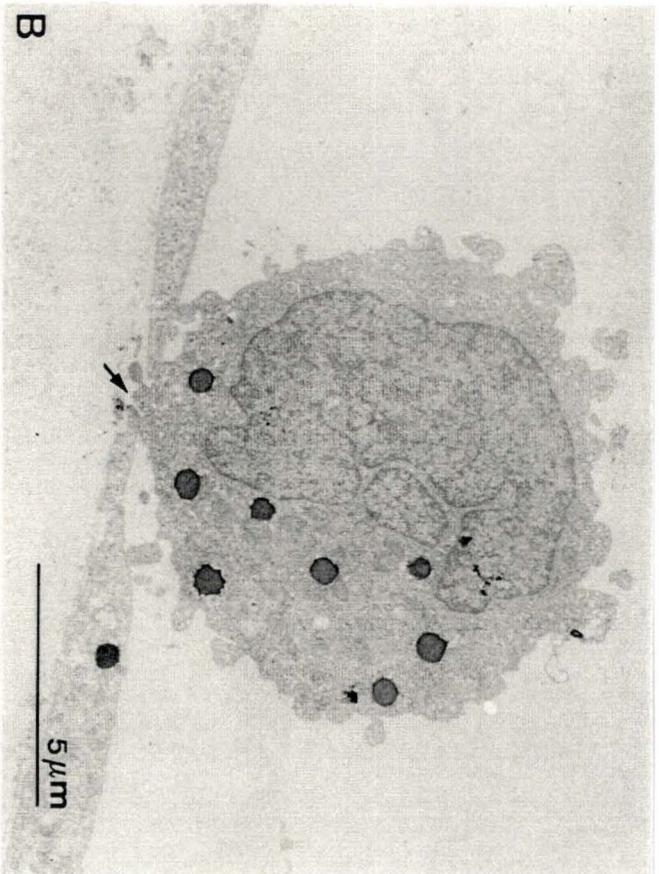
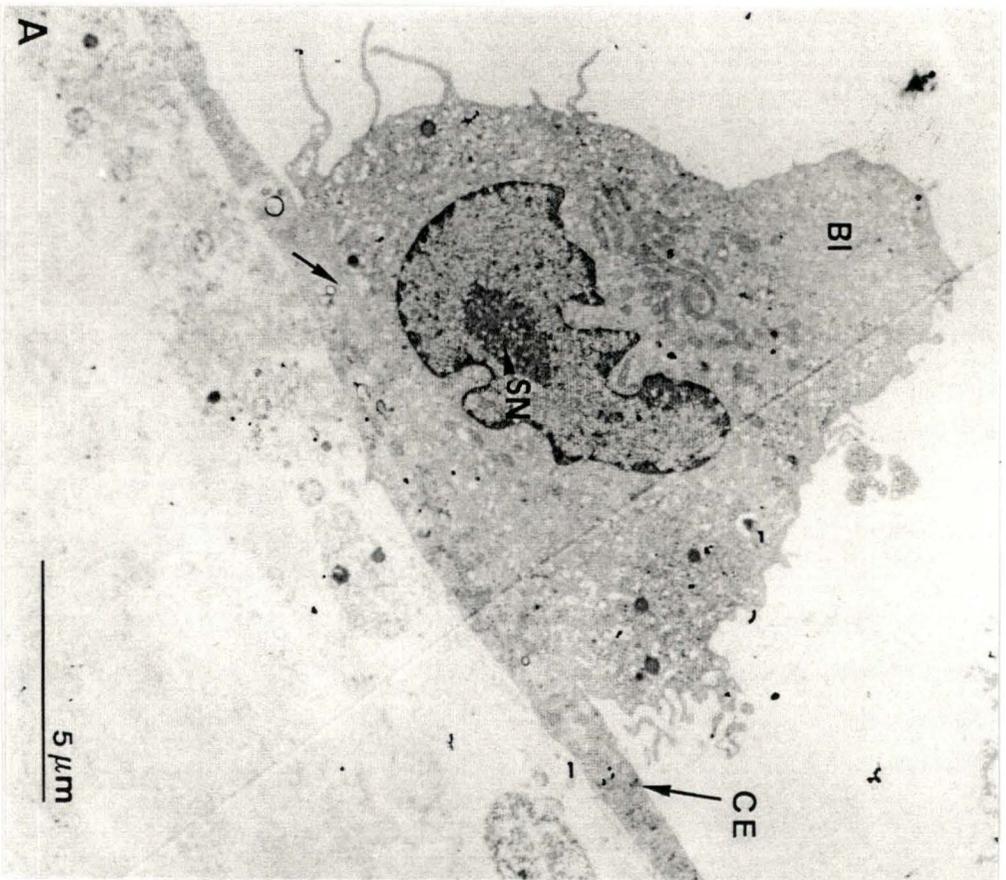
-B Un J774 est passé sous les cellules endothéliales. La cellule présente une ségrégation des constituants nucléaires (SN). On remarque que le macrophage épouse les ondulations de la cellule endothéliale. (CE)

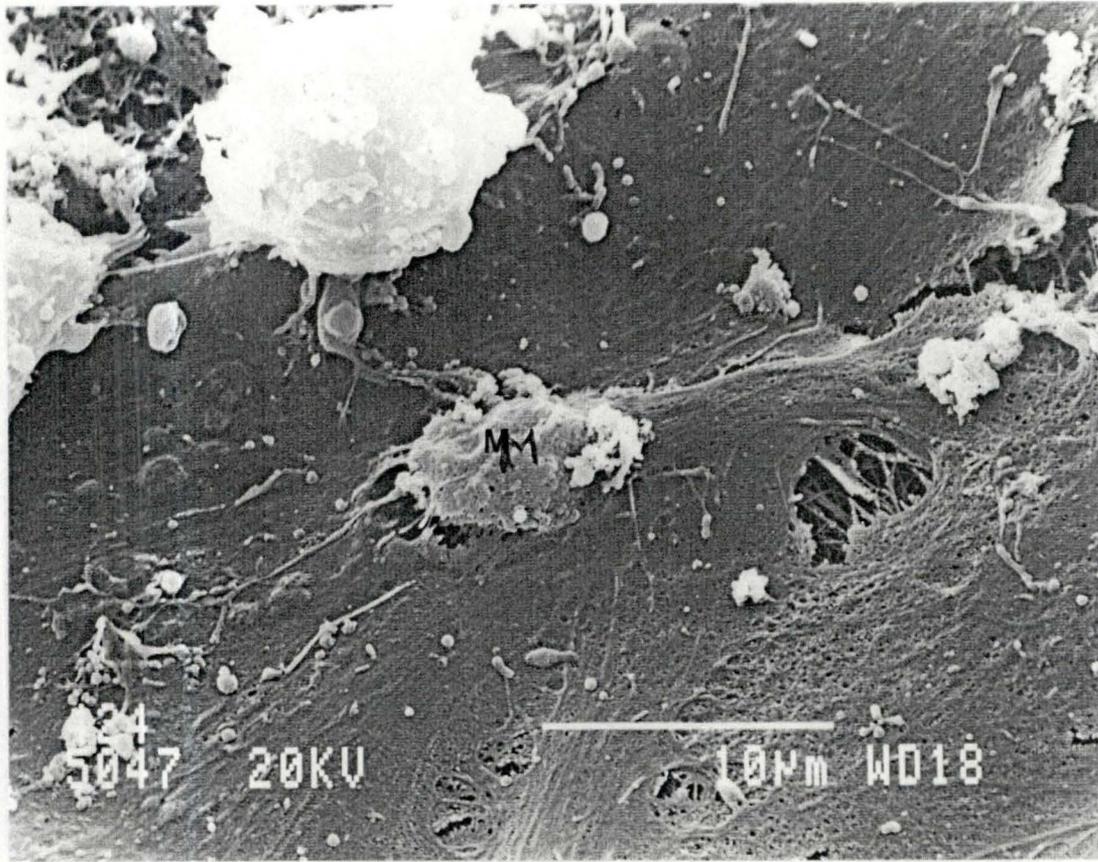


**Figure 4-15:** Coupe transversale d'une coculture de cellules endothéliales et de U937  
(G : 6250 X)

-A : U937 fixé à la cellule endothéliale (CE). Au sommet de la cellule, on remarque la présence d'un bleb (Bl) qui lui confère un aspect triangulaire. On peut observer la ségrégation des constituants nucléolaires (SN). Au niveau de la surface de contact entre le macrophage et la cellule endothéliale, on peut voir une série de petites vacuoles d'endocytose (flèche).

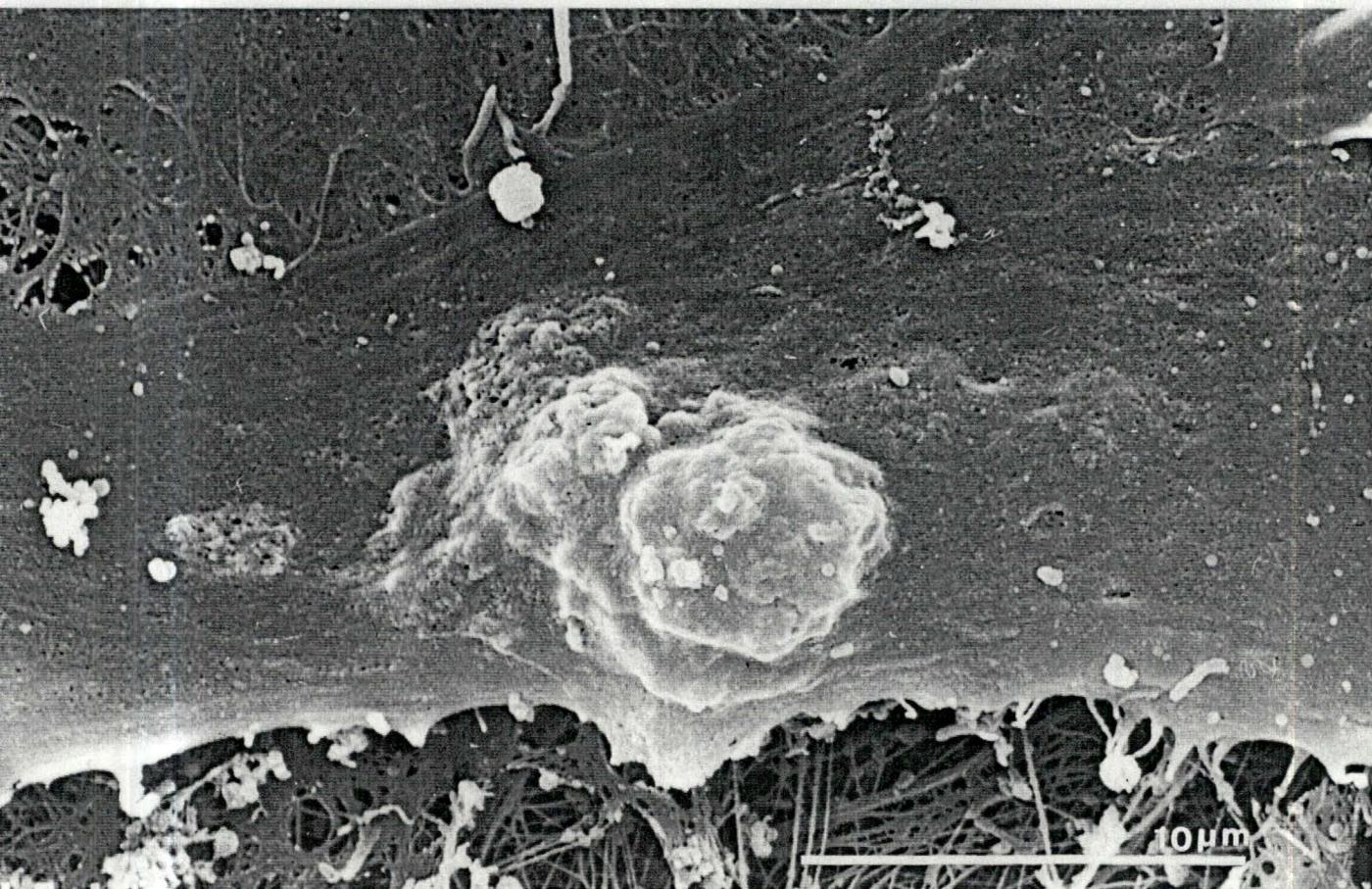
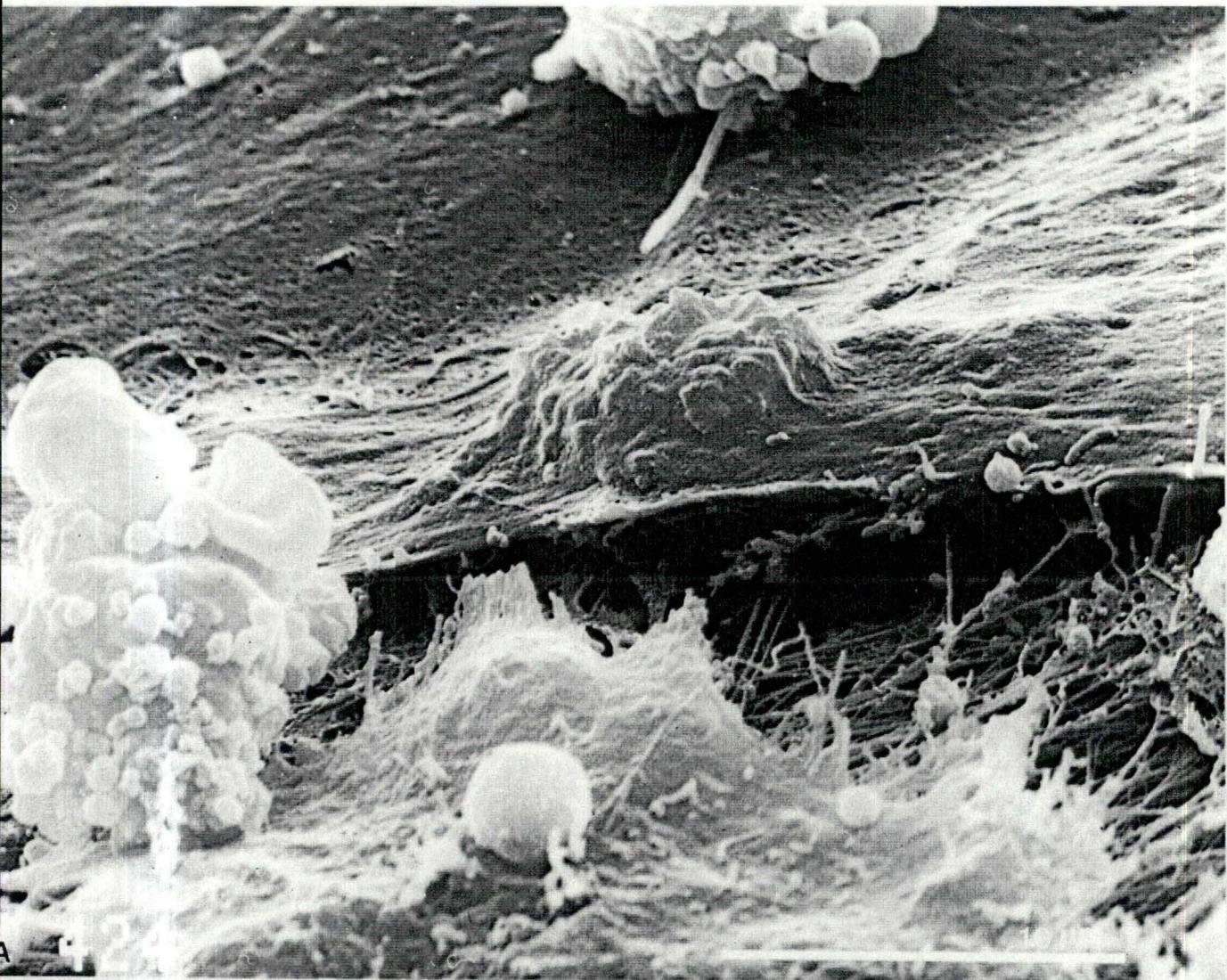
-B : U937 en train de traverser l'endothélium (flèche). On remarque également une déchirure de la cellule endothéliale.



