



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Contribution à l'étude de l'athérogenèse. 5: Étude du récepteur des lipoprotéines de faible densité dans les cellules endothéliales humaines soumises à un stress oxydant

Noël, Bénédicte

*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.

150689

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX, NAMUR

UNITE DE CYTOLOGIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ATHEROGENESE.  
V. ETUDE DU RECEPTEUR DES LIPOPROTEINES DE  
FAIBLE DENSITE DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES  
HUMAINES SOUMISES A UN STRESS OXYDANT.

Bénédicte NOEL

1988-1989

Arrivée au terme de ce mémoire,

je tiens tout d'abord à remercier

M<sup>me</sup> Rouvenot pour m'avoir aimablement  
accueillie au sein de son laboratoire, et  
pour m'avoir guidée tout au long de l'année.

Je remercie vos qui m'a largement  
épaulée. Sans lui, rien n'aurait été possible.

J'admire sa compétence, j'ai apprécié ses  
encouragements et ses nombreux conseils.

Je remercie pour leur disponibilité, M<sup>me</sup> Heumen,  
Nelli, Martine, Jacky, Christine et Isabelle.

Je remercie M<sup>re</sup> Bogard pour le desistement  
de son aide me fut précieuse.

Je remercie M<sup>re</sup> Collet pour sa collaboration,  
et également M<sup>me</sup> Lemerand pour le soutien.

Je remercie mes parents pour leur soutien et  
leurs nombreux encouragements.

Je remercie toutes les personnes qui ont  
collaboré à la réalisation de ce travail.

Les remerciements les plus sincères vont à  
mon oncle qui m'a aidé tout au long  
de ces études à surmonter les épreuves difficiles.

TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

## I. L'ATHEROSCLEROSE

- A. Définition
- B. Description des lésions athéroscléreuses
  - 1. Description des artères normales
  - 2. Description des lésions
- C. Athérogenèse : principales hypothèses

## II. ATHEROSCLEROSE ET HYPERCHOLESTEROLEMIE

- A. Des évidences
- B. Transport du cholestérol
- C. Endocytose spécifique
  - 1. Distribution des récepteurs
  - 2. Les ligands du récepteur
  - 3. Endocytose des LDL proprement dites
- D. L'hypercholestérolémie familiale
  - 1. Rôle du récepteur
  - 2. Mutations affectant le gène du récepteur
  - 3. Thérapie de l'hypercholestérolémie familiale

## III. LE RECEPTEUR : STRUCTURE ET FONCTIONS

- A. Biosynthèse du récepteur
- B. Les cinq domaines du récepteur

## IV. LA CELLULE ENDOTHELIALE

- A. Localisation et fonction
- B. Endocytose des LDL dans les cellules endothéliales
  - 1. Endocytose spécifique
  - 2. Transcytose
  - 3. Effet de la densité cellulaire sur l'endocytose spécifique

## V. RADICAUX LIBRES ET ATHEROSCLEROSE

- A. Formation des principaux dérivés actifs de l'oxygène
  - 1. Réduction monovalente de l'oxygène
  - 2. Réaction de Fenton
  - 3. Système Xanthine/Xanthine oxydase
- B. Dommages induits par les dérivés actifs de l'oxygène
  - 1. Effets des radicaux libres sur les lipides
  - 2. Effets des radicaux libres sur les protéines
  - 3. Interactions entre les intermédiaires de la peroxydation lipidique et les protéines
  - 4. Effet des radicaux libres sur la membrane plasmique

- C. Radicaux libres et cellules endothéliales
- D. Effet des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des cellules endothéliales

## VI. BUT DU MEMOIRE

### MATERIEL ET METHODES

#### I. MISE EN CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES

- A. Mise en culture
- B. Changement de milieu
- C. Repiquage

#### II. ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE ET DU SERUM DEFICIENT EN LIPOPROTEINES

- A. Isolement proprement dit
- B. Dosage des LDL
- C. Préparation du sérum déficient en lipoprotéines (LPDS)
  - 1. Fractionnement du sérum
  - 2. Dosage du cholestérol

#### III. COUPLAGE DE LDL A L'OR COLLOIDAL

- A. Préparation de l'or colloïdal
  - 1. Or colloïdal de 17 nm
  - 2. Or colloïdal de 5 nm
- B. Préparation du conjugué LDL-or colloïdal
  - 1. Conjugué LDL-or colloïdal (17 nm)
  - 2. Conjugué LDL-or colloïdal (5 nm)

#### IV. SOLUBILISATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES

- A. Première méthode: solubilisation directe
- B. Deuxième méthode: solubilisation en présence d'urée

#### V. ELECTROPHORESE SUR SDS-PAGE ET TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE

- A. Electrophorèse
  - 1. Le Phastsystem
  - 2. Les gels utilisés
  - 3. Méthode
- B. Coloration du gel
  - 1. Coloration au Bleu de Coomassie
  - 2. Coloration à l'argent

#### C. Transfert sur nitrocellulose

#### VI. REVELATION DU RECEPTEUR

- A. Méthode du ligand
  - 1. Dosage du conjugué

B. Méthode de l'anticorps anti-récepteur

V. OXYDATION DES CELLULES

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. PRELIMINAIRES

A. Couplage LDL-or colloïdal (17 nm)

1. Résultats

2. Commentaires

B. Choix du gel et de sa coloration

C. Blotting et détection du récepteur avec le conjugué

1. Vérification de l'efficacité du transfert

2. Choix du colorant de l'étalon

3. Effet de la solubilisation

D. Conclusion

1. Existence du récepteur dans les cellules endothéliales

2. Détection du récepteur par la méthode du ligand

II. DETECTION DU RECEPTEUR DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE

A. Résultats

1. Amplification de la coloration à l'or colloïdal par la révélation à l'argent

2. Détermination du poids moléculaire du récepteur

3. Contrôle

4. Essai de détection du récepteur avec un anticorps anti-récepteur

B. Discussion

1. Identité du récepteur

2. Poids moléculaire du récepteur

3. Les contrôles

4. Essai de détection du récepteur par l'anticorps anti-récepteur

III. DETECTION DU RECEPTEUR DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES OXYDEES

A. Résultats

1. Effet de la durée de la révélation sur la détection du récepteur dans les cellules oxydées

2. Comparaison des protéines solubilisées à partir des cellules "tests" et "contrôles"

3. Etude quantitative du récepteur des LDL dans les cellules "tests" et "contrôles"

B. Discussion

CONCLUSION

# **INTRODUCTION**

## I. L'ATHEROSCLEROSE

### A. Définition

Dans nos pays industrialisés, l'athérosclérose est responsable d'une grande partie de la mortalité.

Elle est en effet la cause principale des infarctus cardiaques et des accidents vasculaires cérébraux.

Savons-nous ce qu'est l'athérosclérose ?

La définition la plus objective que l'on puisse en donner est celle de l'O.M.S. : " l'athérosclérose est une association variable de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre. Elle consiste en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modification de la média".

(World Health Organization Study Group, 1958).

Si cette définition ne nous dévoile pas les causes et les mécanismes de la pathologie, c'est que les points de vue sur le sujet divergent. Certaines évidences existent pourtant : l'athérosclérose est une maladie plurifactorielle, et les enquêtes épidémiologiques, telle que l'enquête de Framingham (Kannel et al., 1971) ont permis d'établir différents facteurs de risque dont les principaux sont l'âge et le sexe (sur lesquels on ne peut agir), les hyperlipidémies, l'hypertension artérielle et le tabagisme.

Cependant, il n'existe pas de consensus sur une séquence d'événements capable d'expliquer l'apparition des différentes lésions de l'athérosclérose à partir d'un seul facteur initiateur (Steinberg, 1987).

### B. Description des lésions athéroscléreuses

#### 1. Description des artères normales

Le schéma général d'une artère est revu en figure 1.

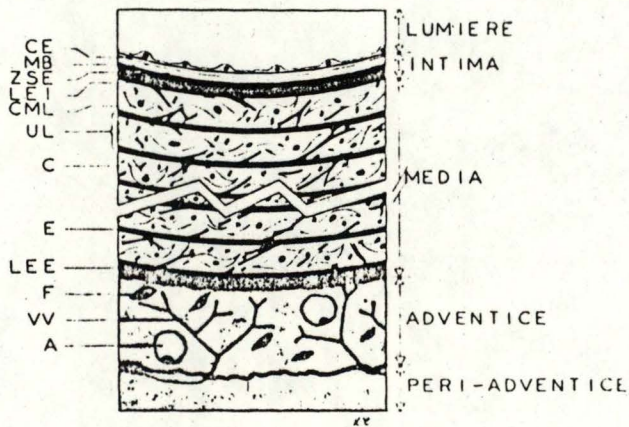
#### 2. Description des lésions

##### a. Stries lipidiques ou griffes graisseuses

A l'oeil nu, ces lésions sont des taches jaunâtres qui ne font que légèrement saillie dans la lumière artérielle. Elles sont strictement localisées à l'intima.

Elles sont principalement composées d'amas de macrophages chargés de





Coupe transversale de la paroi d'une artère élastique (artère carotide primitive, p. ex.).

*Transverse section of the wall of an elastic artery (e.g., common carotid artery).*

L'*intima* est formée d'une couche de cellules endothéliales (CE) reposant sur une membrane basale (MB) séparée de la lame limitante élastique interne (LIE) par la zone sous-endothéliale (ZSE). La *media* consiste en un empilement concentrique d'unités lamellaires (UL) formées de cellules musculaires lisses (CME) incluses dans un réseau de protéines fibreuses (élastine : E, collagène : C) et de mucopolysaccharides (non représentés). L'*adventice* est séparée de la *media* par la lame limitante élastique externe (LEE). C'est un tissu conjonctif peu organisé riche en fibroblastes (F) et en adipocytes (A) où pénètrent les *vasa vasorum* (VV) qui dans l'artère carotide primitive ne franchissent pas la LEE. La *péri-adventice* est une enveloppe conjonctive qui entoure l'*adventice* sans ligne de démarcation nette.

Fig. 1. Schéma de l'artère selon Capron (1983)

lipides ("foam cells" ou cellules spumeuses). Les stries lipidiques sont présentes à tous les niveaux de l'arbre artériel de tous les humains et existent dès l'enfance dans l'aorte et les artères carotides. S'il est certain que toutes les stries lipidiques ne se transforment pas en plaques athéroscléreuses, il est probable qu'elles sont des précurseurs nécessaires à l'athérosclérose.

#### b. Plaque fibro-lipidique

Avec cette lésion commence l'athérosclérose proprement dite. Elle consiste en un épaissement de l'intima constitué d'une armature fibreuse périphérique entourant un centre graisseux (débris cellulaires et inclusions lipidiques intra et extra cellulaires). Les lipides représentent jusqu'à 60% du poids sec de la plaque d'athérosclérose. Son caractère sténosant la rend responsable des différents troubles ischémiques observés.

#### c. Plaque fibreuse ou plaque calcaire

La plaque fibrolipidique finit par se calcifier. Cette calcification est localisée, le plus généralement, au niveau de la base d'implantation de la plaque.

Les plaques d'athérosclérose peuvent encore se compliquer et donner lieu à :

- une hémorragie intrapariétale
- une ulcération
- une thrombose.

#### C. Athérogénèse : principales hypothèses

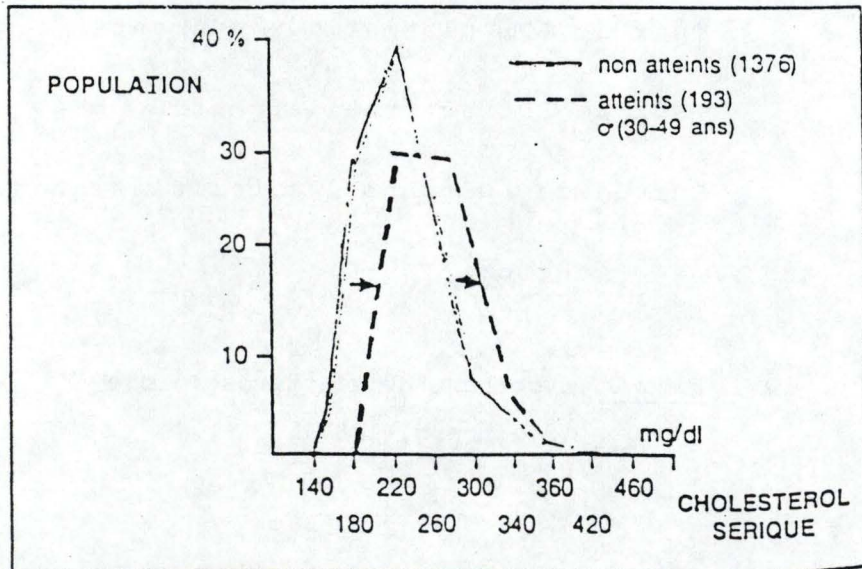
- Selon l'hypothèse monoclonale (Benditt et al., 1973) la migration de cellules musculaires lisses dans l'espace sous-endothélial et leur prolifération, similaire au développement d'une tumeur bénigne, était retenue comme principale cause de l'athérosclérose. Aujourd'hui, cette hypothèse n'est plus vraiment en vogue.

- L'hypothèse de la réponse à une lésion faisait intervenir l'aggrégation des plaquettes en des sites dénudés de cellules endothéliales (Ross & Glomset, 1976; Wissler, 1979). Cependant, des travaux plus récents (Gerrity, 1981; Ross, 1986) ont montré que les cellules endothéliales sont toujours présentes pendant le développement d'une lésion. Actuellement, cette hypothèse a été revue en fonction de ces observations et une lésion fonctionnelle des cellules endothéliales

plutôt qu'un agent destructeur de l'endothélium pourrait se trouver à l'origine d'une lésion primaire.

- Au cours de ces 10 dernières années, l'attention de plusieurs chercheurs a été focalisée sur le rôle du macrophage qui semble être le précurseur des "foam cells". (Gerrity, 1981).

- On ne peut pas négliger le rôle des lipides dans les processus athérogènes ainsi que leur infiltration dans la paroi artérielle au cours de ce processus. Dans sa forme la plus simple, l'hypothèse de l'infiltration lipidique propose que les hyperlipidémies, en particulier l'hypercholestérolémie, est la cause majeure contribuant à l'athérosclérose. (Goldstein & Brown, 1977; Steinberg, 1987). Nous approfondirons ce dernier point dans le chapitre suivant.



Etude de Framingham (sur 16 années).

Fig. 2. Morbidité cardio-vasculaire au sein d'une population.

Visualisation de la différence de cholestérolémie entre deux groupes de sujets :

- sujets indemnes
- sujets atteints de maladie cardio-vasculaire.

Le groupe avec maladie cardio-vasculaire présente des taux de cholestérol plus élevés que le groupe indemne. (Déplacement de la courbe vers la droite) (Kannel, 1971).

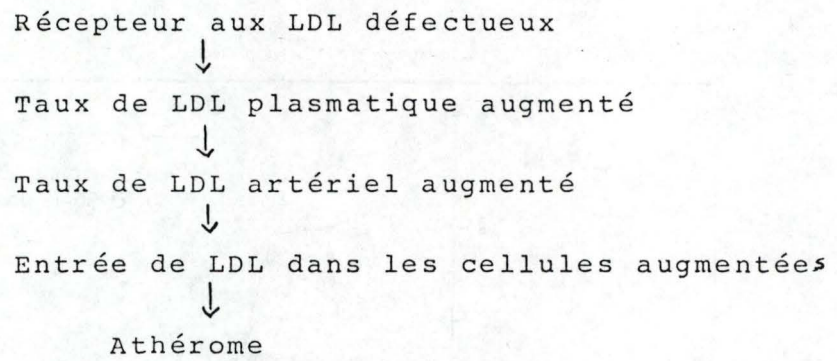


Fig. 3. Hypothèse de l'athérosclérose  
(Steinberg, 1987).

## II. ATHEROSCLEROSE ET HYPERCHOLESTEROLEMIE

### A. Des évidences

Aujourd'hui, il semble clair qu'un degré minimum d'hypercholestérolémie soit le prérequis essentiel pour le développement de l'athérosclérose, même en présence d'autres facteurs de risque. (Steinberg, 1987). Cette affirmation est basée sur plusieurs observations revues par Steinberg en 1987 :

- L'accumulation de cholestérol dans la paroi aortique est une caractéristique constante des lésions d'athérosclérose.

- L'athérosclérose peut être produite expérimentalement en augmentant le taux de cholestérol plasmatique.

- Les populations ayant un taux élevé en cholestérol développent plus facilement des problèmes vasculaires. (Fig. 2)

- Les études du Lipid Research Clinic Program (1984) ont montré que l'apparition d'accidents vasculaires diminuait en réduisant le taux de cholestérol plasmatique.

- La preuve la plus évidente de la relation entre le cholestérol et l'athérosclérose est d'ordre génétique : c'est l'hypercholestérolémie familiale.

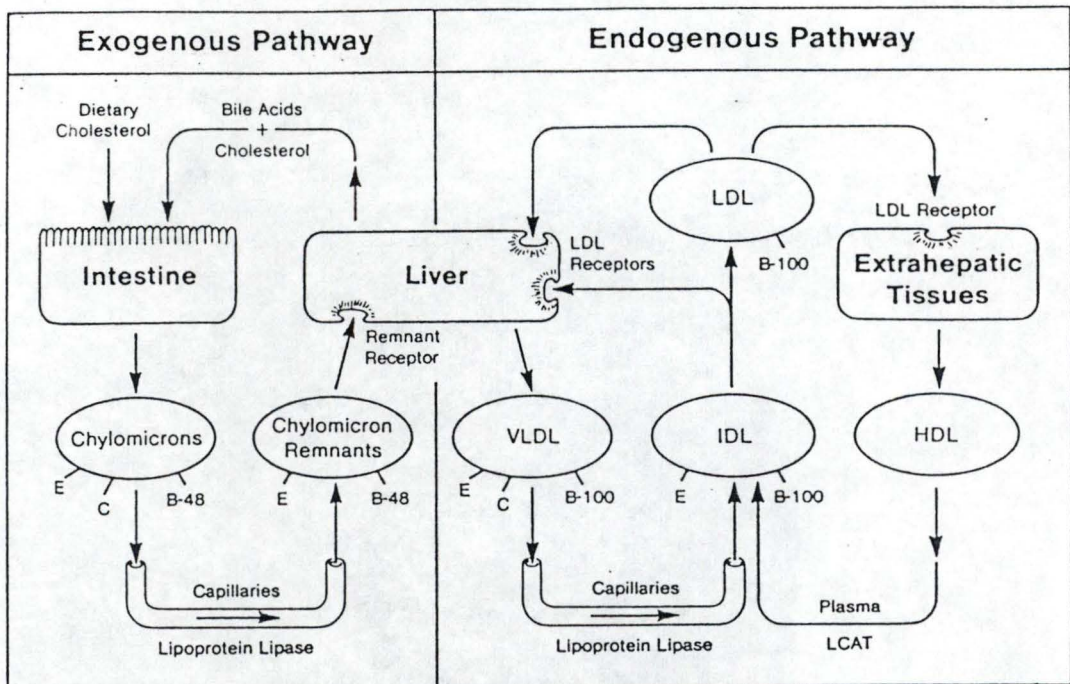
Il s'agit d'une maladie héréditaire où le gène codant pour le récepteur des lipoprotéines de faible densité (principales transporteurs du cholestérol plasmatique) présente une mutation rendant ce récepteur non fonctionnel. La conséquence directe de cette altération est une augmentation du taux de cholestérol circulant (Brown et al., 1974, 1977; Brown & Goldstein, 1984). Les LDL circulent plus longtemps dans le sang et à un taux plus élevé. Ces lipoprotéines pourraient alors pénétrer en plus grand nombre dans la paroi et engendrer les lésions caractéristiques de l'athérogénèse. (Fig.3).

### B. Transport du cholestérol

Il existe deux voies pour le transport des graisses :

- une voie exogène prenant en charge le cholestérol et les triglycérides absorbés par l'intestin;

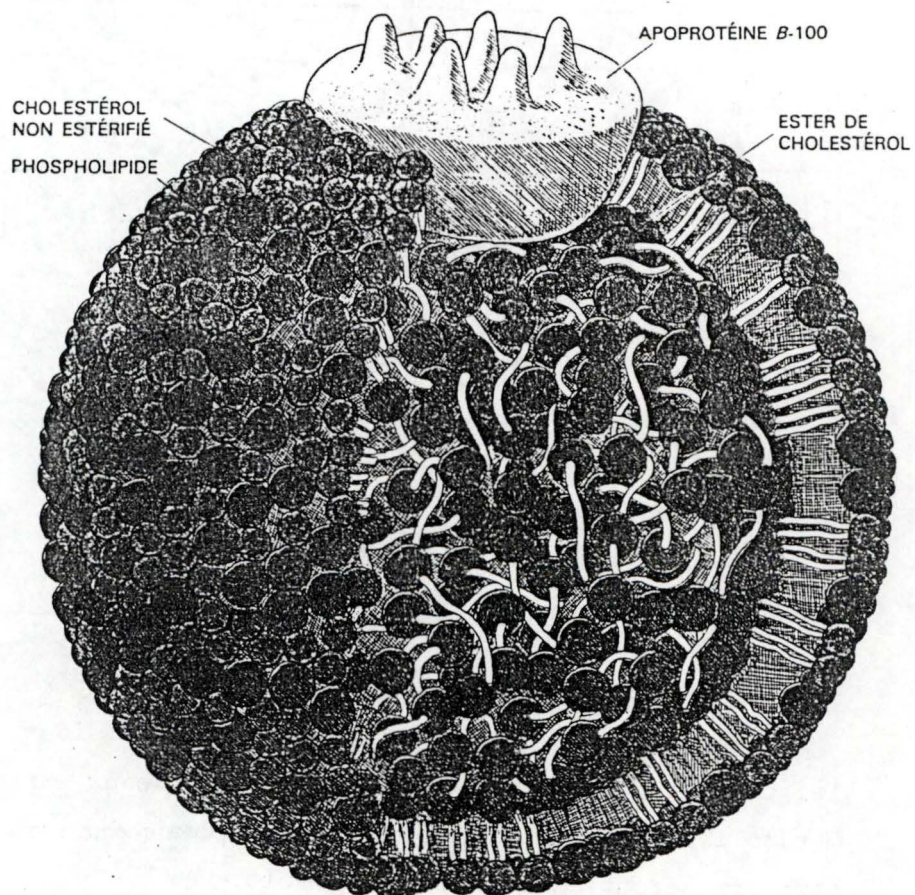
- une voie endogène transportant le cholestérol et les triglycérides qui sont déversés dans le sang à partir du foie.