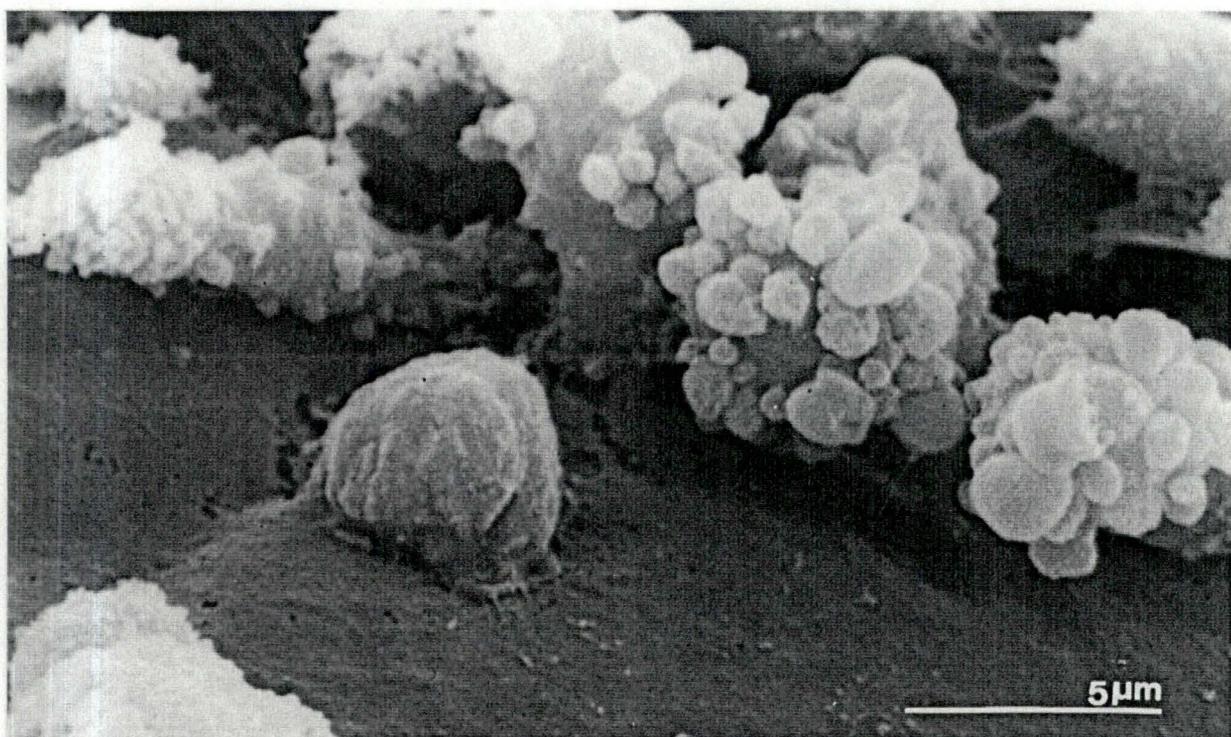


**Figure 4-22:** Au microscope à balayage, la cellule endothéliale semble phagocyter un macrophage mort.(M) (G : 6250 X).

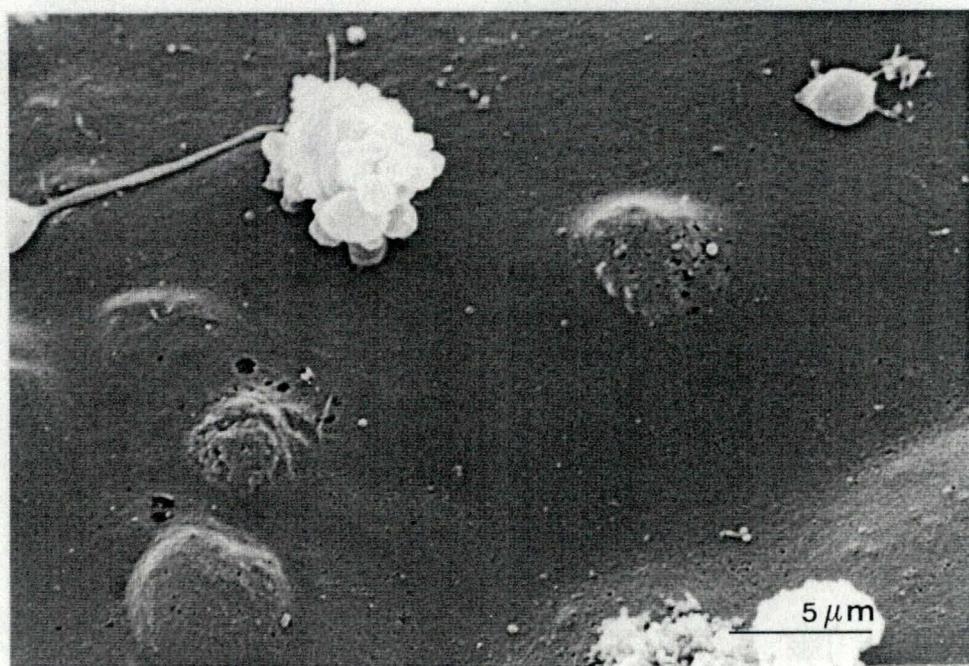
**Figure 4-23** : Micrographies d'une même cellule endothéliale, prises avec un angle de 90° (A) et 0° (B) par rapport à la verticale. La cellule endothéliale présente une protubérance rugueuse. Lorsqu'on la regarde sous la cellule (A), on observe, en arrière plan, une série de filaments (probablement de la laminine ou du collagène), mais pas la base de ce qui pourrait être un macrophage. La cellule endothéliale a probablement phagocyté un macrophage.  
(G : 6250 X)



**Figure 4-20** : Coculture de cellules endothéliales et de J774 observée au microscope à balayage. Le passage des monocytes se ferait par adhésion, suivie d'une pénétration au niveau de l'attachement (A) (G : 6600 X). La cellule endothéliale retrouve son intégrité après le passage du monocyte (B). (G : 3800 X)



A

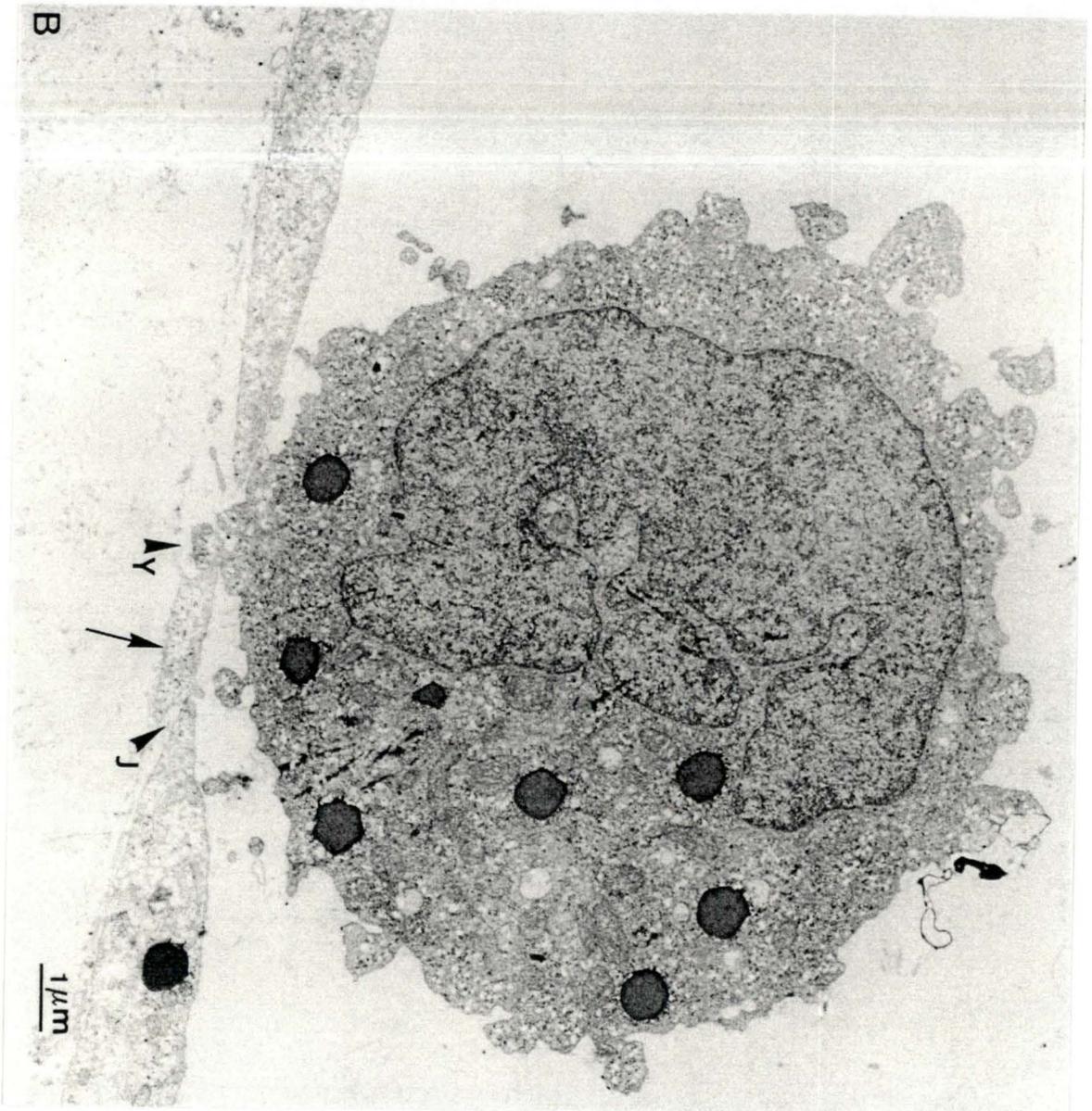
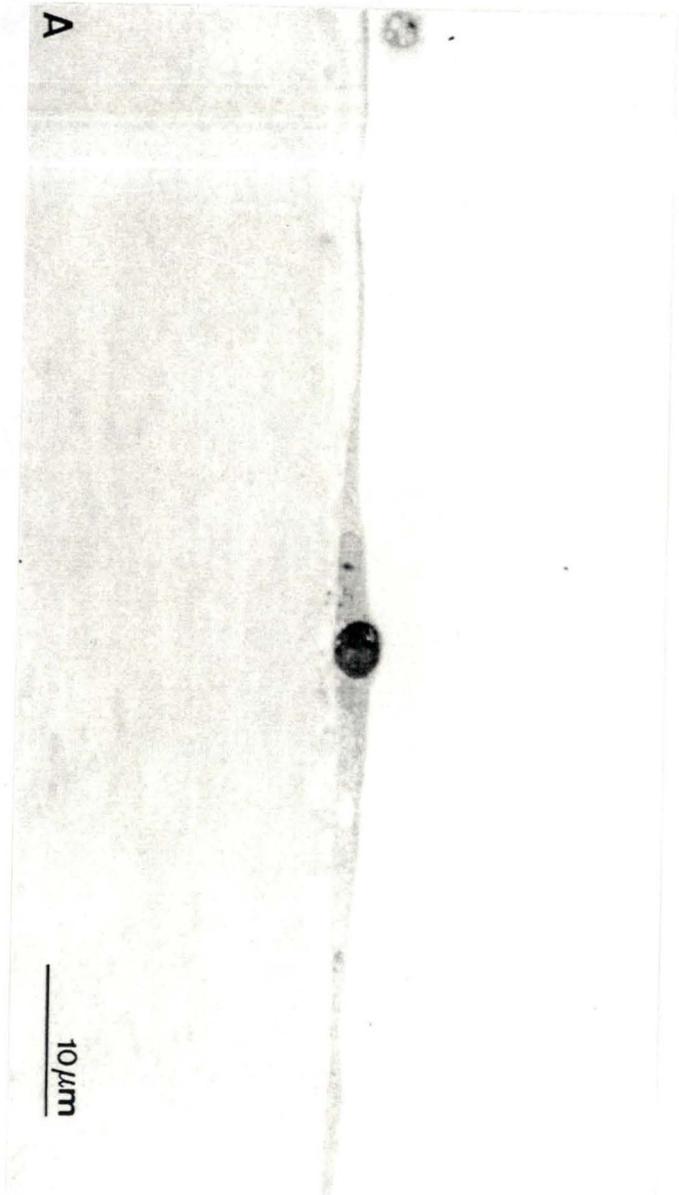


B

**Figure 4-19** : J774 et U937 traversent l'endothélium en pénétrant à travers la cellule endothéliale (empéripolèse).

-A : Coupe transversale d'une coculture de J774 colorée au bleu de toluidine .On pourrait distinguer le noyau et un nucléole. Puisque la coloration est bien délimitée, il est possible que le macrophage garde son intégrité. (G : 2000 X)

-B : Cette micrographie montre un U937 amorçant sa traversée de l'endothélium par l'émission d'un pseudopode (Y) (cfr. texte). (G : 10625 X).