**Fig. 4.** Transport exogène et endogène du cholestérol.

- Les cellules intestinales incorporent les lipides alimentaires dans les chylomicrons qui passent dans les vaisseaux sanguins, où ils sont métabolisés, donnant ainsi naissance à des remnants de chylomicrons. Ces derniers seront endocytés par le foie.
- Le foie synthétise des VLDL (lipoprotéines de très faible densité) qui se libèrent de leur triglycérides pour devenir des IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire). Une part des IDL est enlevée de la circulation au niveau du foie; ces IDL peuvent aussi devenir des LDL (lipoprotéines de faible densité) après perte de leur apolipoprotéine E. Les LDL seront captées par les cellules extrahépatiques qui réexporteront vers le foie leur excès de cholestérol au niveau des HDL.

(Goldstein et al., 1983)



2. LES LDL, les principaux transporteurs de cholestérol dans le sang, sont des particules sphériques ; leur masse moléculaire est d'environ trois millions et leur diamètre de 22 nanomètres (un nanomètre est égal à un milliardième de mètre). Le centre d'une particule de LDL est constitué d'environ 1500 molécules d'esters de cholestérol, chaque molécule de cholestérol étant fixée par une liaison ester à une longue chaîne d'acide gras. Ce centre est entouré d'une couche composée de 800 molécules de phospholipides, 500 molécules de cholestérol non estérifié et une grosse molécule de protéine, l'apoprotéine B-100. Quand la concentration sanguine en cholestérol est élevée (ce qui augmente le risque d'athérosclérose), c'est presque toujours la concentration en LDL qui est augmentée.

Fig. 5. Schéma de la LDL selon Brown & Goldstein, 1985



Ces 2 voies sont décrites succinctement sur le schéma de la fig. 4.  
(Pour une revue voir Goldstein et al., 1983).

#### Classes des lipoprotéines

Le métabolisme du cholestérol fait intervenir 5 grandes classes de lipoprotéines : les chylomicrons et remnants de chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL, et les HDL. La classification de ces lipoprotéines est actuellement basée sur l'isolement de ces dernières par ultracentrifugation en profitant de leurs différentes densités hydratées (Mills et al., 1984).

Ces lipoprotéines ont une structure générale similaire : elles sont constituées d'un centre composé de molécules hydrophobes, entouré d'une enveloppe hydrophile.

Les molécules hydrophobes sont principalement des triglycérides et des esters de cholestérol, tandis que l'enveloppe est composée de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'une série de protéines spécifiques aux lipoprotéines : les apolipoprotéines.

Les LDL sont les lipoprotéines apparemment les plus importantes du point de vue de l'athérosclérose. En effet, ce sont les lipoprotéines qui transportent la plus forte concentration en cholestérol et qui ont comme rôle d'apporter ce cholestérol aux cellules extrahépatiques. En excès dans la circulation, elles ont un potentiel athérogène important. Leur concentration dans le plasma est d'une importance capitale. Elles ne possèdent qu'une seule apolipoprotéine : c'est l'apolipoprotéine B100 qui leur permet de reconnaître leur récepteur et de s'y lier. La structure des LDL figure ci-contre. (Fig. 5).

#### C. Endocytose spécifique

##### 1. Distribution des récepteurs

Le récepteur aux LDL est une protéine membranaire liant cette lipoprotéine. C'est la LDL qui fournit la cellule en cholestérol. Quasiement tous les types cellulaires possèdent ces récepteurs, car le cholestérol est un constituant essentiel des membranes.

Le macrophage possède quelques récepteurs pour les LDL natives mais possède surtout un récepteur spécifiques aux LDL modifiées : le récepteur "scavenger". (Goldstein et al., 1979).

Dans les glandes surrénales et dans les ovaires, le cholestérol est respectivement transformé en cortisol et en oestrodiole, deux hormones

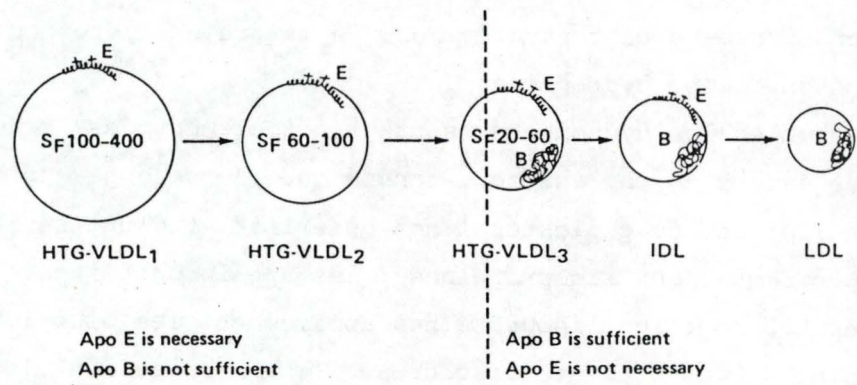


Fig. 6. "Switch" des ligands du récepteur donnant la cascade métabolique des HTG-VLDL aux LDL.

stéroïdiennes. Dans le foie, il est transformé en acides biliaires, eux-mêmes sécrétés dans le duodénum pour intervenir dans la digestion des graisses.

Ceci explique pourquoi le récepteur a souvent été purifié à partir de ces 3 organes. (Schneider et al., 1979,1980; Roach & Noël, 1985; Friedman et al., 1987).

## 2. Les ligands du récepteur

Pour revue : voir Sandra et al., 1987.

Il existe 2 apolipoprotéines capables de se lier au récepteur.

- Le ligand d'importance physiologique principale est l'apo B100 : l'apolipoprotéine des LDL.

- Une HDL anormale contenant l'apolipoprotéine comme seule apolipoprotéine (l'HDLc) se lie avidement au récepteur des LDL.

C'est pourquoi on nomme ce récepteur l'apo B/E récepteur.

Seules les LDL, IDL et petites VLDL sont normalement catabolisées par la voie identique à celle des LDL (via l'apo B 100).

De grosses VLDL apparaissant lors d'hypertriglycémie (HTG VLDL) sont capables d'être captées par le récepteur via l'apo E.

Ceci est valable pour le HDLc présentes à forte concentration lors d'abétalipoprotéinémie.

Les grosses VLDL normales ne se lient au récepteur des LDL qu'après leur lipolyse qui donne de plus petites VLDL dépourvues d'apo E.

Celles-ci ont alors la conformation de leur apo B appropriée pour se lier au récepteur.

Le domaine de liaison de l'apo B 100 peut-être exprimé à la surface des grosses VLDL normales, mais ce domaine semble être masqué dans ces lipoprotéines.

En conclusion, les grosses HTG-VLDL se lient au récepteur des LDL via l'apo E, tandis que les LDL le font via l'apo B. C'est pourquoi, l'hypothèse a été émise, que quelque part dans la cascade métabolique des plus larges HTG-VLDL, aux LDL, les déterminants pour la liaison au récepteur "switchent" de l'apo E à l'apo B. (Fig.6)

## 3. Endocytose des LDL proprement dites

L'endocytose des LDL a d'abord été décrite pour la première fois dans les fibroblastes en culture. (Goldstein & Brown, 1974).

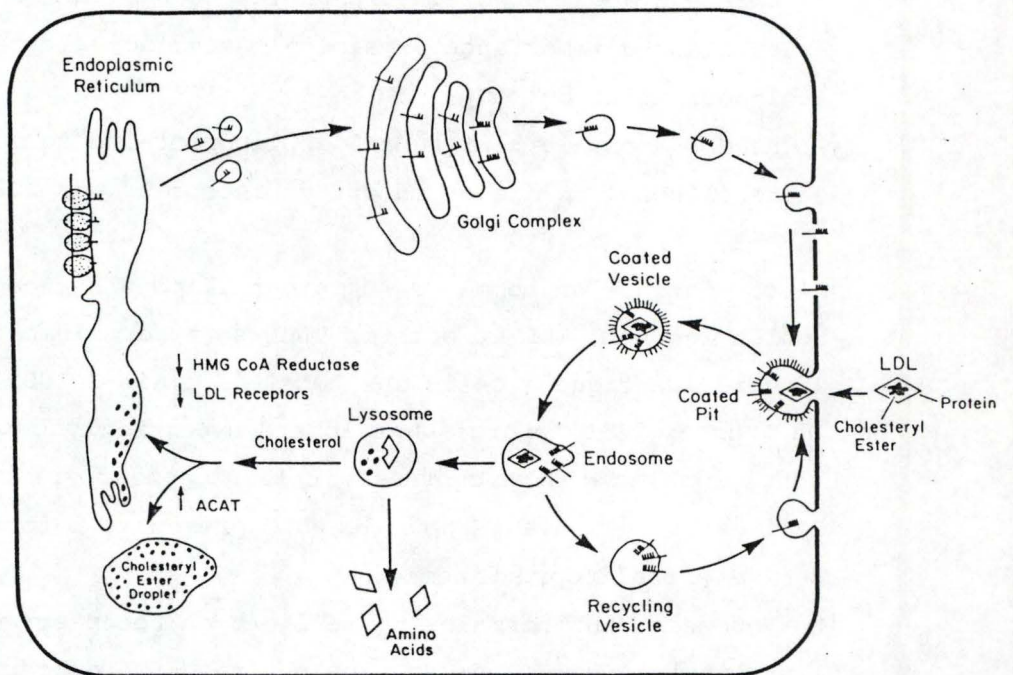


Fig. 7. Endocytose spécifique des LDL selon Goldstein & Brown, 1985

Cette voie est aussi applicable pour les cellules endothéliales. (Stein & Stein, 1976). Le récepteur des LDL a servi comme prototype pour l'étude de l'endocytose médiée par récepteur en général. (Brown et al., 1983; Goldstein et al., 1983).

Pour une revue, voir Goldstein & Brown, 1977 (Fig. 7).

#### a. Liaison entre la LDL et son récepteur

Dans certains cas d'hypercholestérolémie, le récepteur aux LDL était défectueux ou même absent et donc la LDL ne pouvait s'y lier. (Goldstein, Brown, 1974; Anderson et al., 1976).

Beaucoup plus récemment, la séquence des acides aminés du récepteur, de l'apo B 100, et de l'apo E ont été déterminées (Yamamoto et al., 1984; Yang et al., 1986; De Loof et al., 1986).

ce qui a permis de préciser la nature ionique de l'interaction entre le ligand et son récepteur. Les deux ligands contiennent des charges positives cruciales pour la liaison au récepteur (des résidus lysines et arginine). En effet, si ces résidus sont modifiés par acétylation, par exemple, la liaison ne se produit pas. (Basu et al., 1976).

Les récepteurs ne sont pas distribués au hasard sur la membrane plasmique, plus de 70% de ceux-ci sont concentrés sur un court segment de la membrane. Ces régions constituent moins de 2% de la surface totale des cellules fibroblastiques (Anderson et al., 1978) et sont appelées "puits recouverts" (coated pits) suite à la présence d'une protéine (la clathrine) accolée à la surface cytoplasmique de ces puits. (Pearse, 1976).

#### b. Internalisation des puits recouverts

Les puits recouverts vont s'invaginer et former des vésicules contenant les récepteurs et leurs ligands. (Goldstein et al., 1979). Plusieurs vésicules vont fusionner entre elles et donner naissance à des endosomes.

L'acidité de l'endosome provoque la dissociation des LDL de leur récepteur, qui vont alors se concentrer dans un segment de la membrane endosomale et retourner vers la surface cellulaire. C'est le phénomène de recyclage. (Brown et al., 1981, 1982, 1983).

### c. Hydrolyse lysosomale des protéines et des esters de cholestérol

L'endosome va fusionner avec le lysosome.

- La protéine va être rapidement hydrolysée.
- Le cholestérol le sera également grâce à une lipase acide.
- Une partie du cholestérol sera réestérifié et stocké dans la cellule.

### d. Les systèmes de régulation

Une accumulation de cholestérol agit sur 3 mécanismes importants :

1. Elle réduit la capacité de la cellule à fabriquer elle-même du cholestérol, car elle arrête la synthèse d'une enzyme, la HMG CoA réductase, qui catalyse l'une des réactions de la synthèse du cholestérol; sans cette enzyme, les cellules utilisent nécessairement le cholestérol extra cellulaire. (Brown et al., 1974).

2. Le cholestérol extrait des LDL facilite le stockage du cholestérol dans la cellule par l'activation de l'ACAT qui fixe un acide gras aux molécules de cholestérol libre.

3. L'accumulation de cholestérol commande un mécanisme de rétroaction qui empêche aux cellules de synthétiser de nouveaux récepteurs des LDL. (Brown & Goldstein, 1975). Les cellules ajustent leurs besoins en cholestérol en régulant le nombre de récepteurs qu'elles portent en surface.

## D. L'hypercholestérolémie familiale

### 1. Rôle du récepteur

On a découvert le rôle probablement fondamental des récepteurs des LDL dans l'athérosclérose quand on a montré que leur absence caractérise l'hypercholestérolémie familiale ou syndrome de Müller. Il s'agit d'une déficience familiale et héréditaire où le gène qui code pour le récepteur aux LDL est défectueux (Goldstein & Brown, 1974), provoquant une augmentation de la concentration en cholestérol dans le sang.

### 2. Mutations affectant le gène du récepteur

Les modifications dans le gène du récepteur sont variables. (Tolleshaugh et al., 1983).

Selon le site modifié, le gène mutant ne synthétise aucun récepteur

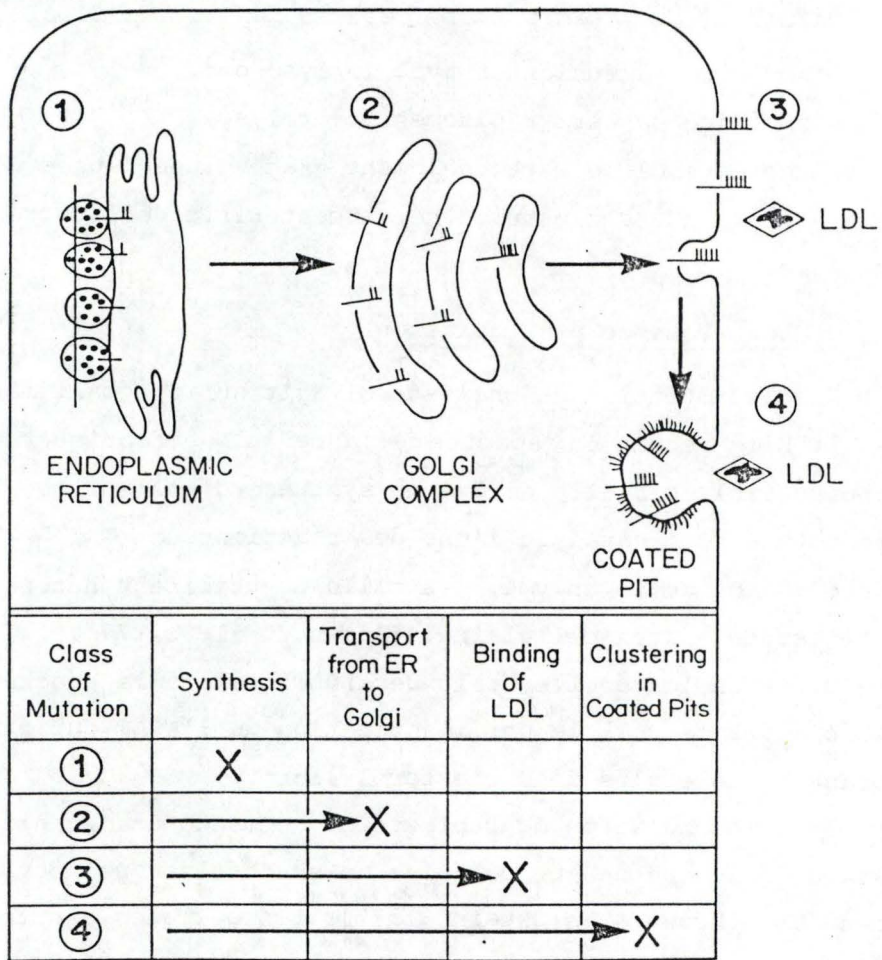


Fig. 8. Classe de mutations dans le gène codant pour le récepteur des LDL.

(Goldstein & Brown, 1985)

ou synthétise des récepteurs non fonctionnels, soit que ces récepteurs n'atteignent pas la membrane cellulaire, soit qu'ils ne se lient pas aux LDL, soit enfin qu'ils ne se rassemblent pas dans les puits recouverts. (Fig. 8).

Toutes les mutations sont alléliques (Goldstein & Brown, 1977 ; Tolleshaugh et al., 1983) ce qui implique que les signaux pour le transport des récepteurs du RER vers la surface cellulaire sont contenus dans la séquence en acides aminés du récepteur.

Les cellules des individus hétérozygotes (une personne sur 500) possèdent un gène fonctionnel et un gène défectueux : elles synthétisent donc moitié moins de récepteurs que les cellules des individus normaux.

Les individus homozygotes ont dans leur sang 6 fois plus de LDL que les individus normaux et ces personnes souffrent d'infarctus du myocarde avant l'âge de 20 ans.

Rappelons que les sujets hypercholestérolémiques familiaux homozygotes sont des témoins de l'existence d'une corrélation très nette entre une concentration élevée en LDL et l'athérosclérose.

Le récepteur jouerait donc un rôle de protecteur de l'athérosclérose en enlevant le cholestérol de la circulation sanguine. (Brown & Goldstein, 1981; Brown et al., 1981).

### 3. Thérapie de l'hypercholestérolémie familiale

On peut stimuler l'unique gène normal des individus hétérozygotes pour lui faire synthétiser 2 fois plus de récepteurs qu'il n'en produirait normalement (Brown et al., 1985).

- Le foie capte et dégrade plus de cholestérol que tous les autres organes. Il secrète des acides biliaires, formés à partir du cholestérol, qui seront réabsorbés après émulsification des graisses dans l'intestin.

Le cycle des acides biliaires limite le métabolisme du cholestérol par le foie. Certaines drogues, telle la cholestyramine, sont capables d'interrompre ce cycle.

- Dans ce cas, le foie fabrique plus de récepteurs mais il produit également plus de HMG CoA réductase, et donc plus de cholestérol endogène, ce qui limite la déficience en cholestérol ainsi que la production de récepteurs aux LDL.

- On peut utiliser la synthèse endogène du cholestérol par le foie



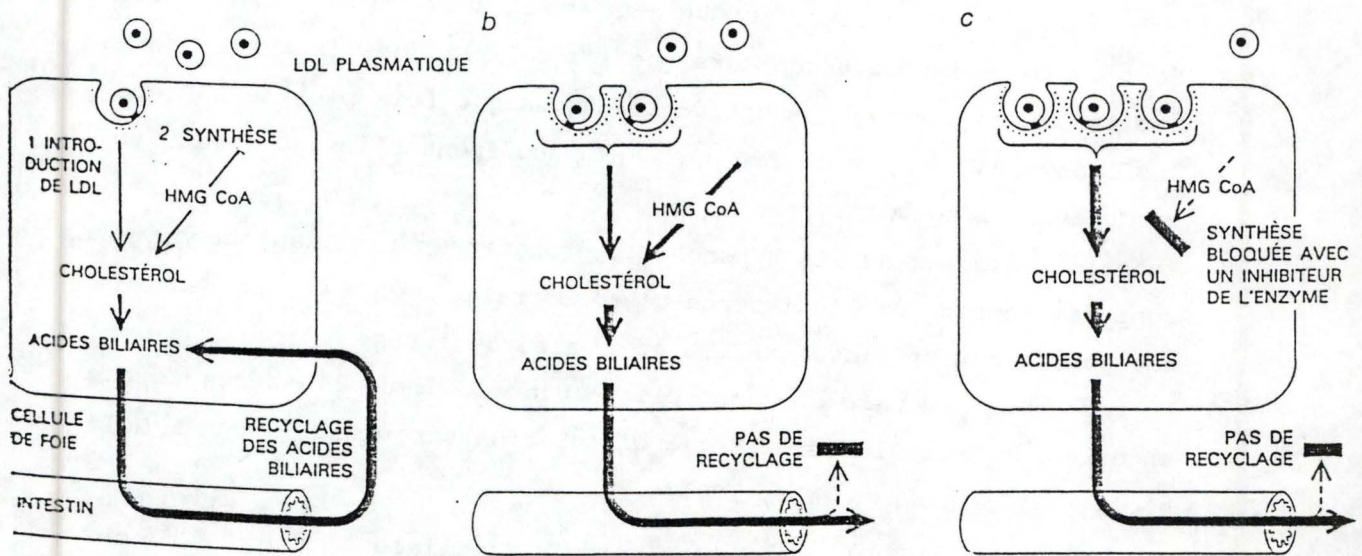


Fig. 9. Thérapie de l'hypercholestérolémie familiale

(Brown et al., 1985)

grâce à un inhibiteur naturel de l'HMG CoA réductase : la compactine ou la mévinoline.

- Grâce à la conjonction de ces traitements, on peut faire diminuer la concentration en LDL des individus hétérozygotes. (Fig. 9).