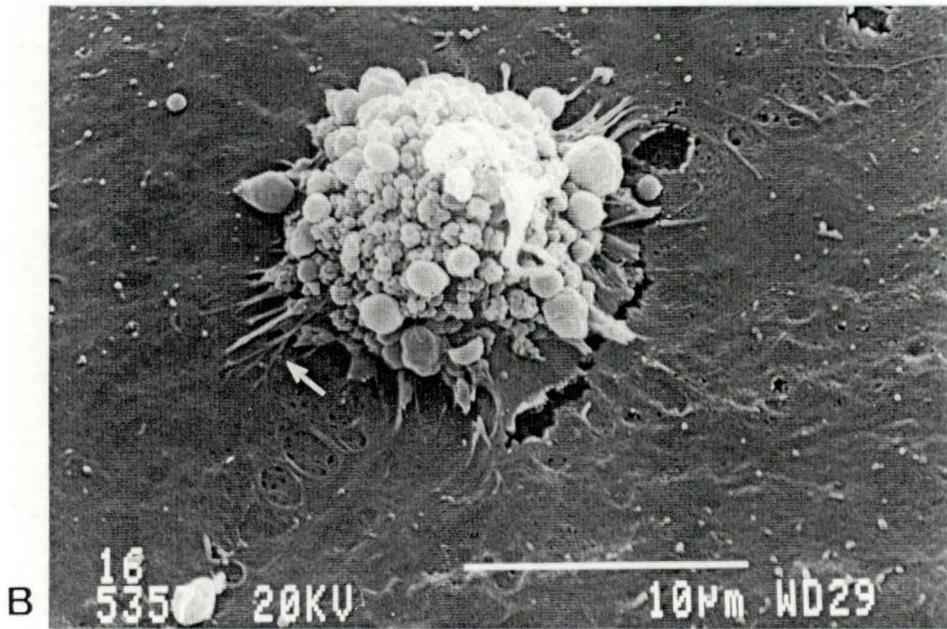
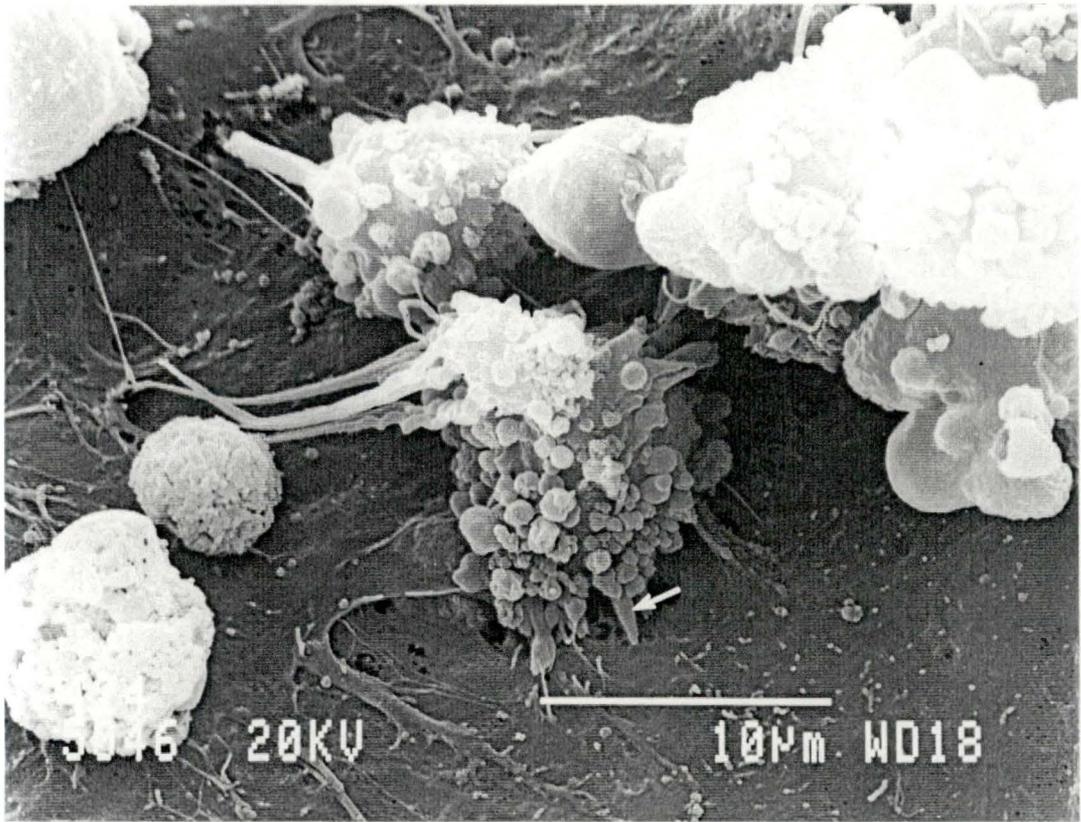


**Figure 4-18** :J774 en coculture au début de la traversée de l'endothélium.  
On peut observer le passage d'un bras du macrophage.(flèche) Le J774 passe ici entre deux  
cellules endothéliales. (G : 6250 X)

**Figure 4-16 :** Micrographies en microscopie à balayage de U937 en culture .

(G : 3800 X)

(A,B) U937 recouverts de blebs , ancrés par une série de bras (flèches) aux cellules endothéliales qui tapissent la membrane amniotique.

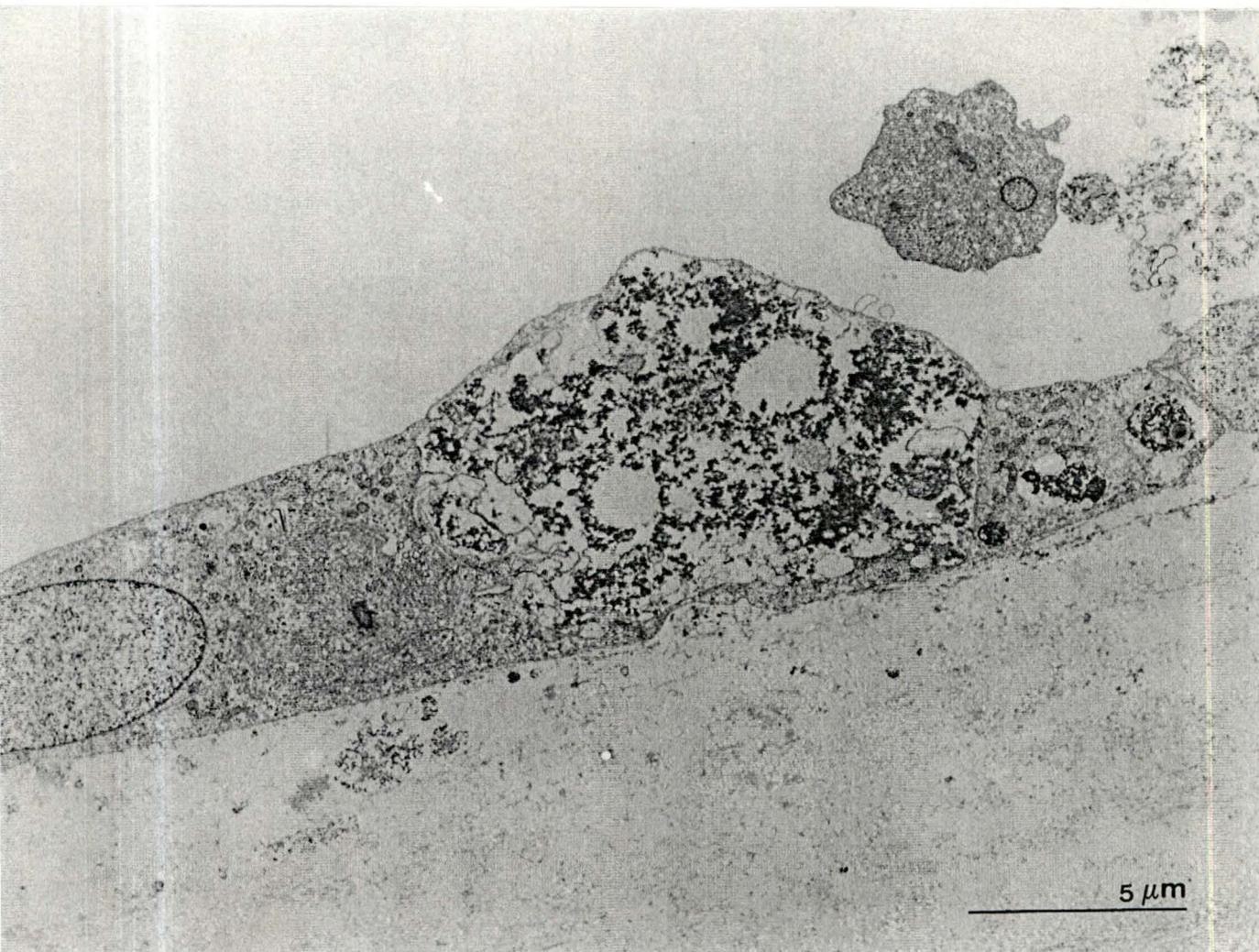


**Figure 4-17** : Coupe transversale d'une coculture de cellules endothéliales et de HL60.

-A : Promyélocyte ayant traversé l'endothélium et déversant son contenu cytosolique. (G : 6250 X)

-B : Coculture en balayage. On remarque le nombre important de cellules mortes (+) ainsi que quelques HL60 activés qui forment des bras (B)  
(G : 4750 X)





**Figure 4-21** Cellule endothéliale présentant une protubérance. Cette enflure provient probablement d'un macrophage phagocyté par la cellule endothéliale. On remarque le noyau de la cellule endothéliale.

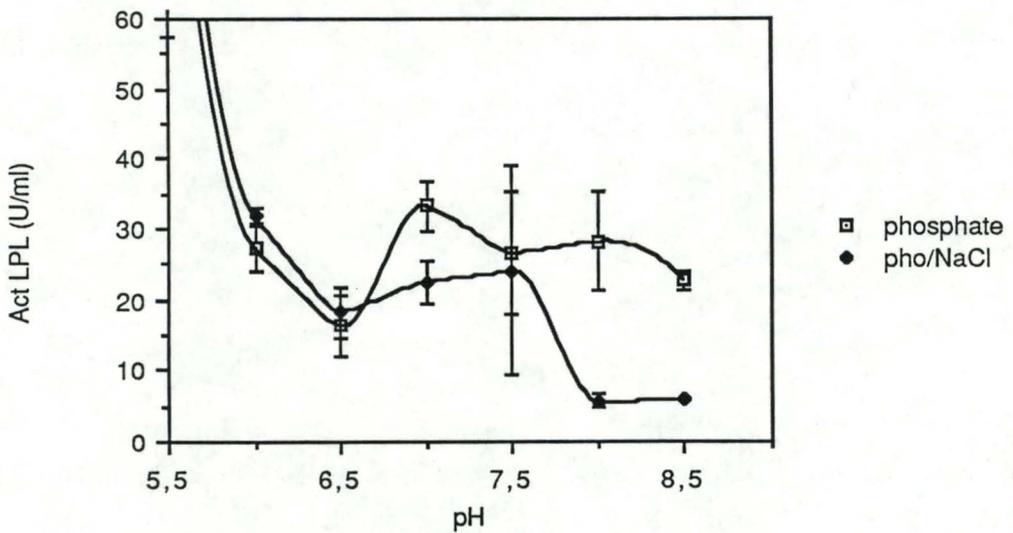
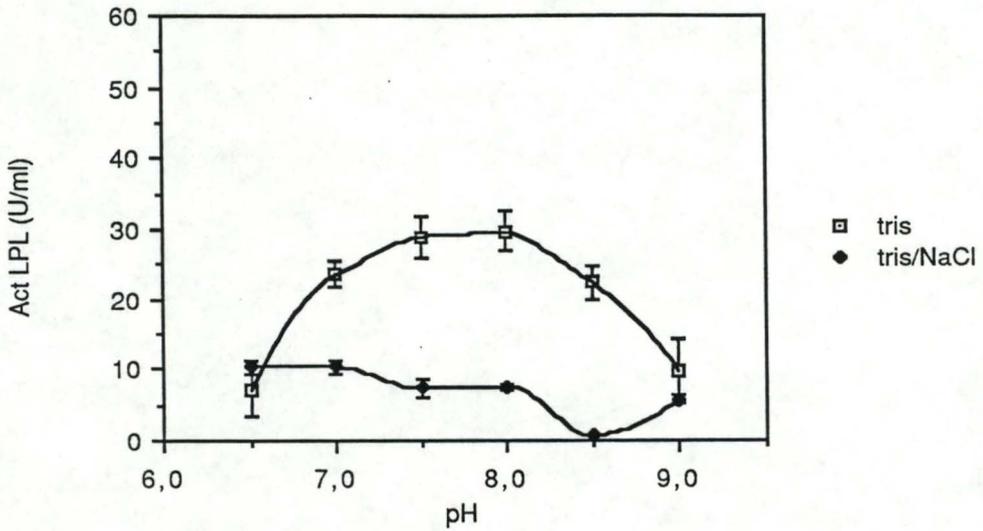
**Figure 4-24**

Activité de la LPL en fonction du pH

pH 5,5-8,5 : tampon phosphate 0,6M (concentration finale 0,08M)

pH 6,5-9,5 : tampon tris 0,6M (concentration finale 0,08M)

Inhibition au NaCl en utilisant des tampons phosphate, tris NaCl 5M (concentration finale 0,6M; concentration suffisante pour avoir une inhibition maximale de LPL), Le milieu d'incubation contient 2 mM trioleine, 6,6% sérum humain décomplémenté.



## résultats

### A. Dosage de la LPL en fonction du pH

#### 1) Résultats.

Nous avons utilisé deux tampons: Tris (0,6 M) et Phosphate (0,6M) (Concentration finale 0,08 M). Le tampon Tris a été utilisé pour les pH de 6,5 à 8,5 et le tampon Phosphate pour les pH de 6,5 à 9. Nous avons pu vérifier que l'activité lipasique était bien due à la LPL (et non à une lipase ou à une autre estérase produite par le macrophage) en utilisant le tampon Tris-NaCl ou Phosphate-NaCl 5M, c'est-à-dire une concentration finale de 0,6 M (concentration suffisante pour obtenir une inhibition maximale de la LPL) (fig. 4-24)..

On observe à pH faible (5,5-6), une activité lipasique extrêmement importante qui n'est pas inhibée par le NaCl, cette activité est probablement due à la sécrétion, par le macrophage, de lipase ou d'estérase acides. Les optima de pH ont les valeurs de 7 pour le tampon Phosphate et de 8 pour le tampon Tris. Mais l'inhibition par le NaCl est maximale pour des valeurs de pH supérieures ou égales à 8. Ultérieurement, nous avons travaillé à pH=8,6.

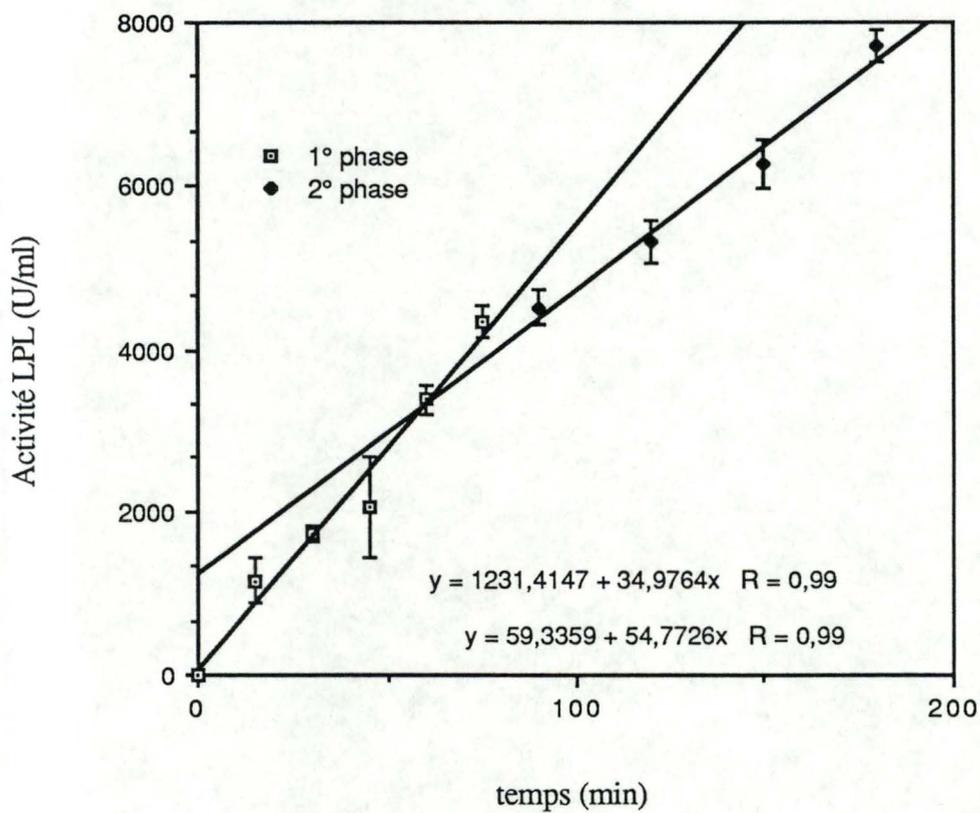
#### 2) Commentaires

Plusieurs études ont montré que l'activité de la LPL en fonction du pH présente une courbe en cloche typique (Nilsson-Ehle, 1976) dont le pic d'activation se situe entre des valeurs de pH =8 et de pH=9. Cette courbe peut s'interpréter comme une augmentation de l'activité en fonction du pH suivie par une diminution de la fixation de l'enzyme à partir de pH=8,5. Mahoney (1982) montre qu'à des valeurs faibles de pH, l'activité de l'enzyme est négligeable, donc que la lipase sécrétée n'est pas d'origine lysosomiale. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus en utilisant du tampon Tris, mais l'utilisation du tampon Phosphate nous donne une activité élevée à pH faible. Cette activité élevée à pH faible qui n'est pas inhibée par le NaCl est probablement due à l'action de lipase ou d'estérase acides sécrétées par les macrophages. On peut remarquer que les écarts-types des dosages effectués avec le phosphate sont très importants.