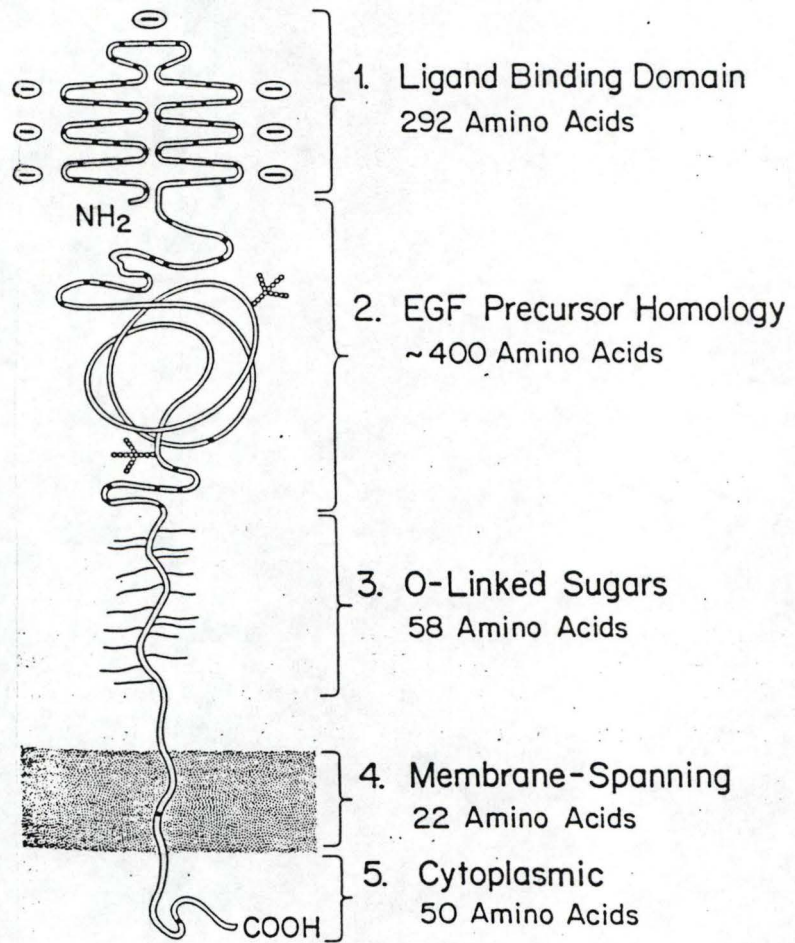


Fig. 10. Les 5 domaines composant le récepteur selon Yamamoto et al, 1984.

### III. LE RECEPTEUR : STRUCTURE - FONCTIONS

---

Le récepteur aux LDL a d'abord été purifié du cortex adrénalien bovin, un organe contenant des récepteurs en abondance, permettant de fournir aux cellules le cholestérol nécessaire pour la biosynthèse d'hormones stéroïdiennes.

Ce récepteur s'avère être une glycoprotéine acide avec un P.M. apparent de 160000 daltons, estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. (Schneider et al., 1982).

#### A. Biosynthèse du récepteur

Des anticorps contre le récepteur ont été préparés et ont été utilisés pour suivre la biosynthèse et le processing posttraductionnel de la protéine dans des cellules normales ou mutées :

trente minutes après sa synthèse, le précurseur des récepteurs subit un ajout de chaînes carbohydratées dans l'appareil du Golgi, ce qui produit une réduction de mobilité sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, de sorte que le P.M. estimé par cette méthode augmente de 120000 à 160000 (Tolleshaugh et al., 1982).

Le précurseur contient une à deux chaînes carbohydratées liées à des résidus asparagine et 9 à 18 chaînes carbohydratées liées à des résidus sérines ou thréonine. (Cumings et al., 1983).

#### B. Les 5 domaines du récepteur

Schneider et al. en 1983 démontrèrent que la portion NH2 terminale du récepteur est extracytoplasmique.

La structure primaire du récepteur des LDL humain a été découverte grâce à l'isolement du cDNA correspondant. (Yamamoto et al., 1984).

Cette protéine compte 839 acides aminés et peut-être divisée en 5 domaines bien distincts (Yamamoto et al., 1984) :

- une portion NH2 terminale de 329 acides aminés extrêmement riche en cystéine (15%) et constituant le site de liaison avec l'apolipoprotéine des LDL.

- Le domaine suivant contient 350 acides aminés et est homologue au précurseur du facteur de croissance épidermique de souris.

- Une région directement située au-dessus de la membrane plasmique, riche en sérine et thréonine, constitue le 3ème domaine, site de l'

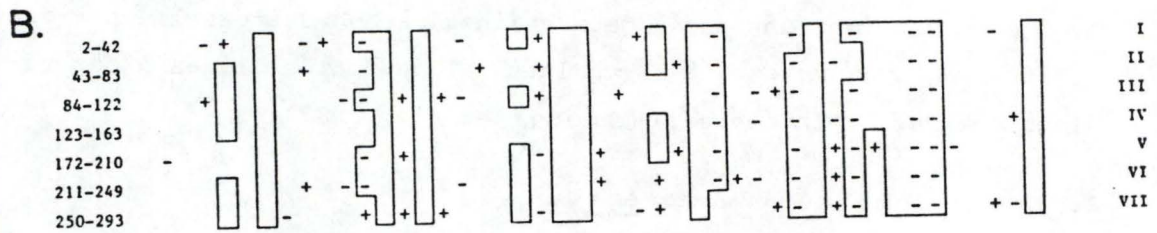
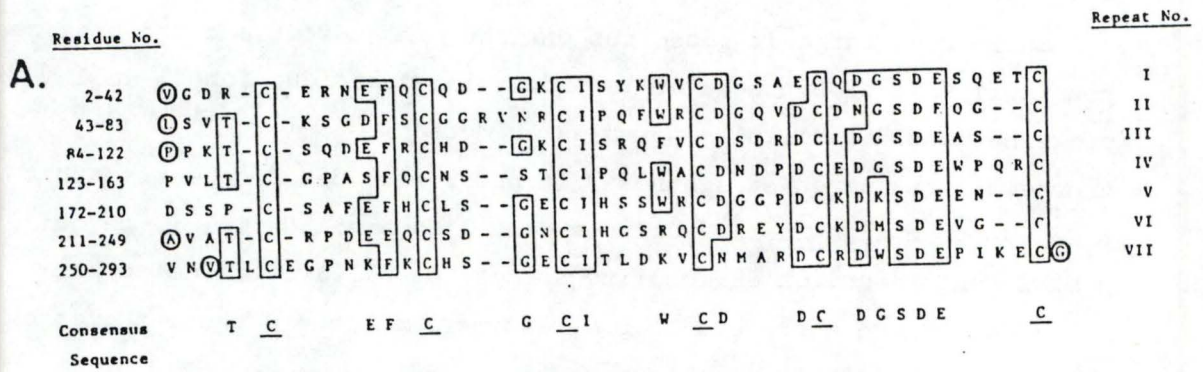


Fig. 11. Le premier domaine du récepteur aux LDL

attachement des sucres.

- 22 a.a. hydrophobes traversant la membrane plasmique constituent le quatrième domaine.

- Enfin, une portion COOH terminale de 50 a.a. se projette dans le cytosol.

Premier domaine : site de liaison aux LDL

Sur les 329 a.a. de ce domaine, 47 sont des cystéines étant impliquées dans des ponts disulfures.

Ce domaine semble être composé de 8 répétitions (Yamamoto et al., 1984).

Les 8 derniers acides aminés de chaque répétition constituent une séquence consensus. (Fig. 11).

Les deux ligands pour le récepteur contiennent des charges positives : les a.a; lysines et arginines sont complémentaires aux charges négatives du récepteur. Si ces résidus sont modifiés par acétylation, la liaison ne peut se faire. (Basu et al., 1980).

Des analyses de cinétiques ont montré que 4 LDL se lient au LDL récepteur, tandis qu'une seule HDL s'y lie. (Innerarity & Malhey, 1978; Pitas et al., 1980). (Fig. 13)

A l'intérieur du premier domaine, deux des 8 répétitions peuvent alors constituer un site de liaison pour une apo B.

Les ponts disulfures confèrent une grande stabilité en ce qui concerne le site de liaison du récepteur. En effet, celui-ci peut-être incubé dans du SDS tout en conservant sa capacité de liaison tant que les ponts disulfures ne sont pas réduits. (Daniel et al., 1983).

La liaison de la LDL au récepteur isolé est calcium-dépendante et est d'ailleurs inhibée par l'EDTA.

Récemment, le domaine liant le  $Ca^{2+}$  a été déterminé et semble correspondre à la première des 8 répétitions du domaine de liaison : les acides aminés 2 à 42. (Driel et al., 1987).

Deuxième domaine : homologie avec les précurseurs du facteur de croissance épidermique.

Ce second domaine contient à peu près 400 acides aminés et est homologue à une portion du domaine extracellulaire du précurseur du facteur épidermique de souris. (Russel et al., 1984; Yamamoto et al., 1984).

---

---

LDL Receptor

*(-Cys-Asp-X-X-X-Asp-Cys-X-Asp-Gly-Ser-Asp-Glu-)*<sub>7</sub>

Apo E

*-His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-*  
140 150

---

Fig. 12. Complémentarité entre les séquences d'acides aminés du récepteur aux LDL et un de ces ligands : l'apo E.

Les acides aminés chargés négativement dans le récepteur aux LDL et dans les acides aminés chargés positivement dans la séquence d'apo E sont en italique.

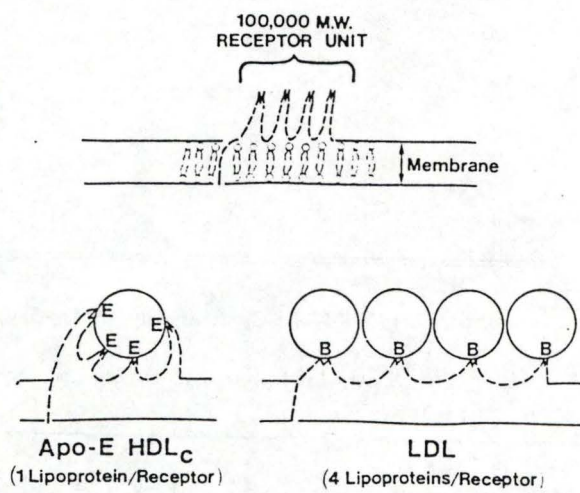


Fig. 13. Structure hypothétique du récepteur avec ses multiples sites de liaison.

(Malhey & Innerarity, 1983)



Cette homologie peut trouver son explication s'il existe une origine évolutive commune pour des protéines impliquées dans la stimulation de la croissance (comme les facteurs de croissance) et pour les protéines impliquées dans l'apport de nutriments (comme le récepteur des LDL) (Russel et al., 1984). Cette région homologue pourrait donc provenir de la duplication d'un gène ancestral commun. Si ce domaine est délété, le récepteur perd sa capacité de se dégager de son ligand à pH acide et, de manière concomitante, montre une diminution du taux de recyclage après internalisation.

Troisième domaine : domaine contenant des chaînes carbohydratées

Ce domaine se situe juste au-dessus de la membrane plasmique et constitue une séquence de 84 acides aminés riche en sérine et thréonine auxquels sont liées des chaînes carbohydratées. (Cummings et al., 1982). L'exacte fonction de ce domaine est méconnue. D'autres récepteurs membranaires possèdent des régions similaires, cela pourrait suggérer que les chaînes carbohydratées servent à garder le récepteur à l'écart de la membrane afin de lier leurs ligands. Dernièrement, des classes de mutations concernant les chaînes de sucre ont été établies. (Satoshi et al., 1988). Les chaînes de sucre liées à un oxygène semblent être altérées; ce qui suggère qu'il y ait une mutation au niveau de l'appareil de Golgi. Ces mutants sont capables de lier la LDL mais ne peuvent internaliser ce complexe.

Quatrième domaine : domaine intramembranaire

Ce domaine est composé de 22 acides aminés hydrophobes.

Cinquième domaine : région COOH terminale

Ce dernier domaine contient 50 a.a. se projetant dans le cytoplasme. Ce domaine joue un rôle important dans l'association des récepteurs avec les coated pits ce qui constitue un événement important pour permettre l'internalisation. Des aberrations dans ce domaine empêchent l'internalisation des récepteurs.

## IV. LA CELLULE ENDOTHELIALE

---

### A. Localisation et fonction

Les cellules endothéliales se situent, *in vivo*, à l'interface entre la paroi vasculaire et le sang circulant. Elles forment un tapis de cellules polygonales appelé endothélium. Même en culture, elles forment toujours une monocouche. (Thorgeirson, 1983).

De par sa localisation, cette couche joue un rôle essentiel dans la physiologie de la paroi artérielle :

1. Elle constitue une barrière à perméabilité sélective. Les cellules endothéliales sont en effet capables de contrôler sélectivement la sortie de molécules complexes.

Toute perturbation de cette fonction de perméabilité peut avoir des conséquences dramatiques (Hennig & Chow, 1987). Par exemple, une perturbation de cette barrière à perméabilité sélective vis-à-vis des composés plasmatiques peut provoquer une entrée excessive de lipoprotéines riches en cholestérol et intervenir dans l'initiation de l'athérosclérose. (Ross, 1986).

2. Une autre propriété de la cellule endothéliale est la thrombo-résistance, c'est-à-dire, la non réactivité avec les plaquettes à l'état normal (NØRDOY et al., 1979); en effet, la prostacycline, synthétisée principalement par les cellules endothéliales, est un puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'aggrégation de plaquettes. (Momada et al., 1976).

3. Les cellules endothéliales secrètent le facteur VIII (facteur de Willebrand) (Jaffe, 1984) sous forme d'un précurseur sécrété au niveau des corps de Weibel-Palade. (Weibel & Palade, 1964).

Ce facteur est responsable de l'aggrégation des plaquettes aux structures sous endothéliales.

4. Les cellules endothéliales secrètent aussi un facteur capable de relaxer les cellules musculaires lisses : l'EDRF.

## B. Endocytose des LDL dans les cellules endothéliales

Un bon nombre de cellules sont capables de cataboliser les LDL. Le foie joue un rôle majeur dans ce processus, puisque 40 à 60% de la dégradation des LDL y prend place. La régulation des récepteurs hépatiques joue donc un rôle important dans la détermination du taux de LDL plasmatiques (Pangburn, 1981).

Les cellules musculaires lisses (Stein & Stein, 1985; Weinstein et al., 1976) et les fibroblastes (Goldstein & Brown, 1974) de différentes espèces sont aussi capables de cataboliser les LDL ainsi que les cellules endothéliales provenant de la veine ombilicale. (Stein & Stein, 1976).

### 1. Endocytose spécifique

La capture et la dégradation des LDL ont d'abord été décrites dans les fibroblastes (Goldstein & Brown, 1974).

Les auteurs ont mis alors en valeur deux phénomènes distincts :

- l'endocytose spécifique nécessitant la liaison des LDL aux récepteurs, c'est la voie de haute affinité.
- La voie de faible affinité qui fait intervenir une adsorption non spécifique des LDL en surface des cellules, avec une affinité nettement inférieure.

L'endocytose spécifique des LDL par les cellules endothéliales correspond à l'endocytose décrite dans les fibroblastes (Stein & Stein, 1976). Van Hinsbergh et al., en 1983, distinguèrent aussi 2 voies de capture des LDL par les cellules endothéliales humaines en culture : la voie de haute affinité et la voie de faible affinité; cette dernière intervenant pour les concentrations en LDL supérieures à 50 g de protéines/ml.

Les aspects ultrastructuraux de l'endocytose spécifique dans les cellules endothéliales qui ont été étudiés (Mombaas-Kienhus, 1985; Poumay & Ronveaux-Dupal, 1985) avaient utilisé comme sonde des LDL couplées avec des particules d'or colloïdal.

### 2. Transcytose

Pour l'endothélium de l'aorte et de l'artère coronaire du rat, on a décrit 2 chemins parallèles par lesquels les LDL sont internalisés. (Vasile et al., 1983).

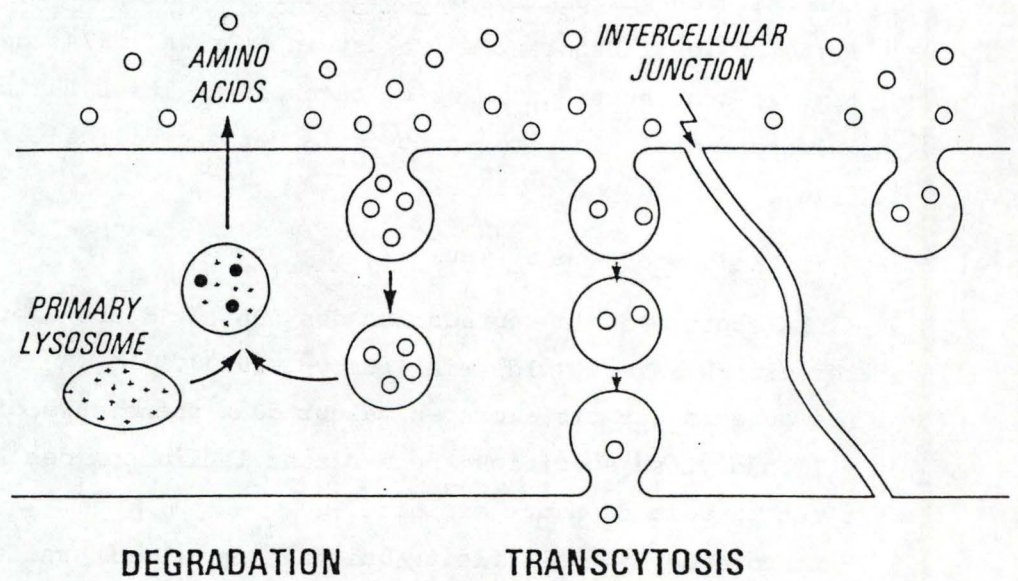


Fig. 14. Représentation du transport des LDL à travers la C.E. (transcytose) et du transport irréversible des LDL vers les lysosomes (endocytose spécifique).

- Un processus médié par récepteur, comme l'ont décrit Brown & Goldstein, qui apporte les LDL vers les lysosomes pour l'apport en cholestérol de la cellule elle-même.

- Un phénomène de transcytose, c'est-à-dire le passage des LDL à travers l'endothélium. Ce phénomène est non saturable à de fortes concentrations de LDL et sert à apporter le cholestérol aux autres cellules de la paroi vasculaire.

La transcytose est un phénomène important puisqu'il est indépendant de la concentration en lipoprotéines.

Des animaux étant hypercholestérolémiques montrent une augmentation de la transcytose de B-VLDL avec comme résultat une déposition des ces lipoprotéines dans l'espace non endothélial (Vasile et al., 1988), ce qui peut favoriser l'athérosclérose. (Fig. 14).

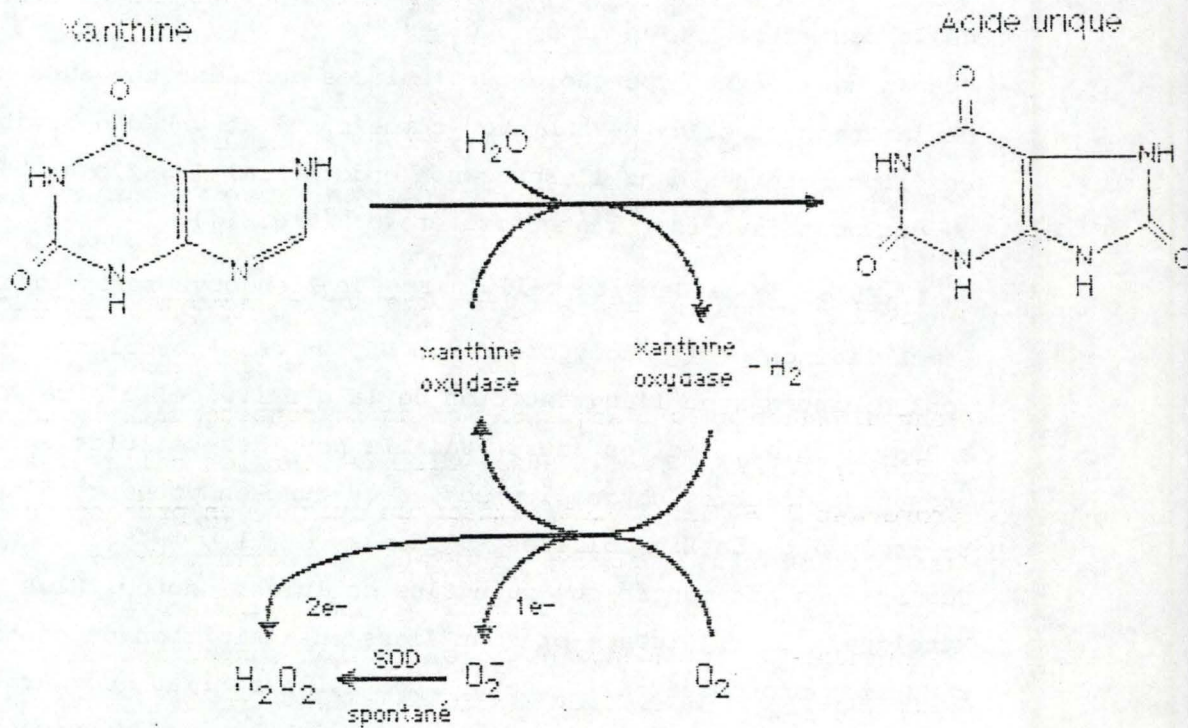
### 3. Effet de la densité cellulaire sur l'endocytose spécifique

La liaison et l'endocytose des LDL pour des fibroblastes en culture sont diminués avec l'augmentation de la densité cellulaire (Goldstein & Brown, 1974). Ceci est aussi valable pour des cellules endothéliales, provenant d'aortes bovines, mises en culture en présence d'un facteur de croissance de fibroblastes (Vladovsky et al., 1978).

Ces auteurs ont montré que quand les cellules endothéliales bovines atteignent la confluence et sont alors en inhibition de contact, une réduction prononcée de la capture des LDL aura lieu, comparativement avec des cellules encore en division. L'inhibition de contact a alors été retenue par ces auteurs comme le facteur majeur régulant le métabolisme du cholestérol (Fielding et al., 1979). Cependant, ce métabolisme des LDL a ainsi été étudié dans des cellules endothéliales provenant de veines ombilicales humaines (Coetzee et al., 1979).

A cette occasion, les auteurs remarquèrent que la différence de capture des LDL entre les cellules endothéliales confluentes et les cellules endothéliales en division est nettement moins élevée que ce que signala Vladovsky. Cette observation a été confirmée par Van Hinsbergh et al., en 1983, à la fois pour les cellules endothéliales veineuses et artérielles de cordons ombilicaux humains.

En conclusion, les cellules endothéliales humaines à confluence sont capables de cataboliser les LDL grâce à l'endocytose spécifique qui s'y déroule.