### B. Dosage de la LPL en fonction du temps.

( $10^6$  cellules/ml; culture de 12 heures) ; Substrat : trioléine 2mM correspondant à  $25 \cdot 10^4$  cpm.(fig. 4-25).

#### 1) Résultats.



**Figure 4-25**

Activation de la LPL en fonction du temps d'incubation

La LPL a été incubée pendant 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 minutes dans du tampon Tris, pH 8,6, 2 mM trioléine, 6,6% sérum humain décomplémenté.

## résultats

Nous avons dosé l'activité de la LPL en fonction du temps afin de déterminer la durée d'incubation qui nous donnera la plus grande activité, sans pour autant que la vitesse de réaction ne diminue à cause d'une limitation en substrat ou d'une dégradation due à des protéases produites par les macrophages. On peut remarquer que, entre 0 et 75 minutes, il y a une augmentation constante de l'activité (vitesse de réaction constante). Pour les points à 15 minutes et à 45 minutes, on observe des écarts à la linéarité mais qui sont compatibles avec la variance de ces points. Après 75 minutes, la vitesse de réaction tend à s'infléchir. Il existe donc un facteur limitant à la réaction.

### 2) Commentaires

A 37°C, Nilsson-Ehle et al (1972, 1977) ont montré que le dosage pouvait être linéaire pendant au moins 2 heures. La diminution de linéarité que nous observons après 75 minutes est probablement due à une inactivation de l'enzyme. En effet, en rajoutant du substrat, l'activité de la LPL continue à s'infléchir. Greten (1976), afin de minimiser cette source d'erreur, a travaillé à 27°C.

Lors des tests ultérieurs, nous avons incubé le mélange LPL/substrat pendant 60 min. à 37°C.

### C. Dosage de la LPL après activation des lignées myélocytaires au PMA.

#### 1) Activation des J774.

##### Introduction:

On connaît deux voies de communication intracellulaire. La voie de l'adénylate cyclase qui fait intervenir l'AMP<sub>c</sub> comme messenger secondaire et la voie des phosphatidylinositols dont certains messagers secondaires sont: les ions calcium, l'inositol triphosphate et le diacylglycérol.

Dans ce cas, le mécanisme d'activation est le suivant : sous l'action d'un messenger primaire, le phosphatidylinositol est dégradé en inositol triphosphate et en diacylglycérol. L'inositol triphosphate va favoriser la libération de Ca<sup>++</sup> au niveau du réticulum endoplasmique. Le diacylglycérol va s'associer aux Ca<sup>++</sup>, protéine kinase, phospholipide. Le PMA (Phorbol Myristic Acetate) peut, tout comme le diacylglycérol, activer la protéine kinase (Berridge, 198 )

##### Résultats

## résultats

Dosage de la LPL en fonction du temps de culture de macrophages stimulés au PMA (1 ng PMA/10<sup>6</sup> cellules) et non stimulés (densité d'ensemencement des J774 de 7x10<sup>5</sup> J774/cm<sup>2</sup> dans 0,7 ml).(fig. 4-26).

Nous avons choisi des temps de culture de 15, 30, 60 min, 2 H, 6 H et 24 H. Les macrophages étaient stimulés après 30 minutes de coculture. Pour la culture de J774 non traitée, on observe, à partir de 360 minutes, une activité lipasique différente de celle des J774 traités au PMA. Le taux de sécrétion de LPL par les macrophages augmente linéairement. Pour les J774 stimulés au PMA, la sécrétion de LPL devient observable 90 minutes après la stimulation (càd 120 minutes après la mise en culture). La courbe d'activité de la LPL révèle que l'augmentation du taux de sécrétion est maximale entre 90 et 320 minutes après stimulation.

### Commentaires

La stimulation des macrophages par la théophylline et le DbcAMP en concentration supérieure à 10<sup>-5</sup> molaire fait varier la sécrétion de LPL. La stimulation de macrophages dérivés de monocytes humains pendant 24 heures, inhibe la sécrétion de LPL (J. Gardette, 1987). Mais les expériences de Behr (1986) et Goldberg (1987) ont montré que les macrophages stimulés au thioglycollate et au copolymère de pyrane présentent une activité LPL plus importante que chez les macrophages non stimulés. Cette activation est inhibée en présence de LPS (Lipopolysaccharide bactérien). La diminution de l'expression de la LPL en présence de LPS fait intervenir des facteurs différents des TNF (Sopher O., 1987).

Mais pourquoi l'expression de la LPL se stabilise-t-elle après 24 heures de stimulation au PMA ?

Il se peut que la stimulation des J774 au PMA ait induit l'expression d'un facteur secondaire qui inhibe ou qui module la sécrétion de la LPL. Il faut également remarquer que les macrophages cultivés à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml pendant plus de 48 heures sans changement du milieu ne présentent plus d'activité LPL significative. Les macrophages sécrètent peut-être un facteur inhibant l'expression de la LPL. Ce facteur est différent du TNF puisque les J774 ne sécrètent pas de TNF. De plus, l'addition de TNF au milieu ne modifie pas (pour le J774) l'expression de la LPL (Friedman., 1988).

Cette diminution de la sécrétion de LPL a été constatée par Goldman (1989). Le traitement pendant 4 heures avec du milieu frais restore la sécrétion initiale par les macrophages. Pour Goldman, la diminution d'expression de la LPL ne serait pas due à une inhibition de l'activité de l'enzyme. En fait, le changement de milieu aurait un effet mitogène (l'incorporation de H3 thymidine est doublée après changement du milieu) et l'augmentation de sécrétion de LPL serait une des conséquences de cet effet.

**Figure 4-28:** Coculture de J774 et de cellules endothéliales. A: coculture avant rinçage; B: coculture après rinçage au milieu de culture; C: coculture après rinçage avec une solution ac. acétique 0,6%, NaCl 0,1%.

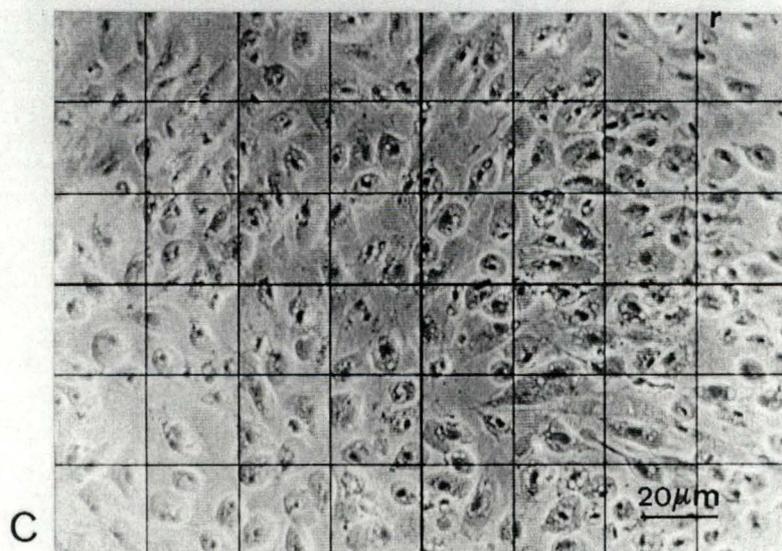
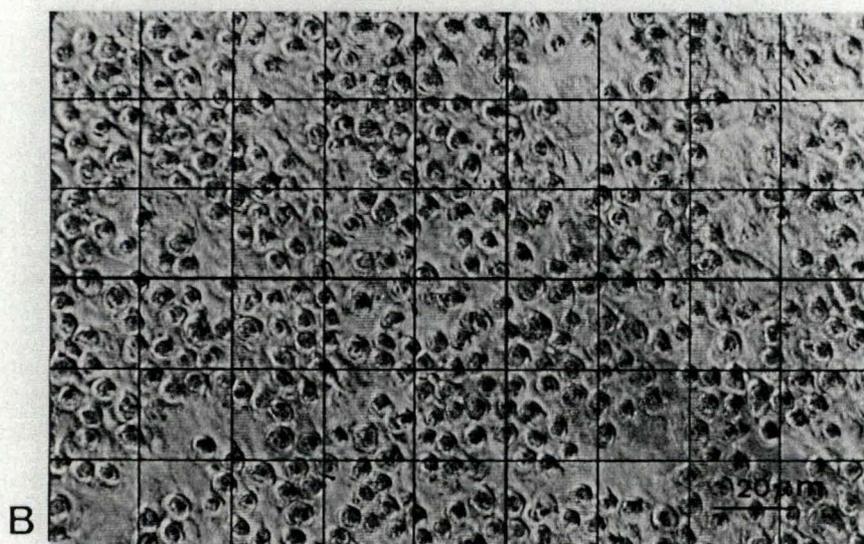
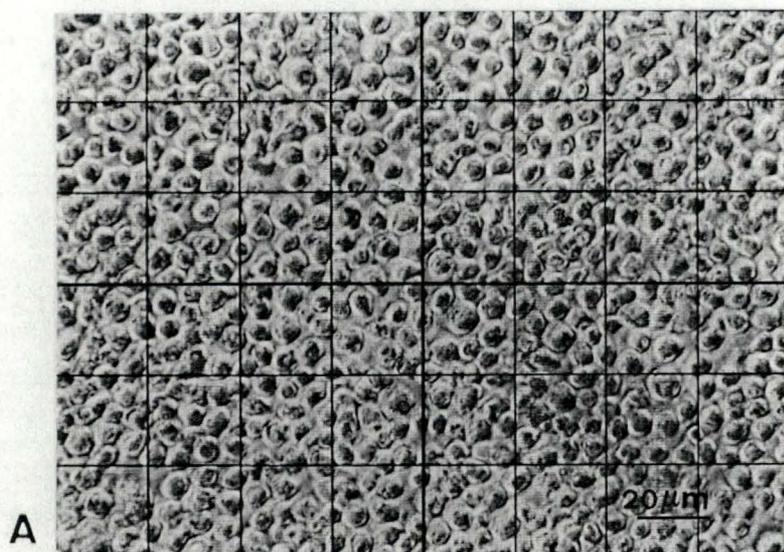
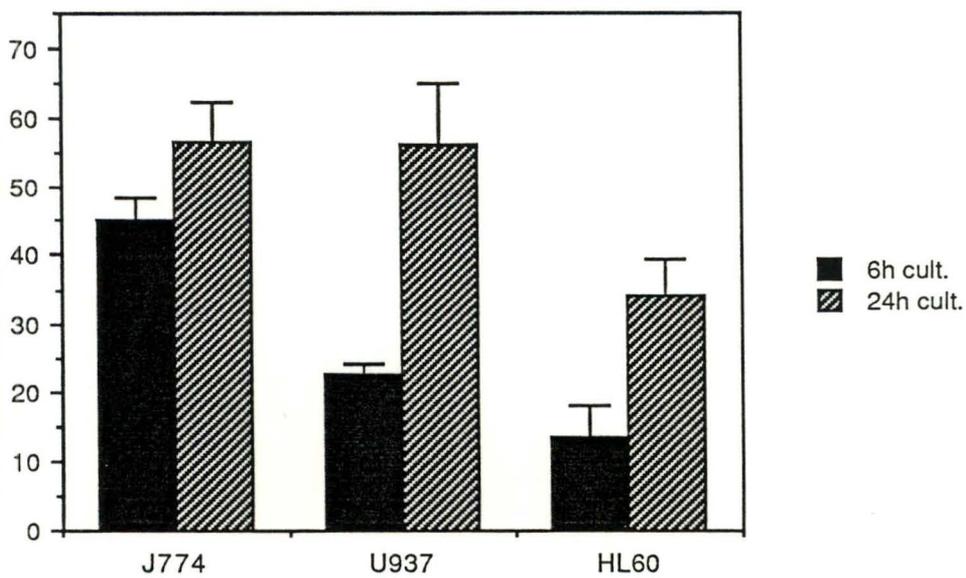


Tableau 4-1: Adhérence des lignées myélocytaires aux cellules endothéliales

duré de la coculture	J774 %	U937 %	HL60 %
6 H n = 3	45,04 ± 3,44	22,7 ± 1,33	13,23 ± 4,86
24 H n = 4	56,66 ± 5,77	56,1 ± 8,78	34,16 ± 5,32



## résultats

Wagh et Olivecrona (1978) ont purifié une glycoprotéine (la lipolipine) qui se trouve dans l'intima athéroscléreuse humaine. Cette glycoprotéine inhibe l'activité de la LPL.

Si cette diminution de l'activité provient d'une réduction de la synthèse de LPL par les macrophages, le facteur responsable n'est pas uniquement la phagocytose excessive de lipides par les macrophages. S'il s'agit d'une inhibition par une glycoprotéine, la lipolipine ou toute autre glycoprotéine ayant aussi la même particularité, celle-ci devrait être aussi présente dans le placenta.

Les cultures de macrophages sur amnios seul et sur cellules endothéliales ensemencées sur plastique ont fait varier l'activité de la LPL. Nous pouvons admettre que amnios et cellules endothéliales modifient l'expression de la LPL. Pour déterminer s'il s'agit ou non du même mécanisme dans les deux cas, il faudrait réaliser un test immunocytochimique.

Il se peut que la culture sur amnios ou les cocultures induisent la synthèse d'un facteur macrophagique qui autorégule la synthèse de LPL.

### E. Quantification de l'adhérence aux cellules endothéliales et de la diapédèse des lignées myélocytaires.

Le pourcentage de macrophages adhérant aux cellules endothéliales a été calculé à partir de cultures sur plastique.(fig. 4-28)

La migration des macrophages a été étudiée à partir de cultures sur membrane amniotique.(fig. 4-29)

#### 1) Adhérence aux cellules endothéliales

Les résultats sont repris dans le tableau 4-1.

Comme nous l'avons observé au microscope à contraste de phase, après 6 H de coculture, les J774 adhèrent plus aux cellules endothéliales que les U937 et les HL60; (respectivement 45 %, 22 %, 13 %). Après 24 H, la proportion de cellules adhérentes à l'endothélium a augmenté pour toutes les lignées. L'adhérence des J774 n'a augmenté que légèrement (10%), les U937 ont un taux d'adhérence double et atteigne le niveau des J774 ( $\pm 55\%$ ). Le taux de HL60 adhérents est multiplié par 3 (33%).

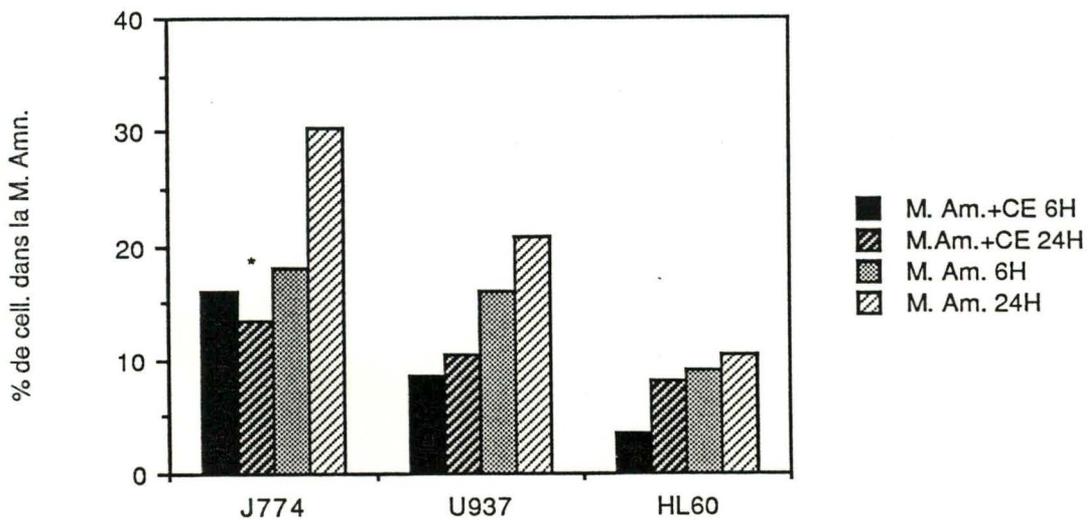
#### 2) Migration dans la membrane amniotique.

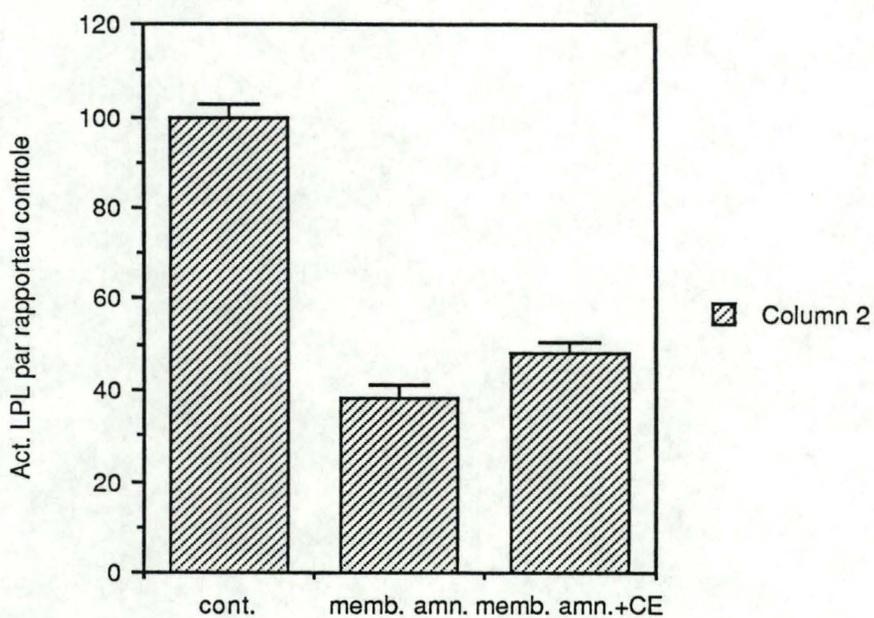
Les résultats sont repris dans le tableau 4-2.

La quantité de cellules qui ont pénétré dans l'amnios varie d'une lignée à l'autre.(tableau 4-2) Les cellules les plus invasives sont les J774, puis les U937, puis les

Tableau 4-2: Migration des lignées myélocytaires dans la membrane amniotique avec ou sans CE.

	durée de la coculture	J774 %	U937 %	HL60 %
Memb. amn. + CE	6 H	16	8,5	3,5
	24 H	13,5	10,3	8
Memb. amn.	6 H	18	16	9
	24 H	30,4	20,9	10,3





**Figure 4-27**

Activité de la LPL lors de coculture de J774 et de cellules endothéliales pendant 6 H ( $5 \times 10^5$  J774/cm<sup>2</sup> dans 0,7ml). Le dosage est réalisé à partir des surnageants de culture. (La LPL fixée à l'endothélium est égale à 7% des témoins, la LPL fixée à l'amnios est égale à 8% des témoins).

## résultats

### 2) Activation des U937

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité lipasique dans les U937 après activation au PMA. (Les U937 ne sécrètent pas de LPL de manière constitutive).

### 3) Activation des HL60

Comme pour les U937, nous n'avons pu mettre en évidence d'activité lipasique des HL60 après activation au PMA.

## D Dosage de la LPL après coculture de cellules endothéliales et de cellules de lignées myélocytaires.

### 1) Résultats.

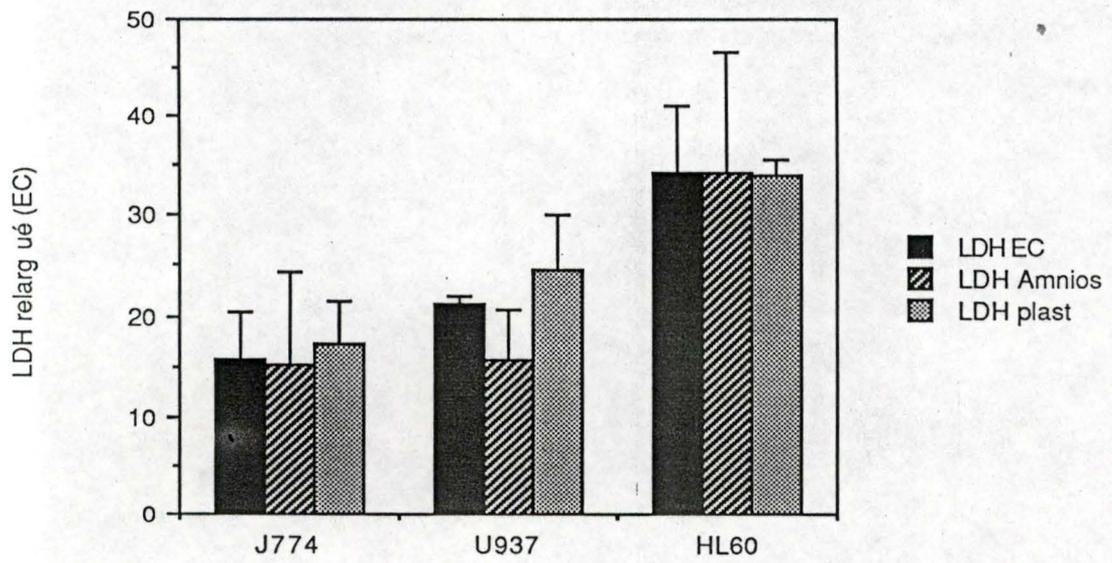
Des cultures de cellules endothéliales sur amnios et des amnios seuls ont étéensemencés avec  $7 \cdot 10^5$  J774 pendant 6 heures ( $10^6$  macrophages/ml). (fig.4.27 )

On observe, après 6 h, une diminution de 50% de l'activité lipasique pour la coculture J774/ cellules endothéliales et une diminution de 60% de cette même activité pour la culture de J774 sur amnios. Les lignées U937 et HL60 ne sécrètent pas de LPL de manière constitutive. Lors des cocultures ou des cultures de macrophages sur amnios, nous n'avons pas pu mettre en évidence une activité lipasique.

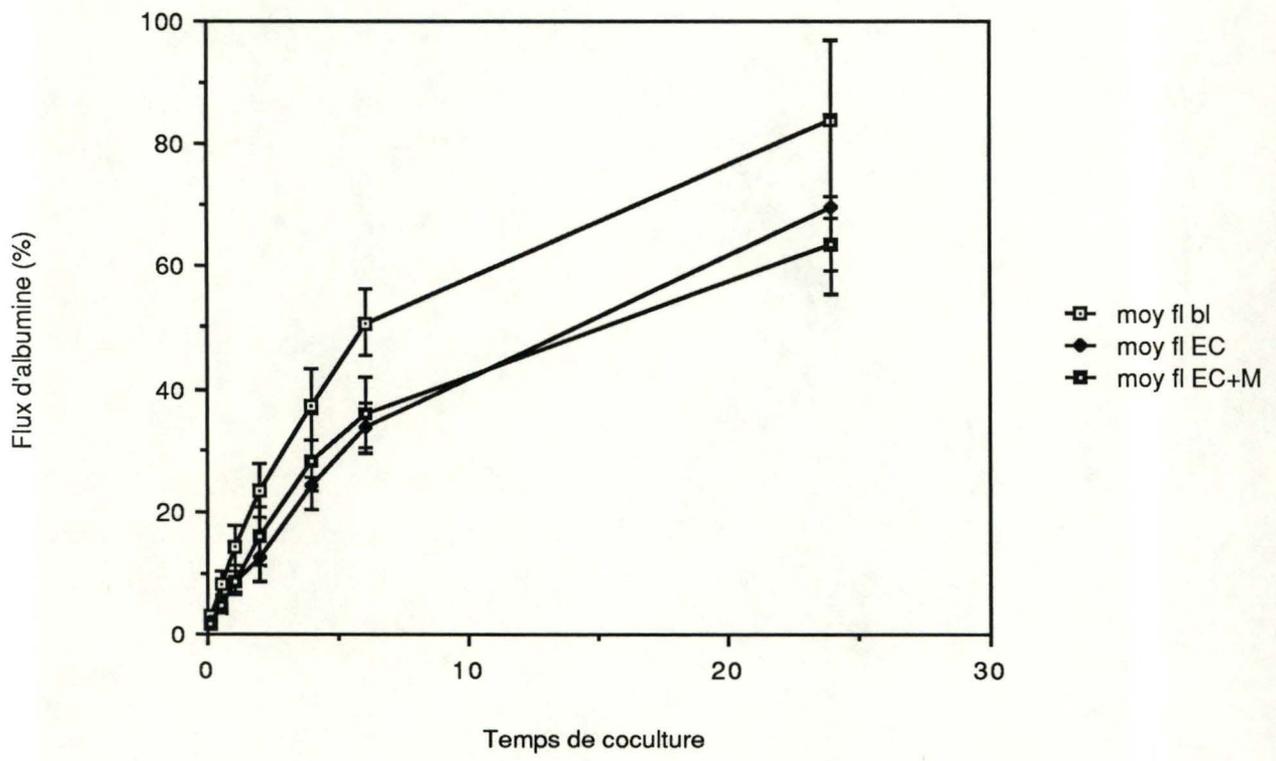
### 2) Commentaires.

Dans la coculture, la diminution de l'activité décelable de LPL peut être due à une diminution de la synthèse de LPL par les macrophages ou à l'inhibition de l'activité de le LPL.

Tonassen (1987) a montré par immunocytochimie que la LPL située dans les lésions athéroscléreuses humaines ne provenait pas des macrophages, mais sûrement des cellules musculaires lisses de la plaque fibreuse. Il en a déduit que, soit la phagocytose excessive de lipides entraîne une diminution de la capacité de synthèse protéinique des macrophages (cette diminution comprenant également la diminution de la synthèse de la LPL), soit que la sécrétion de LPL par les macrophages est un phénomène qui a lieu uniquement *in vitro* et qui n'est pas représentatif de la situation *in vivo*



**Figure 4-31:** Activité de la LDH libéré dans le milieu par les cocultures cellules endothéliales / cellules de lignées myélocytaires.



## résultats

HL60. La quantité de cellules infiltrant l'amnios augmente entre 6 et 24 h. On remarque également que les cellules envahissant l'amnios sont moins nombreuses lors de cocultures. Les cellules endothéliales tendraient à limiter le passage des globules blancs. Notons qu'à 24 H., la diacytose des J774 est inférieure à celle de 6 H. de coculture. Nous en reparlerons dans la discussion.

### F. Tests d'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales en coculture.

#### 1). Perméabilité à l'albumine.

Lors de cocultures de J774/cellules endothéliales, le flux d'albumine a été déterminé après 15 min., 30 min, 1,2,6 et 24 heures (fig. 4-30). On remarque que la différence entre les cellules endothéliales et les amnios (témoins) est déjà significative après 30 minutes. Lors des cocultures, la différence de perméabilité apparaît après 60 minutes. Cette augmentation de perméabilité peut être due, soit à l'action des macrophages qui, en traversant l'endothélium, écartent les jonctions, soit par destruction de l'endothélium par les macrophages.

#### 2) Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu.

Nous avons déterminé la libération de LDH des cocultures en comparaison avec la libération de LDH par les différentes lignéesensemencées sur amnios et sur puits plastique. Les résultats sont repris dans la figure 4-31.

#### 3) Commentaires

Nous avons réalisé une ANOVA sur les résultats de perméabilité à l'albumine avec 2 critères fixes, croisés (temps et type de culture). Cette étude nous a montré que les interactions entre les macrophages et les cellules endothéliales augmentent le flux d'albumine de manière hautement significative ( $\alpha < 1\%$ ).

Nous n'avons pu mettre en évidence d'augmentation de la libération de LDH par les cellules en coculture. Ces résultats démontrent que le passage des macrophages à travers la monocouche de cellules endothéliales n'altère pas leur intégrité.

Par contre, nous avons constaté, en microscopie à balayage, une augmentation des artéfacts lors des co-cultures par rapport aux cellules endothéliales ayant subi le même traitement. Ces artéfacts, constitués de déchirures, principalement au niveau des jonctions, nous montrent que l'adhérence des macrophages entraîne une fragilisation de ces jonctions.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

## I. COCULTURE

Le but de ce travail était la mise au point d'une coculture de cellules endothéliales et de lignées transformées d'origine myélocytaire.

Plusieurs études ont été réalisées sur cocultures afin de déterminer les relations qui existent entre les différents types de cellules impliquées dans la lésion athéroscléreuse.

Actuellement, les travaux réalisés sur cocultures de cellules endothéliales et de leucocytes tentent principalement de définir l'action de différents facteurs sur l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales et sur leur migration à travers l'endothélium. De plus, ces auteurs cherchent à préciser si cette migration entraîne des modifications morphologiques et fonctionnelles de la perméabilité de l'endothélium.

L'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales est augmentée pour les VLDL (Endeman 1987) et pour les LDL (Alderson 1986).

Bevilacqua (1985) a montré sur, coculture, l'augmentation de l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales prétraitées à l'interleukine-1.

Pawlowski (1985) a montré, sur coculture, que l'adhérence des monocytes nécessite la présence d'ions bivalents et qu'elle est inhibée à 4°C.

Bevilacqua et diCorletto ont observé, après 90 minutes, l'adhérence de  $\pm 10\%$  des U937 (soit  $\pm 7$  U937/10 cellules endothéliales). Dicorleto (1985) a remarqué sur des cellules endothéliales porcines une diminution, mais pas une inhibition, de l'adhérence des U937 à 4°C. Le nombre de cellules fixées redevient normal après 150 minutes à 4°C.

Nos résultats nous donnent des valeurs d'adhérence deux fois plus importantes que celles de Bevilacqua et diCorletto. Mais nous avons laissé les U937 pendant 6h en présence des cellules endothéliales.

Lorsque l'on travaille avec des cellules endothéliales ensemencées sur plastique, on ne peut déterminer si l'action des leucocytes sur les cellules endothéliales modifie ou non l'intégrité de l'endothélium et si celui ci joue encore son rôle de barrière sélective.

Taylor (1981) et Navab (1988) ont mis au point et utilisé des cultures de cellules endothéliales sur filtre. D'autres auteurs ont utilisé des cultures de cellules endothéliales sur membrane amniotique. (Furie 1984, 1987, Huang, 1988, Migliorisi, 1987).

Les filtres ont l'avantage d'être uniformes, stériles et prêts à l'emploi. Certains sont transparents ce qui permet une visualisation des cellules au microscope à contraste de phase.

Les cocultures sur filtres sont des modèles intéressants pour l'étude de l'adhérence des globules blancs aux cellules endothéliales ou pour étudier le rôle de perméabilité sélective de l'endothélium. Les filtres permettent de réaliser des cocultures séparées, c'est à dire qu'en utilisant des filtres à pores très fins, on peut cultiver les cellules dans des chambres séparées et déterminer ainsi l'action de substances sécrétées par un type de cellules sur l'autre type.

Les membranes amniotiques, quant à elles, nécessitent une préparation plus longue, ne sont pas toujours stériles et le développement des cellules n'est pas homogène.