**Fig. 15** Représentation schématique du flux d'électrons intervenant dans le système Xanthine/Xanthine - oxydase.

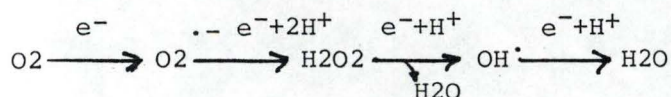
## V. RADICAUX LIBRES ET ATHEROSCLEROSE

Aujourd'hui, il est presque certain que d'autres facteurs que l'hypércholestérolémie sont indispensables pour le développement d'une lésion d'athérosclérose. La production de dérivés actifs de l'oxygène à proximité de la cellule endothéliale pourrait être un de ces facteurs. C'est ce que nous allons montrer dans ce chapitre.

### A. Formation des principaux dérivés actifs de l'oxygène

#### 1. Réduction monovalente de l'oxygène

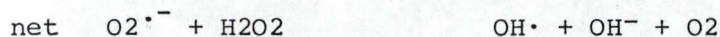
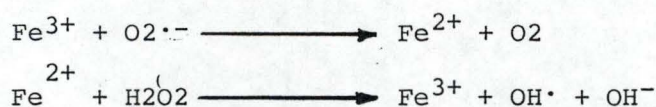
L'oxygène est nécessaire à la vie de tous les organismes aérobies, c'est une molécule qui possède deux électrons non appariés situés sur des orbitales parallèles. L'oxygène peut aussi être toxique par la formation de molécules réactionnelles, les radicaux libres, qui possèdent un électron non apparié sur une orbitale externe.



La molécule d'oxygène est un accepteur d'électrons qui forme de l'eau dans son état complètement réduit. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) n'est pas un radical libre puisque tous ses électrons sont appariés. C'est pourquoi nous parlerons de dérivés actifs de l'oxygène.

#### 2. Réaction de Fenton

Cette réaction se produit probablement dans les tissus biologiques en présence de métaux de transition :



Le radical hydroxyl (OH<sup>·</sup>) est extrêmement réactionnel et supposé être le responsable principal de la toxicité de l'oxygène. (Halliwell, 1987).

#### 3. Système Xanthine / Xanthine - oxydase.

Afin de produire des dérivés actifs de l'oxygène, nous utiliserons un système acellulaire : le système Xanthine - Xanthine oxydase. Il s'agit d'un système enzymatique produisant à la fois le radical anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène.

## B. DOMMAGES INDUITS PAR LES DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE

Toutes les molécules biologiques peuvent être la cible des radicaux libres.

### 1. Effets des radicaux libres sur les lipides

Les radicaux libres peuvent réagir avec les lipides insaturés, notamment les lipides membranaires, et former des peroxydes lipidiques. Ces derniers peuvent participer à des réactions de propagation, jusqu'au moment où deux radicaux vont réagir ensemble dans une réaction de terminaison.

Les peroxydes lipidiques peuvent se décomposer, notamment en aldéhydes et alkénols qui pourront à leur tour réagir avec des groupements aminés de protéines.

### 2. Effets des radicaux libres sur les protéines

L'exposition de protéines au radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) ou à la combinaison de  $\text{OH}^\bullet + \text{l'anion superoxyde}$  cause de grosses modifications dans la structure des protéines. (Wolff & Dean, 1986; Wolff et al., 1986; Davies, 1987; Davies et al., 1987; Hunt et al., 1988).

Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), seul, semble causer la production d'agrégats de protéines (Wolff & Dean, 1986; Wolff et al., 1986; Davies, 1987).

Par exemple, l'albumine exposée au radical  $\text{OH}^\bullet$  pourrait former des dimères, trimères et tétramères, partiellement causés par la formation de bityrosine entre différentes molécules de BSA.

Des liens disulfures peuvent aussi se créer entre protéines.

La combinaison de  $\text{OH}^\bullet/\text{O}_2$  ou de  $\text{OH}^\bullet/\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$  semble provoquer surtout une fragmentation de protéines (Davies, 1987; Davies et al., 1987).

Toujours dans ce cadre, les résidus prolines pourraient constituer un site d'hydrolyse privilégié (Wolff et al., 1986). De plus, la fragmentation de la BSA produit de nouveaux groupements carbonyles sans, apparemment, produire la moindre augmentation de groupements aminés. Cette observation laisse supposer que la fragmentation de chaînes polypeptidiques se ferait préférentiellement au niveau des carbones  $-\alpha$  plutôt qu'au niveau des liens peptidiques. (Dean et al., 1987). Par ailleurs, la dégradation des protéines par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et par des hydroperoxydes en présence de métaux de transition a été démontrée par l'équipe de Dean (Wolff & Dean, 1986).



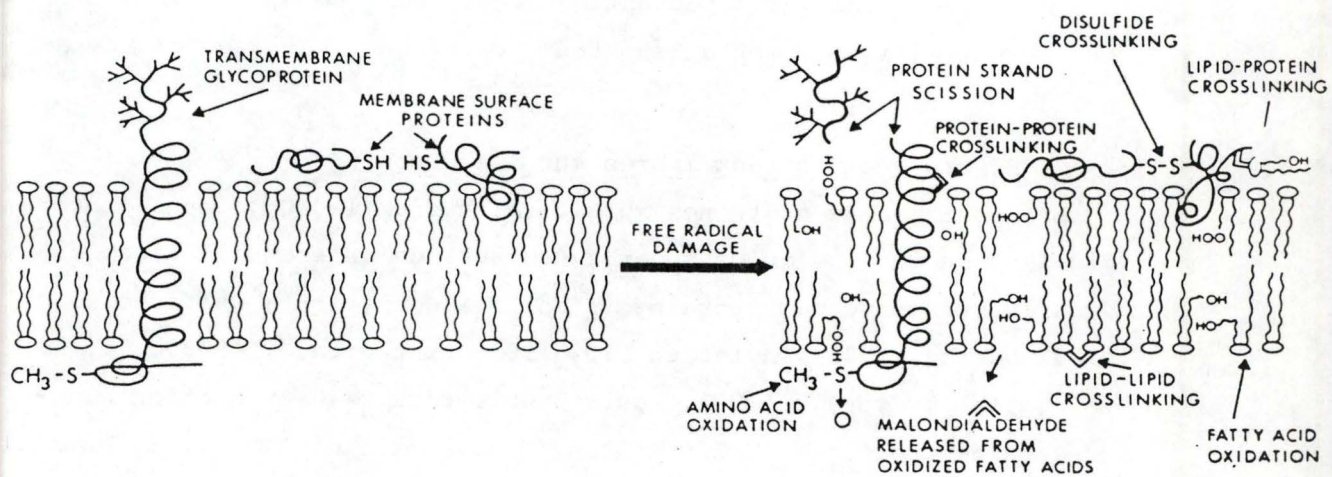


Fig. 16. Effet des dérivés actifs de l'oxygène sur la membrane plasmique

### 3. Interactions entre les intermédiaires de la peroxydation lipidique et les protéines.

Les peroxydes lipidiques peuvent réagir avec les protéines . Ces réactions peuvent mettre en cause les peroxydes lipidiques directement ou des aldéhydes générées pendant cette peroxydation lipidique. Il peut se produire des liaisons entre protéines, mais aussi des fragmentations de protéines. Les radicaux  $RO\cdot$  et  $ROO\cdot$  peuvent réagir avec les protéines qui sont intimement associées à ces lipides peroxydés (dans des membranes ou des lipoprotéines). La LDL semble bien illustrer ce phénomène : l'incubation des LDL avec des cellules endothéliales produit une modification de ces LDL de telle sorte que celles-ci sont plus rapidement dégradées par le récepteur "scavenger" des macrophages (Henriksen et al., 1981).

La modification de ces LDL semble être due à des peroxydations lipidiques dans ces LDL et semble être accompagnée d'une dégradation extensive des phospholipides et aussi de l'apolipoprotéine B-100 (Parthasarathy et al., 1985).

Cette fragmentation de l'apolipoprotéine B 100 lors des modifications oxydatives de la LDL, ne semble pas être médiée par des enzymes protéolytiques, mais semble plutôt être liée à une attaque oxydative sur la chaîne polypeptidique. (Fong et al., 1987).

### 4. Effet des radicaux libres sur la membrane plasmique

La membrane plasmique est fatalement le site critique où réagissent les radicaux libres produits dans l'environnement d'une cellule.

Les protéines transmembranaires et les acides gras insaturés sont susceptibles à la dégradation par les radicaux libres. Les protéines et les glycoprotéines déployées à l'extérieur de la cellule sont probablement les premières cibles, et des modifications citées dans les points 1,2 et 3 peuvent s'y produire.

Parallèlement, l'augmentation de la perméabilité membranaire causée par la peroxydation lipidique ou l'oxydation des protéines peut provoquer une perturbation des gradients ioniques transmembranaires, la perte de la fonction de sécrétion et l'inhibition de nombreux processus métaboliques cellulaires. (Freeman & Crapo, 1982) (Fig. 16).

### C. Radicaux libres et cellules endothéliales

A cause de sa constante exposition aux composants du sang, incluant

les prooxydants, l'endothélium constitue une cible aux stress oxydatifs et aux réactions médiées par les radicaux libres (Hennig & Chow, 1988). Les dérivés actifs de l'oxygène peuvent être produits à proximité des cellules endothéliales lors de la reperfusion d'organes ischémiés (Mc Cord, 1985) ou lors de la poussée respiratoire de neutrophiles activés (Hoover & Karnovski, 1984; Slater, 1984).

Les effets des radicaux libres sur la cellule endothéliale se situe à différents niveaux :

a. Lyse des cellules endothéliales

La lyse des cellules endothéliales en présence de dérivés actifs de l'oxygène a été abondamment illustrée (Weiss et al., 1981; Harlan et al., 1981; Shingu et al., 1985). Il faut généralement attendre 3 à 4 heures d'oxydation avant d'observer la lyse en masse des cellules endothéliales. Des incubations plus courtes ont révélé des perturbations dans la fonction des cellules endothéliales.

b. Modification de l'organisation membranaire des cellules endothéliales lors d'un stress oxydatif

Ces modifications consistent en :

- une augmentation de la fluidité membranaire (Freeman et al., 1985).
- une altération de la fonction de barrière endothéliale (Shasby et al., 1985) c'est-à-dire, une augmentation de la perméabilité de l'endothélium.

La rétraction des cellules endothéliales en culture lors d'un stress oxydatif (Welsh et al., 1986) peut expliquer l'augmentation de perméabilité de l'endothélium.

Par ailleurs, la membrane plasmique des cellules endothéliales oxydées est probablement plus perméable au calcium (Shasby et al., 1985).

Cette augmentation de calcium peut activer des enzymes dont la phospholipase A<sub>2</sub>, et l'on peut s'attendre aussi à une modification de la membrane plasmique suite à cette activation (Starke et al., 1986).

c. Modifications dans l'ultrastructure des cellules endothéliales

- Les cellules endothéliales incubées avec des dérivés actifs de l'oxygène présentent des boursoufflures au niveau de la membrane plasmique. (Niwa et al., 1982). Des structures tubulaires intracytoplasmiques, situées à proximité de la membrane plasmique des cellules oxydées sont souvent associées à ces boursoufflures qui peuvent se

détacher de la cellule endothéliale (Shasby et al., 1985).

- Les mitochondries montrent des crêtes dilatées, puis une matrice condensée lorsque les cellules sont oxydées plus longtemps.