## Discussion et conclusions

Mais elles ont l'avantage de laisser pénétrer les leucocytes qui traversent l'endothélium, sans décoller les cellules endothéliales. Les filtres qui possèdent des pores suffisamment larges permettent le passage des globules blancs. Mais l'observation morphologique des cocultures nous montre des cellules endothéliales décollées du support et disjointes. Les membranes amniotiques, elles, laissent les macrophages pénétrer à l'endroit où ils passent (pour les filtres, les globules blancs doivent passer par les pores) et se "referment" après leur passage.

Enfin, la membrane amniotique a l'avantage de pouvoir être utilisée pour étudier plusieurs facteurs à la fois.

Nous avons tenté de réaliser un modèle de coculture cellules endothéliales/macrophages sur membrane amniotique analogue. Afin d'obtenir des résultats reproductifs, il faut travailler dans des conditions identiques d'une expérience à l'autre c'est à dire avec des cellules endothéliales à confluence et un nombre de macrophages bien défini.

### II. CONFLUENCE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES.

La culture d'endothélium sur membrane amniotique ne permet pas, comme sur plastique, une visualisation des cellules au microscope à contraste de phase. La confluence de la culture a été mise en évidence après 8 jours, par coloration au rouge neutre et par détermination de la perméabilité à l'albumine de la membrane.

Nous avons tenté de mettre au point une méthode qui permette de mesurer la résistance électrique des cultures. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant l'appareil Millipore à courant alternatif (ce qui évite la polarisation des électrodes), à condition de placer les anneaux qui supportent les membranes amniotiques, sur des statifs. Nous avons ainsi obtenu des valeurs de résistance électrique du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature. Il existe de grandes variations d'une culture à l'autre. Les cellules endothéliales poussent plus ou moins bien d'une membrane amniotique à l'autre.

### III. MORPHOLOGIE DES LIGNÉES MYÉLOCYTAIRES

Les cellules activées au PMA et les cellules en coculture présentent les mêmes aspects. Chez les J774, le nombre des vacuoles augmente. Chez les U937, il y a apparition de nombreux blebs et de pseudopodes. Les HL60, si ce n'est une augmentation de volume, ne présentent pas de grandes différences par rapport aux cellules non activées. On a remarqué dans plusieurs cellules, des figures caractéristiques de cristaux de cholestérol. Il faudrait pour être sûr de la nature exacte de ces cristaux, faire une coloration spécifique (à la

## Discussion et conclusions

digitonine par exemple) ou observer les coupes au microscope à polarisation, le cholestérol étant une molécule biréfringente.

### IV. DIAPÉDESE DES GLOBULES BLANCS.

On peut observer également des cellules phagocytaires ayant traversé ou en train de traverser l'endothélium. Le passage de la monocouche de cellules endothéliales se fait au niveau des jonctions et probablement aussi par empéripolèse. Le passage par empéripolèse est fréquent pour les PMN et pour les lymphocytes (Hammersen et al 1988) et a également été observé par Migliorisi (1987) sur le même modèle de coculture de cellules endothéliales/monocytes en utilisant du FMLP (Phenyl Methionine Leucine Phenylalanine). Une explication éventuelle à ce phénomène serait que les leucocytes se fixent sur l'endothélium et pénètrent au site de fixation. Bowen et al (1982) ont montré que l'adhésion à l'endothélium était nécessaire pour la diapédèse des PMN neutrophiles. Le mécanisme de diapédèse n'est pas encore parfaitement connu.

Il se peut que le phénomène soit similaire pour les autres types de leucocytes. Ils synthétisent une substance qui, comme le proposent Harlan et al (1985), est très vite désactivée ou qui nécessite une concentration locale très importante. On peut imaginer une action, directe ou par l'intermédiaire d'un messenger, qui entraînerait des modifications de l'orientation des microtubules et une contraction des microfilaments (analogues à celles qui sont nécessaires à la phagocytose). Cette modification favoriserait un début d'écartement de la membrane plasmique de la cellule endothéliale. Le choix du mode de pénétration ne dépendrait que du mode de fixation du leucocyte. S'il adhère au niveau d'une jonction, les deux cellules s'écartent et le leucocyte passe par la jonction. Par contre, si le leucocyte adhère au centre de la cellule, il y a formation d'une invagination puis passage par empéripolèse.

### V. INTÉGRITÉ DE L'ENDOTHÉLIUM.

Navab (1988), en utilisant des filtres, a montré sur coculture de cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et macrophages, que l'endothélium est probablement la principale barrière sélective.

Lors du passage de leucocytes, existe-t-il des altérations dans le rôle de barrière semi-perméable de l'endothélium? Nous avons observé, avec les J774, une augmentation du flux d'albumine I125 à travers l'endothélium, après 60 minutes de coculture. Furie (1987) en travaillant avec des PMN, n'a pas observé de variation ni dans la résistance électrique après 90 minutes de coculture, ni dans le flux d'albumine (Huang 1988). Harlan (1985), en travaillant sur filtre avec des concentrations en PMN neutrophiles 3 fois plus importantes, a observé une augmentation de la perméabilité à l'albumine après 30

## Discussion et conclusions

minutes. Ce processus serait indépendant de l'action des dérivés de l'oxygène puisque la catalase et la SOD ne modifient pas cet effet. Taylor (1981) a mis au point une culture de cellules endothéliales sur filtre. Il a montré que l'utilisation de FMLP augmente le passage à travers l'endothélium. D'après Navab (1988), la migration des macrophages sans chemoattracteur ne modifie pas l'intégrité de l'endothélium après 90 minutes.

Le dosage de la LDH n'a pu mettre en évidence d'augmentation de la perméabilité des cellules en coculture après 6 H.. Ce n'est donc probablement pas une destruction des cellules qui a provoqué l'augmentation de perméabilité à l'albumine.

Plusieurs substances augmentent la perméabilité de l'endothélium. Il se peut que l'une de ces substances soit sécrétée par les J774.

## VI. DOSAGE DE LA LPL

Les J774 sécrètent la LPL (Wang-Inverson, 1982). Nous avons observé un pic d'activité maximale à pH 8-8,5, une inhibition au NaCl 0,6M et une diminution de l'activité par manque d'apo CII. La quantité de LPL, sécrétée par les J774, est fonction de l'âge des cultures et de la présence d'activateurs (PMA, 1 µg/ml/10<sup>6</sup> J774). Nous avons observé que le taux d'activation au PMA était fonction du temps d'incubation des cultures. Il serait intéressant de voir si l'augmentation d'activité de LPL est également fonction de la quantité en PMA.

Lors des cocultures, nous avons remarqué une diminution de 50% de l'activité de la LPL après 6 H. et de 60% sur membrane amniotique sans cellules endothéliales.

Nous avons rincé les anneaux avec 1 ml d'héparine (5U/ml) ce qui devait permettre de détacher la LPL fixée sur la membrane amniotique. Mais l'activité de LPL libérée n'est pas suffisante pour expliquer la diminution d'activité de l'enzyme (7% de LPL fixée sur les cellules endothéliales et 8% de LPL fixée sur la membrane amniotique).

L'activité de la LPL est liée à un équilibre entre sa dégradation et sa synthèse de novo. Il est possible que, lors des cocultures, cet équilibre soit rompu en faveur de la dégradation.

D'autre part les J774, les P388D1 et les macrophages sécrètent de l'IL-1. (Lachman et al., 1977). Or l'IL-1 inhibe la synthèse de LPL. Il est possible que la synthèse d'IL-1 soit stimulée lors des cocultures.

Mais le PMA a la propriété d'augmenter la synthèse d'IL-1 chez les macrophages et chez les P388D1. On devrait donc s'attendre, si l'on admet la sécrétion d'IL-1 par les macrophages, à avoir une diminution de la synthèse de LPL.

Nous avons utilisé une concentration de 1,6 mM de PMA c'est-à-dire la concentration pour laquelle l'activation est maximale. Comment expliquer l'augmentation de LPL dans le milieu? Se pourrait-il qu'il y ait deux voies d'activation de l'IL-1? L'une,

## Discussion et conclusions

utilisant la voie des phosphatidylinositols, favoriserait également la synthèse d'un facteur qui inhibe l'action, sur la LPL, de l'IL-1 ou d'un autre facteur.

On observe une augmentation importante de l'adhérence des U937 et des HL60 (respectivement 5 x et 33 x) après 90 min. de coculture. La sécrétion possible d'interleukine (du moins pour les U937) pourrait expliquer le taux d'adhérence des U937 (et peut être aussi celui des J774 et des HL60 ).

L'interleukine-1 a la propriété d'augmenter la perméabilité de l'endothélium (Bevilacqua, 1985) Cela pourrait expliquer l'augmentation de la perméabilité à l'albumine lors des cocultures de J774.

BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

- Alderson L.M., Endemann G., Lindsey S., Pronczuk A., Hoover R.L. & Hayes K.C. (1986).  
LDL enhances Monocyte adhesion to Endothelial Cells in vitro.  
Am. J. Pathol., 123, 334-342.
- Alikalo K., Houi T. & Vaheiri A. (1980).  
Fibronectin is produced by human macrophages.  
J. Exp. Med., 151, 602-613.
- Amanuma K., Okada J., Imanaka T., Ohkuma S., & Takano T. (1985).  
Subcellular localisation of lipase in rat liver.  
Biochem. Int., 11, 349-355.
- Arnaud J., Nobili O., & Boyer J. (1979).  
Differential properties of lipase active as membrane-bound enzymes in isolated fat cells.  
Biochim. Biophys. Acta, 572, 193-200.
- Aviram M., Bierman E.L. & Chait A. (1988).  
Modification of Low Density Lipoprotein by Lipoprotein Lipase or Hepatic Lipase induces enhanced uptake and Cholesterol accumulation in cells.  
J. Biol. Chem., 263, (30), 15416-15422.
- Aviram M., Bierman E.L. & Chait A. (1988).  
Modification of low Density lipoprotein by Lipoprotein Lipase or Hepatic Lipase Induces Enhanced uptake and Cholesterol Accumulation in Cells.  
J. Biol. Chem., 263, 15416-15422.
- Avogaro P. (1987).  
Aterogenesi : l'ipotesi lipidica.  
Rass. clin.-sci., 63, 50-62.
- Bar-Shavit R., Kahn A., Feuton J.W. & Wilner G.D. (1983).  
J. Cell. Biol., 96, 282-285.
- Bar R.S., Hoak J.C. & Peacock M.L. (1978).  
Insulin receptors in human endothelial cells: identification and characterisation.  
J. Clin. Endocrinol., 47, 699-702.
- Bartholomew J.S. & Anderson J.C. (1983).  
Distribution of proteoglycans and hyaluronic acid in tranverse sections of bovine thoracic aorta.  
Histochem. J., 15, 941-951.
- Becker S. (1984).  
Interferons as modulations of human monocyte-macrophage differentiation. I. Interferon- increases HLA-DR expression and inhibits phagocytosis of zymosan.  
J. Immunol., 132, 1249-1254.

- Benditt E.P. & Benditt J.M. (1973).  
Evidence for monoclonal origin of human atherosclerotic plaques.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1753-1756.
- Bengtsson G. & Olivecrona T. (1980).  
Interaction of lipoprotein lipase with native and modified  
heparin-like polysaccharides.  
*Biochem. J.*, 189, 625-633.
- Bevilacqua M.P., Pober J.S., Wheeler M.E., Cotran R.S. & Gimbrone  
M.A. (1985).  
Interleukin-1 activation of vascular endothelium: Effects on  
procoagulant activity and leukocyte adhesion.  
*Am. J. Pathol.*, 121, 394-403.
- Bevilacqua M.P., Pober J.S., Wheeler M.E., Cotran R.S. & Gimbrone M.A.  
(1985).  
Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to  
increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes,  
monocytes, and related leukocytes cell lines.  
*J. Clin. Invest.*, 76, 2003-2011.
- Bowen T.J., Ochs H.D., Altman L.C., Price T.H., Van Epps D.E.,  
Brautigan D.L., Rosin R.E., Perkins W.D., Babior B.M., Klebanoff  
S.J. & Weclgwood R.J. (1982).  
Severe recurrent bacterial infections associated with defective  
adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils  
deficient in a cell-associated glycoprotein.  
*J. Pediatr.*, 101, 932-940.
- Brinton E.A., Kenagy R.D., Oram J.F. & Bierman E.L. (1985).  
Regulation of high density lipoprotein binding activity of aortic  
endothelial cells by treatment with acetylated low density  
lipoprotein.  
*Arteriosclerosis*, 5, 329-335.
- Brown M.S., Basu S.K., Falck J.R., HO Y.K. & Goldstein J.L. (1980).  
The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation:  
specificity of the binding site that mediates the uptake of  
negatively-charged LDL by macrophages.  
*J. Supramol. Struct.*, 13, 67-81.
- Brown M.S., Goldstein J.L., Krieger M., Ho Y.K. & Anderson R.G.  
(1979).  
Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages  
incubated with acetylated lipoproteins .  
*J. Cell Biol.*, 82, 597-613.
- Bulychev A., Trouet A. & Tulkens P. (1978).  
Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured  
fibroblast.  
*Exptl. Cell Res.*, 115, 343-355.
- Cabaud P.G. & Wroblewski F. (1958).  
Colorimetric measurement of lactate deshydrogenase activity of  
body fluids.

- Castellot J.J., Rosenberg R.D. & Karnovsky M.J. (1984).  
Endothelium, heparin and the regulation of vascular smooth muscle cell growth.  
in *Biology of Endothelial Cells* (Jaffe, E.A., ed) Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pp118-128.
- Cathcart M.K., Morel D.W. & Chisolm G.M. (1985).  
Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoproteins making it cytotoxic.  
*J. Leuk. Biol.*, 38, 341-350.
- Chajek-Shaul T., Friedman G., Ziv E., Bar-On H. & Bengtsson-Olivercrona G. (1988).  
Fate of lipoprotein lipase taken up by the rat liver, Evidence for a conformational change with loss of catalytic activity.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 963, 183-191.
- Chajek-Shaul T., Ziv E., Friedman G., Etienne J. & Adler J. (1988).  
Regulation of lipoprotein lipase in the Sand rat. Effect of Nutritional State and cAMP Modulation.  
*Metabolism*, 37, 1152-1158.
- Chung E., Rhodes R. & Miller E.J. (1976).  
Isolation of three collagenous components of probably basement membrane origin from several tissues.  
*Biochem. Biophys. Res.*, 71, 1167-1174.
- Cisar L.A., Hoogewerf A.J., Cupp M., Rapport C.A. & Bensadoun A. (1989).  
Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 264, 3, 1767-1774.
- Cryer A. (1983).  
Scale and diversity of interactions at the vascular endothelium.  
in *Biochemical interactions at the endothelium* (Cryer A., ed) , pp 1-3.
- Davies D.E. & Lloyd J.B. (1987).  
Pinocytosis in human monocytes during maturation into macrophages in vitro.  
*Biochem. Soc. Trans.*, 15, 1132-1133.
- Devel T.F., Senior R.M., Huang J.S. & Griffin E.L. (1982).  
Chemotaxis of Monocytes and Neutrophils to Platelet-derived Growth Factor.  
*J. Clin. Invest.*, 69, 1046-1049.
- Dexter, T.M. (1983).  
The regulation of haematopoietic stem cells, progenitor cells and macrophage development.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 597-603.
- Dougherty G.J. & Mc Bride W.H. (1984).  
*J. Clin. Lab. Immunol.*, 14, 1-12.

- Dousset N., Negre A., Salvayre R., Rogalle P., Dang Q.Q. & Douste-Blazy L. (1988).  
Use of a fluorescent radiolabeled triacylglycerol as a substrate for lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase.  
*Lipids*, 23, 605-608.
- Edelson P.J., Zwiebel R. & Cohn Z.A. (1975).  
The pinocytotic rate of activated macrophages.  
*J. Exp. Med.*, 142, 1150-1164.
- Edwards D.I. (1980).  
in *Antimicrobial Drug Action*, Me Millan Press London, , pp 142.
- El-Maghrabi M.R., Waite W., Rudel L., & King V.L. (1979).  
Metabolism of lipoprotein acylglycerols by liver parenchymal cells.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 572, 52-63.
- Endemann G., Pronczuk A., Friedman G., Lindsey S., Alderson L., Hayes K.C. (1987).  
Monocyte adherence to Endothelial Cells in Vitro is increased by  $\beta$ -VLDL.  
*Am. J. Pathol.*, 126, 1-5.
- Engelberg H. (1989).  
*Endothelium in Health and Disease*.  
*Sem. in Thromb. and Haemost.*, 15, 178-183.
- Esfahany M., Scerbo L., Lund-Katz S. De Pace D.M., Manigha R., Alexander J.K. & Phillips M.C. (1986).  
Effects of cholesterol and lipoproteins on endocytosis by a monocyte-like cell line.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 889, 287-300.
- Etienne J., Noé L., Rossignol M., Arnaud C., Vydellingum N., & Kissebah A. H. (1985).  
Antibody against rat adipose tissue lipoprotein lipase.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 834, 95-102.
- Etienne J., Noé L., Millot F., Laruelle P. & Debray J. . (1987).  
Antibody against human lipoprotein lipase.  
*Atherosclerosis*, 64, 201-209.
- Evensen S.A., Galdal K.S. & Nilsen E. (1983).  
LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by antioxidant treatment in cultured human endothelial cells and fibroblasts.  
*Atherosclerosis*, 49, 23-30.
- Faggioto A. & Ross R. (1984).  
Studies of hypercholesterolemia in the non primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque.  
*Arteriosclerosis*, 4, 341-356.
- Faggiotto A., Ross R. & Harker L. (1984).  
Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation.

Arteriosclerosis, 4, 323-340.

- Falcone D.J., Mated N., Shio H., Minick R. & Fowler S. (1984).  
Lipoprotein-Heparin-Fibronectin-Denaturated collagen complexes  
enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages .  
J. Cell Biol., 99, 1266-1274.
- Farr A.G, Cho Y & De Bruyn P.P. (1980).  
The structure of the Sinus Wall of the Lymph Node relative to its  
Endocytic properties and Transmural Cell Passage.  
Am. J. Anat., 157, 265-284.
- Fielding C.J. & Havel R.J. (1977).  
Lipoprotein lipase.  
Arch. Path. Lab. Med., 101, 225-229.
- Finbloom D.S. (1985).  
Binding, Endocytosis and Degradation of Model Immune Complexes  
by Murine Macrophages at Various evels of Activation.  
Clin. Immunol. Immunopathol., 36, 275-288.
- Fogelman A.M., Shechter I., Seager J., Hokom M., Child J.S. & Edwards  
P.A. (1980).  
Malondialdehyde alteration of low-density lipoproteins leads to  
cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages.  
Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 2214-2218.
- Fong L.G., Parthasarathy S., Witztum J.L. & Steinberg D. (1987).  
Non enzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B  
100.  
J. Lipid Res., 28, 1466-1477.
- Fowler S., Berberian P.A., Shio H., Goldfisher S. & Wolinsky H. (1980).  
Characterization of cell populations isolated from aortas of  
Rhesus monkeys with experimental atherosclerosis.  
Circ. Res., , 520-530.
- Fowler S., Shio H. & Haley N.J. (1979).  
Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed  
rabbits 2) Investigation of macrophage-like properties of aortic  
cells populations .  
Lab. Invest., 41, 372-378.
- Fox , P.L. & DiCorleto, P.E. (1984).  
Regulation of production of platelet-derived growth factor-like  
protein by cultured bovine aortic endothelial cells.  
J. Cell. Physiol., 121, 298-308.
- Freshney R.I. (1983).  
Culture of Animal Cells. A manuel of basic technique.  
Alan R. Liss, New York.
- Friedman G., Chajek-Shaul T., Gallily R., Stein O., Shiloni E.,  
Etienne J. & Stein Y. (1988).  
Modulation of LPL activity in mouse peritoneal macrophages by  
recombinant human tumor necrosis factor.  
Biochim. Biophys. Acta , 963, 201-207.

Friedman G., Chajek-Shaul T., Etienne J., Stein O., & Stein Y. (1988).

Tunicamycin-treated rat heart cell cultures synthesize an inactive nonreleasable lipoprotein lipase. 455-457.

Futuro D.K. & Miller E.J. (1980).

Isolation of a unique collagenous fraction from limited pepsin digests of human placental tissue: characterization of one of the constituent polypeptide chains.

J. Biol. Chem., 255, 290-295.

Gallin J.J. & Kaplan A.P. (1974).

J. Immunol., 113, 1928-1934.

Gardais A., Picard J. & Hermelin B. (1973).

Glycosaminoglycans (GAG) distribution in aortic wall from five species.

Comp. Biochem. Physiol., 44B, 507-515.

Gerrity R.G., Goss J.A. & Soby L. (1985).

Arteriosclerosis, 5, 55-66.

Gerrity R.G. (1981).

The role of the monocyte in atherosclerosis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions.

Am. J. Pathol., 103, 181-190.

Gerrity, R.G. (1981).

The role of the monocyte in atherosclerosis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions.

Am. J. Pathol., 103, 181-190.

Goldberg D.I. & Khoo J.C. (1987).

Regulation of lipoprotein lipase secretion by mouse peritoneal macrophages.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, 1-6.

Goldberg I.J., Handley D.A., Vanni T., Paterniti J.R. Jr. &

Cornicelli J.A. (1988).

Membrane-bound lipoprotein lipase on human monocyte-derived macrophages: localisation by immunocolloidal gold technique.

Biochim. Biophys. Acta, 959, 220-228.

Goldman R. & Sopher O. (1989).

Control of lipoprotein secretion in mouse macrophages.

Biochim. Biophys. Acta, 1001, 120-126.

Goldstein J.L. & Brown M.S. (1977).

The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis.

Ann.Rev. Biochem., 46, 897-930.

Goldstein M.N. & Mc Cormick T. (1957).

Cytochemical Studies during the differentiation of normal human monocytes in vivo.

Am. J. Pathol., 33, 737-745.

Goldstein J.L., Ho Y.K., Brown M.S., Innerarity Th.L. & Whaley R.W. (1980).

Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic sarrine  $\beta$ -very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 255, 1839-1848.

Goldstein M.N. (1954).

Formation of giant Cells from monocytes cultured on cellophane. *Anat. Rec.*, 118, 577-591.

Greten H., De Grella R., Klose G., Rascher W., de Gennes J.L. & Jone E.E. (1976).

Mesurement of two plasma tryglyceride by an immunochemical method: studies in patients with hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.*; 17, 203-210.

Griffith T.M., Edwards D.H., Lewis M.S., Newby A.C. & Henderson A.H. (1984).

The nature of endothelium-derived vascular relaxation factor. *Nature*, 308, 645-647.

Haberland M.E., Fogelman A.M. & Edwards P.A. (1982).

Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 1712-1716.

Hammersen F. & Hammersen E. (1987).

The ultrastructure of endothelial gap formation and leukocyte emigration. *Prog. Appl. Microcirc.*, 12, 1-34.

Hammersen B.F., Unterberg A. & Hammersen E. (1988).

The ultrastructural basis of interacts between leukocytes and endothelium. in *Vascular Endothelium in Health and disease*. Sho Chien ed., Plenum Pub. Corp., .

Harlan J.M., Schwartz B.R., Reidy M.A., Schwartz S.M, Ochs H.D. & Harber L.A. (1985).

Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by oxygen radical-independent mechanism. *Lab. Invest.*, 52, 141-150.

Hartung H.P., Kladetzky R.G. & Hennerici M. (1985).

Chemically modified low density lipoproteins as inducers of enzyme release from macrophages. *FEBS Lett.*, 186, 211-214.

Hartung H.P., Kladetzky R.G., Melnik B. & Hennerici M. (1986).

Stimulation of the Scavenger Receptor on Monocytes-Macrophages evokes Release of Arachidonic Acid metabolites and reduced Oxygen species. *Lab. Invest.*, 55, 209-216.

Hassell J.R., Robey P.G., Barrach H.J., Wilczek J., Rennard S.I. &

- Martin G.R. (1980).  
Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4494-4498.
- Hattori T., Pack M., Bougnoux P., Chang Z.L. & Hoffman T. (1983).  
Interferon-induced Differentiation of U937 Cells.  
J. Clin. Invest., 72, 237-244.
- Heinecke J.W., Baker L., Rosen H. & Chait A. (1986).  
Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells.  
J. Clin. Invest., 77, 757-761.
- Henriksen T., Mahoney E.M. & Steinberg D. (1981).  
Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6499-6503.
- Henriksen, T., Evensen, S.A. & Carlander, B. (1979).  
Injury to endothelial cells in culture induced by low density lipoproteins.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 39, 361-368.
- Henriksen, T., Mahoney, E.M. & Steinberg, D. . (1983).  
Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein.  
Arteriosclerosis, 3, 149-159.
- Hessler, J.R., Morel, D.W., Lewis, L.J. & Chisolm, G.M. (1983).  
Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity.  
Arteriosclerosis, 3, 215-222.
- Hessler J.R., Robertson A.L. & Chisolm G.M. . (1979).  
LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells in culture.  
Atherosclerosis, 32, 213-229.
- Hollenberg C.H. (1960).  
J. Clin. Invest., 39, 1282-1287.
- Houi T., Mosher D. & Vaheri A. (1977).  
Cultured human monocytes synthesize and secrete macroglobulin .  
J. Exp. Med., 145, 1580-1589.
- Huang A.J., Furie M.A., Nicholson S.C., Fischbarg J. Liebovitch L.S. & Silversein S.C. (1988).  
Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayer on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules.  
J. Cell. Physiol., 135, 335-366.
- Hunninghake G.W., Davidson J.M., Rennard S., Szapiel S., Sadek J.K. &

Crystal R.G. (1981).  
Science, 212, 925-927.

Hurley J.V. (1984).  
Inflammation.  
in Staeb, Taylor, Edema ed., Raven Press, New York, , 463-488.

Hynes R.O. & Yamada K.M. (1982).  
Fibronectin : multifunctional modular glycoproteins.  
J. Cell Biol., 95, 369-377.

Jaffe E.A. (1985).  
Physiologic functions of normal endothelial cells.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 454, 279-291.

Jaffe E.A. (1984).  
Synthesis of factor VIII by endothelial cells.  
in Biology of endothelial cells (Jaffe ed.), Martinus nijhoff  
Pub., Boston, , 209-214.

Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G. & Minick C.R. (1973).  
Culture of human endothelial cells devied from umbilical veins.  
Identification by morphologic and immunologic criteria.  
J. Clin. Invest., 52, 2745-2756.

Jaffe E.A., Ruggiero J.T., Leung L.L.K., Doyle M.J., Mc Keown-Longo  
P.J. & Mosher D.F. (1983).  
Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and  
incorporate it into extracellular matrix.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 998-1002.

Johnson W.D., Mei B. & Cohn Z.A. (1977).  
The separation, long term cultivation and maturation of the  
human monocyte.  
J. Exp. Med., 146, 1613-1626.

Jonasson L., Bondjers G. & Hansson G.K. (1987).  
Lipoprotein lipase in atherosclerosis: its presence in smooth  
muscle cells and absence from macrophages.  
J. Lipid Res., 28, 437-445.

Kadar A. (1988).  
Ultrastructural aspect of cell-matrix interaction in the arterial  
wall during aging and atherogenesis.  
in Biology of the arterial wall- Siena, .

Khoo J.C., Mahoney E.M. & Witztum J.L. (1981).  
Secretion of Lipoprotein Lipase by Macrophages in Culture.  
J. Biol. Chem., 256, 7105-7108.

Klynstra F.B., Böttcher C.J.F., van Melsen J.A. & van der Laan E.J.  
(1967).  
Distribution and composition of acid mucopolysaccharides in  
normal and atherosclerotic human aortas.  
J. Atherosclerosis. Res., 7, 301-309.

- Knight B.L., & Soutar A.K. (1982).  
Changes in the metabolism of modified and unmodified low density lipoproteins during the maturation of cultured blood monocyte macrophages from normal and homozygous familial hypercholesterolemic subjects.  
*Eur. J. Biochem.*, 125, 407-413.
- Koren H.S., Fischer D.G., Pike M.C., Snyderman R., Titus J.H. & Segal D.M.  
U937 cell line: a new model for studies of human monocytes.  
407-413.
- Kreipe H., Radzun H.J. & Parwaresch R. (1986).  
Phenotypic differentiation patterns of the human monocyte/macrophage system.  
*Hist. J.*, 18, 441-450.
- Kuwajima M., Foster D.W. & Mc Garry J.D. (1988).  
Regulation of lipoprotein lipase in Different Rat Tissues.  
*Metabolism*, 37, 597-601.
- Labat-Robert J, Szendroi M, Godeau G, & Robert L. (1985).  
Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta.  
*Pathol. Biol.*, 33, 261-265.
- Legrand Y. (1987).  
La paroi vasculaire: sa structure et ses fonctions.  
in *Le sang et les vaisseaux* (Caen ed.), Hermann, Paris, , 3-30.
- Lehninger A.L. (1970).  
Biochimie: Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires.  
Flammarion Medecine-Science.
- Levin R.I., Weksler B.B., Marcus A.J. & Jaffe E.A. (1984).  
Prostacyclin production by endothelial cells.  
in *Biology of endothelial cells.* (Jaffe ed.), Martinus Nijhoff Pub., Boston, , 228-237.
- Lewis R.E. & Granger H.J. (1986).  
Neutrophil-dependent mediation of microvascular permeability.  
*Fed. Proc.*, 45, 109-113.
- Li S., Oka K., Galton D. & Stocks J. (1988).  
Bst-1 RFLP at the human lipoprotein lipase gene locus.  
*Nucl Acid Res*, 16, 11856-.
- Linder E., Vaheri A., Ruoslahti E. & Wartiovaara J. (1975).  
Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo.  
*J. Exp. Med.*, 142, 41-49.
- Lindha U. & Höök M. (1978).  
Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 47, 385-417.

- Lipid Research Clinics Program. (1984).  
The lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial  
Results. II. The relationship of reduction in incidence of  
coronary heart disease to cholesterol lowering.  
JAMA, 251, 365-374.
- Luger T.A., Charon J.A., Colot M., Micksche M. & Oppenheim J.J.  
(1983).  
Chemotactic properties of partially purified human epidermal  
cell-derived thymocyte-activating factor for polymorphonuclear  
and mononuclear cells.  
J. Immunol., 131, 816-820.
- Lwebuga-Mukasa J.S., Thulin G., Madri J.A., Barrett C., Warshaw J.B.  
(1984).  
An Acellular Human Amnionic Membrane Model for In Vitro Culture  
of Type II Pneumocytes: The Role of the Basement Membrane in  
Cell Morphogy and Function .  
J. Cell. Physiol., , 215-225.
- Madri J.A, Dreyer B, Pitlick F & , Furthwayr H. (1980).  
The collagenes component of the endothélium. Correlation of  
structure and function.  
Lab. Invest., 43, 303-315.
- Mahoney E.M., Khoo J.C. & Steinberg D. (1982).  
Lipoprotein lipase secretion by human monocytes and rabbit  
alveolar macrophages in culture.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1639-1642.
- Malhey R.N., Innerarity Th.L., Weisgraber K.H. & Oh S.Y. (1979).  
Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins  
after selective chemical modification of lysine residues of the  
apoproteins .  
J. Clin. Invest., 64, 743-750.
- Margelin D., Pigier A.M., Gardette J., Bertrand J., Vu-Dac N. & Picard  
J. (1989).  
Evidence for an interaction of lipoprotein lipase with artery  
wall proteoglycans.  
Int. J. Biochem. , 21, 761-768.
- Masuno H., & Okuda H. . (1986).  
Hepatic tiracylglycerol lipase in circulating blood of normal and  
tumor-bearing mice and its hydrolysis of very-low-density  
lipoprotein and synthetic acylglycerols.  
Biochim. Biophys. Acta, 879, 339-344.
- Mc Cullagh K, Duance VC, & , Bishop K. (1980).  
The Distribution of collagen types I, III, and V (AB) in normal  
and atherosclerotic human aorta.  
J. Pathol., 130, 45-54.
- Mersel M., Heller M., & Pinson A. (1979).

Intracellular lipase activities in heart and skeletal muscle Homogenates. The absence of trierucin cleavage by the heart : a possible biochemical basis for erucic acid lipidosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 572, 218-224.

Migliorisi G., Folkes E., Pawlowski N. & Cramer E.B. (1987).  
In Vitro studies of human monocyte migration across endothelium in reponse to leukotriène B4 and F Met-Leu- Phe.  
*Am. J. Pathol.*, 127, 157-167.

Morel D.W., Hessler J.R. & Chisolm G.M. (1983).  
Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid.  
*J. Lipid Res.*, 24, 1070-1076.

Moscattelli D., Gross J.L., Jaffe E.A. & Rifkin D.B. (1984).  
Synthesis of collagenase and plasminogen activator by endothelial cells. in *Biology of endothelial cells* (Jaffe ed), Martinus Nijhoff Pub., Boston, pp 429-437.

Muller N., Noé L., Etienne J., /Debray J. (1987).  
A lipase activity induced by vitamin D3 in HL60 cell line.  
*Med. Sci. Res.*, 15, 925-926.

Munro J.M. & Cotran R.S. (1988).  
The Pathogenesis of Atherosclerosis: atherogenesis and inflammation.  
*Lab. Invest.*, 58, 249-261.

Murata K., Harada T. & Okubo K. (1968).  
Enzymatic studies of chondroitin sulfates in human arterial tissue.  
*J. Atherosclerosis Res.*, 8, 951-958.

Nakao J., Ooyama T., Chang W.C., Murota S. & Orimo H. (1982).  
Platelets stimulate aortic smooth muscle cell migration in vitro.  
*Atherosclerosis*, 43, 143.

Navab M., Hough G.P., Stevenson L.W., Drinkwater D.C, Laks H. & Fogelman A.M. (1981).  
Monocyte migration into the subendothelial space culture of adult human aortic endothelial and smooth muscle cells.  
*J. Clin. Invest.*, 67, 584-587.

Nilsson-Ehle P. & Ekman. (1977).  
*Artery*, 3, 194-209.

Nilsson-Ehle, P. & Schotz, M.C. (1976).  
A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase.  
*J. Lipid Res.*, 17, 536-541.

Nilsson-Ehle P., Tornqvist H. & Belfrage P. (1972).  
Rapid Determination of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue.  
*Clin. Chim. Acta*, 42, 383-390.

- Norris D.A., Clarck R.A., Swigart L.M., Huff J.C., Weston W.L. & Howell S.E. (1982).  
J. Immunol., 129, 1612-1618.
- North R.J. (1978).  
The concept of the Activated Macrophage.  
J. Immunol., 121, 806-809.
- Osterud B., Lindhal U. & Seljelid R. (1981).  
Macrophage produces blood coagulation factors.  
FEBS Letters, 127, 154-156.
- Parkes J.G., Chan P. & Goldberg D.M. (1986).  
Secretion of triglycerid lipase from rat hepatocytes in culture:  
modulation by insulin and phenobarbital.  
Biochem. Cell Biol., 64, 1147-1152.
- Parthasarathy S., Printz D.J., Boyd D., Joy L. & Steinberg D. .  
(1986).  
Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a  
modified form recognized by the scavenger receptor.  
Arteriosclerosis, 6, 505.
- Parthasarathy, S., Steinbrecher, U.P., Barnett, J., Witztum, J.L. &  
Steinberg, D. (1985).  
Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial  
cell-induced modification of low density lipoprotein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3000-3004.
- Pawlowski N.A, Abraham E.L, Pontier S , Scott W, & , L.A. Cohn. .  
(1985).  
Human monocyte-endothelial cell interaction in vitro.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 8208-8212.
- Pawlowski A., Abraham E.L., Pontier S. & Scott W.A. (1985).  
Human monocyte-endothelial cell interaction in vivo.  
Med. Sci., 82, 8208-8212.
- Perterkofsky, B. (1982).  
Methods in Enzymology, 82, 453-471.
- Pescador R., Porta R., Niada R., Diamantini G., Fedeli G. & Mantovani M.  
(1987).  
The anticoagulant, hepatic lipase-releasing and lipoprotein  
lipase-releasing activities of several natural and chemically  
modified heparins differ.  
Biochem. Pharmacol., 36, 253-257.
- Peters T.J. & de Duve C. (1974).  
Lysosomes of the arterial wall. II. Subcellular fractionation of  
aortic cells from rabbits with experimental atheroma.  
Exp. Mol. Pathol., 20, 228-256.
- Pratt C.A. (1988).  
Effect of dietary lactose on muscle lipids and LPL activity.  
Nutritional Reports International, 38.

- Pytela R., Pierschbacher M.D. & Ruoslahti E. (1985).  
Identification and Isolation of a 140 Kd Cell Surface  
Glycoprotein with properties expected of a Fibronectin Receptor.  
*Cell*, 40, 191-198.
- Quinn M.T., Parthasarathy S. & Steinberg D. (1985).  
Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse  
peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low  
density lipoprotein.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5949-5956.
- Quinn M.T., Parthasarathy S., Fong L.G. & Steinberg G. (1987).  
Oxidatively modified low density lipoprotein: a potential role in  
recruitment and retention of monocyte/macrophages during  
atherogenesis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2995-2998.
- Riley S.E. & Robinson D.S. (1974).  
Studies on the assay of clearing factor lipase (lipoprotein  
lipase).  
*Biochim. Biophys. Acta*, 369, 371-386.
- Robert L. (1987).  
Système de Vieillesse et Athérogenèse.  
in "Le Sang et les Vaisseaux". Hermann ed. Paris, , pp 191-211.
- Rogalski A.A. & Singer S.J. (1985).  
An integral glycoprotein associated with the membrane attachments sites of  
actin microfilaments.  
*J. Cell. Biol.*, 101, 785-801.
- Rogers K.A., Hoover R.L., Castellot J.J., Robinson J.M. & Karnovsky  
M.J. (1986).  
Dietary cholesterol-induced changes in macrophage  
characteristics: relationship to atherosclerosis.  
*Am. J. Pathol.*, 125, 284-291.
- Rosenfeld M.E., Tonkada T., Gown A.M. & Ross R. (1987).  
*Arteriosclerosis*, 7, 9-23.
- Ross R. (1986).  
The pathogenesis of atherosclerosis -An update.  
*N. Engl. J. Med.*, 314, 488-500.
- Ross R. & Glomset J.A. (1976).  
The pathogenesis of atherosclerosis.  
*N. Engl. J. Med.*, 295, 369-377 & 420-425.
- Ruoslahti E., Pekkala A. & ENgvall E. (1979).  
Effect of dextran sulphate on fibronectin-collagen interaction.  
*FEBS Lett.*, 107, 51-54.

- H.A. (1986).  
Relationship of plasma lipoproteins and the  
monocyte-macrophage system to atherosclerosis severity in  
cholesterol-fed pigeons.  
*Arteriosclerosis*, 6, 614-626.
- Schneider J., Liesenfeld A., Mordasini R., Schubotz R., Zöfel P.,  
Kubel F., Vandr -Plozzitzka C. & Kaffarnik H. (1985).  
Lipoprotein fraction, lipoprotein lipase and hepatic triglyceride  
lipase during short-term and long-term uptake of ethanol in  
healthy subjects.  
*Atherosclerosis*, 57, 281-291.
- Schrecker O. & Greten H. (1979).  
Activation and inhibition of lipoprotein lipase studies with  
artificial lipoproteins.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 572, 244-256.
- Shio H., Haley N.J. & Fowler S. (1979).  
Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed  
rabbits.  
*Lab. Invest.*, 41, 160-167.
- Simionescu M., Simionescu N. & Palade G.E. (1981).  
Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary  
endothelium: preferential distribution of anionic sites.  
*J. Cell. Biol.*, 90, 605-613.
- Simionescu M., Simionescu N. & Palade G.E. (1974).  
Morphometric data on the endothelium of blood capillaires.  
*J. Cell Biol.*, 60, 128-152.
- Snyderman R., Shin H.S. & Hansman M.S. (1971).  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138, 387-390.
- Stanley E.R., Guilbert L.J., Tushinski R.J. & Bartelmez S.H. (1983).  
*J. Cell. Biochem.*, 2, 151-159.
- Stary H.C. (1985).  
Macrophage foam cells in the coronary artery intima of human  
infants.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 454, 5-8.
- Steinberg D. (1987).  
Atherosclerosis from the viewpoint of cell biology.  
in *Atherosclerosis-Developments, complications and treatment*. J.  
Shepherd et al. ed. Elsevier Pub., , pp 3-20.
- Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Leake D.S., Witztum J.L. &  
Steinberg D. (1984).  
Modification of low density lipoprotein by endothelial cells  
involves lipid peroxidation and degradation of low density  
lipoprotein phospholipids.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 3883-3887.
- Steinbrecher V.P. (1987).

- Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products.  
J. Biol. Chem., 262, 3603-3608.
- Steinbrecher V.P., Witztum J.L., Parthasarathy S. & Steinberg D. (1987).  
Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification.  
Arteriosclerosis, 7, 135-143.
- Steinsiepe K.F. & Weibel E.R. (1970).  
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an spezifischen Organellen von Endothelzellen des Frosches (*Rana temporaria*).  
Z. Zellforsch., 108, 105-126.
- Stevens R.L., Colombo M., Gonzales J.J., Hollander W. & Schmid K. (1976).  
Glycosaminoglycans of the human artery and their change in atherosclerosis.  
J. Clin. Invest., 58, 470-481.
- Storm D.B., Rosenthal K.S & Swanson B.E. (1977).  
Polymyxins and Related Peptides Antibiotics.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 723.
- Suits A.G., Chait A., Aviram M. & Heinecke J.W. (1989).  
Phagocytosis of aggregated lipoprotein by macrophages: low density lipoprotein receptor-dependent foam cell formation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2713-2717.
- Sundström C. & Nilsson K. (1976).  
Establishment and characterization of human histiocytic lymphoma cell line (U-937).  
Int. J. Cancer, 17, 565-577.
- Sundström, C. & Nilsson, K. (1976).  
Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).  
Int. J. Cancer, 17, 565-577.
- Takemura R. & Werb Z. (1984).  
Modulation of apoprotein E secretion in response to receptor-mediated endocytosis in resident and inflammatory macrophages.  
J. Exp. Med., 159, 167-178.
- Taskinen M.R. & Kuusi T. (1986).  
High density lipoproteins in postprandial lipemia. Relation to sex and lipoprotein lipase activity.  
Atherosclerosis, 59, 121-130.
- Taylor R.F., Price T.H. & Schwartz S.M. (1981).  
Neutrophil-endothelial cell interaction on endothelial monolayer grown on micropore filters.  
J. Clin. Invest., 67, 584-587.

Territo, M., Berliner, J.A. & Fogelman, A.M. (1984).

Effect of monocyte migration on low density lipoprotein transport across aortic endothelial cell monolayers.

J. Clin. Invest., 74, 2279-2284.

Toledo O.M.S., & Mourao P.A.S. (1980).

Sulfated glycosaminoglycans in normal aortic wall of different mammals.

Artery, 6, 341-353.

Van Furth, R. (1980).

Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions.

in Mononuclear phagocytes, Martinus Nijhoff Publishers, 1-30.

Van Furth, R. (1978).

Mononuclear phagocytes in inflammation.

Handbook of experimental pharmacology, Springer Verlag, New York, 68-108.

Van Furth, R. & Sluiter, W. (1983).

Current view on the origin of macrophages and regulation of monocyte production.

in Mononuclear phagocyte biology, Marcel Dekker.

Van Hinsbergh V.W.M., Havekes L., Emeis J.J., Van Corven E. & Scheffer M. (1983).

Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells from human umbilical cord arteries and veins.

Arteriosclerosis, 3, 547-559.

Vance J.E., Khoo J.C. & Steinberg D. (1982).

Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages.

Arteriosclerosis, 2, 390-395.

Vannier C. & Ailhaud G. (1986).

A continuous flow method for the study of lipoprotein lipase secretion in adipose cells.

Biochim. Biophys. Acta, 875, 324-333.

Vannucchi S., Pasquali F., Porciatti F., Chiarugi V., Magnelli L. & Bianchini P. (1988).

Binding, internalisation and degradation of heparin fragments by cultured endothelial cells.

Thrombos. Res., 49, 373-383.

Wagh P.V. & Olivecrona T. (1978).

The in vitro inhibition of bovine milk lipoprotein lipase by a glycoprotein preparation from human atherosclerotic intima.

Atherosclerosis, 29, 195-204.

Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M., McCartney-Francis N., Wahl L.M.,

- Roberts A.B. & Sporn M.B. (1987).  
Transforming growth factor type  $\beta$  induces monocytes  
chemotaxis and growth factor production.  
Proc. Natl. Acad. sci. USA, 84, 5788.
- Wang-Iverson, P., Ungar, A., Bliumis, J., Bukberg, P.R., Gibson, J.C.  
& Brown, W.V. (1982).  
Human monocytes in culture synthesize and secrete lipoprotein  
lipase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 923-928.
- Wang J.M., Bersani L. & Mantovani A. (1987).  
Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and  
polymorphonuclear leukocytes.  
J. Immunol., 138, 1469-1447.
- Wang J.M., Collela S., Allavena P. & Mantovani A. (1987).  
Chemotactic activity of human recombinant  
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.  
Immunology., 60, 439-444.
- Watanabe T., Hirata M., Yoshikawa Y., Nagafuchi Y. & Toyoshima H.  
(1985).  
Role of macrophages in atherosclerosis .  
Lab. Invest., 53, 80-90.
- Wehrmacher W.R. (1988).  
Endothelium: From Whence to Whither.  
Sem. in Thromb. and Haemost., 14, 1-11.
- Weibel E.R. & Palade G.E. (1964).  
New cytoplasmic components in arterial endothelia.  
J. Cell Biol., 23, 101-112.
- Weiss J.M. (1955).  
Intracellular changes due to neutral red as revealed in the  
pancreas and kidney of the mouse by electron microscope.  
J. Exp. Med., 101, 213-224.
- Werb Z. & Gordon S. (1975).  
Elastase secretion by stimulated macrophages: characterization  
and regulation.  
J. Exp. Med., 142, 361-377.
- Werb Z., Banda M.J. & Jones P.A. (1980).  
Degradation of connective tissue matrix by macrophages.  
J. Exp. Med., 152, 1340-1357.
- Williams M.P., Streeter H.B., Wusteman F.S. & Cryer A. (1983).  
Heparan sulfate and the binding of lipoprotein lipase to porcine  
thoracic aorta endothelium.  
Biochim. Biophys. Acta, 756, 83-91.
- World Health Organization Study Group. (1958).  
Classification of atherosclerotic lesions.

Zuckerman S.H., Ackerman S.K. & Douglas S.D. (1979).

Long-term human peripheral blood monocyte cultures: establishment, metabolism and morphology of primary human monocyte-macrophages cell cultures.

Immunology, 38, 401-411.