- Le réticulum endoplasmique rugueux apparaît vésiculeux et gonflé.

- On observe aussi une dilatation des citernes du dictyosome (Thibaut et al., 1988).

#### D. Effet des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des cellules endothéliales

L'endocytose spécifique des LDL par les cellules endothéliales en culture soumises à un stress oxydant a été étudiée récemment (Poumay & Ronveaux-Dupal, 1988). Il résulte de ces études que, dans ces conditions, l'endocytose spécifique des LDL est diminuée de manière significative.

Après un temps de réaction de 120 minutes avec les dérivés actifs de l'oxygène, la liaison de haute affinité est diminuée de manière significative (+ ou - 70%).

La diminution de la liaison des LDL à leurs récepteurs lors d'un stress oxydant traduit soit une réduction du nombre de sites de liaison, soit une diminution de l'accessibilité de ces sites. Cette dernière possibilité résulterait de modifications morphologiques des cellules incubées avec les dérivés actifs de l'oxygène; mais de telles modifications semblent rapidement réversibles quand les cellules subissent un temps d'oxydation court (120 minutes) (Poumay, 1988).

En conséquence, une réduction du nombre de sites de liaison, donc du nombre de récepteurs, ou une altération de leur fonction pourrait probablement expliquer une diminution de la liaison des LDL aux cellules endothéliales lors d'un stress oxydatif.

Autrement dit, lors de ce stress, la protéine essentiellement extracellulaire et membranaire qu'est le récepteur des LDL pourrait être altérée selon l'un ou l'autre mécanisme décrit ci-avant.

## VI. BUT DU MEMOIRE

Nous avons vu, dans cette introduction, qu'un taux élevé de cholestérol est un des facteurs majeurs responsables des phénomènes athérogènes. Cependant, la présence d'un taux sanguin élevé en cholestérol n'est pas suffisante pour expliquer le développement focal de l'athérosclérose. D'autres causes impliquées dans les mécanismes athérogènes (notamment les radicaux libres) ont été recherchées.

L'action des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des LDL a été étudiée et il semblerait que la liaison des LDL à leurs récepteurs soit inhibée de manière significative, ce qui pourrait impliquer une modification des récepteurs LDL dans ces conditions.

S'il était possible de démontrer formellement une telle modification in vitro, cela pourrait signifier que localement, in vivo (dans une zone de production de dérivés actifs de l'oxygène ou dans le site d'une réaction inflammatoire), on pourrait retrouver une situation analogue à la déficience héréditaire où le récepteur fait défaut ou est non fonctionnel; c'est-à-dire l'hypercholestérolémie familiale, mais dans ce cas chez des personnes totalement saines. Cette observation aurait alors le mérite d'établir un lien formel entre le grand nombre de personnes souffrant des conséquences de l'athérosclérose et le petit nombre des hypercholestérolémiques familiaux.

Pour montrer une telle modification, nous avons choisi de solubiliser les protéines membranaires après avoir incubé les cellules endothéliales en présence de dérivés actifs de l'oxygène. Ces protéines membranaires vont être séparées par migration électrophorétique et vont être transférées sur une membrane de nitrocellulose avant de détecter le récepteur.

**MATERIEL**

**ET**

**METHODES**

## I. MISE EN CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES

### A. Mise en culture

Les cellules endothéliales de la veine ombilicale sont mises en culture selon la méthode de Jaffé (Jaffé et al, 1973).

Les cordons sont prélevés immédiatement après l'accouchement et placés à 4°C dans un tampon appelé "Cord Buffer" (140 mM NaCl - 4 mM KCl - 11 mM D-glucose - tampon phosphate 1 mM pH 7,4).

Un délai minimum de 4 heures entre le prélèvement et la mise en culture permet d'augmenter les pourcentages de réussite des cultures (étant considérés comme l'arrivée à confluence de cellules d'un cordon ombilical mises en culture 3-4 jours plus tôt dans une boîte de 60 mm de diamètre) (Balconi et al, 1983). Le délai donnant un rendement optimal (>85% de réussite) va de 1 à 4 jours de stockage avant la mise en culture. (Poumay, 1988). Les parties du cordon présentant des marques visibles de pince sont éliminées.

- Des boîtes de Petri (Nunc, 60 mm) sont traitées à température ambiante, avant la mise en culture, avec de la gélatine (0,2% dans de l'eau bidistillée).

- La veine ombilicale est "canulée" avec un trocart et perfusée avec 20 ml de Cord Buffer afin d'éliminer le sang qu'elle contient. La veine est ensuite remplie de collagénase (Worthington, CLS 240 U/mg) 0,1% dans des PBS de Dulbecco et le cordon est incubé 20 minutes à 37°C.

- Après incubation, le contenu de la veine est récolté dans un tube de centrifugation à fond conique de 40 ml en verre siliconé. La veine est ensuite reperfusée avec 40 ml de Cord Buffer, recueillis dans le même tube qui est centrifugé à 1000 tours/minute pendant 5 minutes.

- Le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans 5 ml de milieu 199 (Flow Laboratories) contenant de la L-glutamine (Sigma, Saint-Louis, Grade III) 2 mM, de l'HEPES (acide N - 2 - hydroxyéthylpipérazine - N' - éthane sulphonique) 15 mM, des antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 µg/ml et Nystatin 25 U/ml) et additionné de 20% de sérum de veau nouveau né (Flow Laboratories).

- Le culot resuspendu est déposé dans une boîte de Pétri (60 mm) et celle-ci est alors incubée à 37°C sous une atmosphère humide composée de 95% d'air et de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### B. Changement de milieu

Le milieu de culture est changé le soir de la mise en culture et par après, tous les 2-3 jours.

#### C. Repiquage

Lorsque les cellules sont confluentes (elles forment alors une monocouche de cellules polygonales), les boîtes sont repiquées dans un rapport 1 à 3.

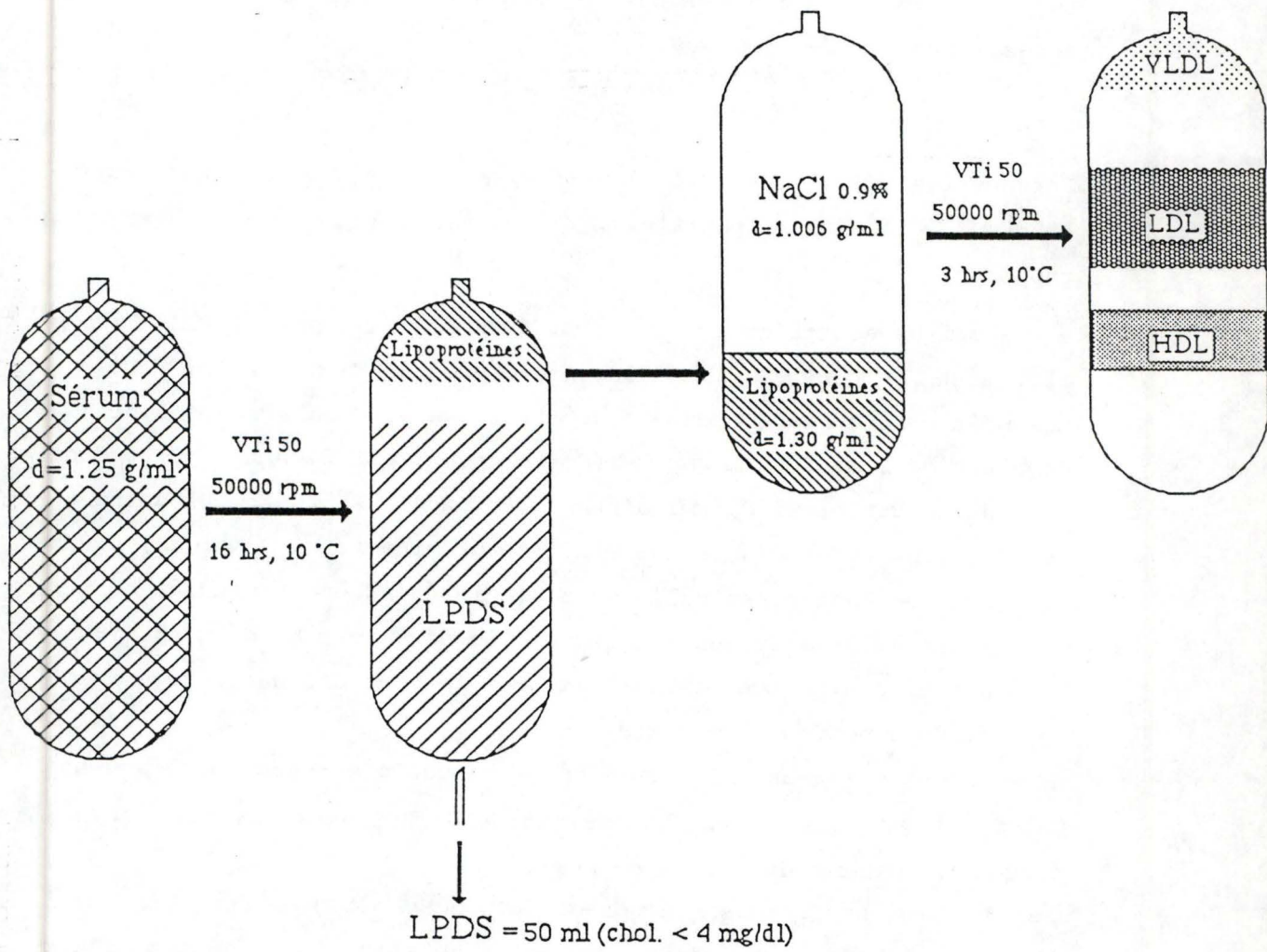
- Les boîtes sont rincées avec 4 ml d'un tampon appelé "HEPES Buffer" (137 mM NaCl- 4 mM KCl- 11mM Glucose - 10 mM HEPES pH 7,5).

Ces boîtes sont alors incubées 20 minutes à 37°C dans une solution composée de 2 ml de collagénase (Worthington, CLS 240U/mg), 0,2% dans de l'HEPES Buffer et de 2ml d'une solution de BSA (sérum albumine bovine) 0,5% et d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) 0,02%. En fin d'incubation, les cellules arrondies n'adhèrent plus au substrat de culture et la solution est recueillie dans un tube de centrifugation à fond conique en verre silicone : le tout est centrifugé à 1000 tours/minute pendant 5 minutes.

Le surnageant est aspiré. et le culot de cellule resuspendu dans un volume adéquat de milieu 199 additionné de 20% de sérum de veau nouveau né (milieu décrit ci-dessus).

Les cellules sont alors redéposées dans des boîtes de Pétri (Nunc) 60 mm préalablement traitées avec de la gélatine (0,2% dans de l'eau bidistillée) comme ci-dessus.





**Fig.1.** Représentation schématique du principe utilisé pour préparer le LPDS, concentrer les lipoprotéines et séparer les LDL.

## II. ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE ET DU SERUM DEFICIENT EN LIPOPROTEINES

---

### A. Isolement proprement dit

Nous avons utilisé la méthode de Poumay & Ronveaux-Dupal (1985).

- Un volume de 80 ml de sérum ABO poolé, fraîchement récolté par le centre de transfusion de la Croix-Rouge, est centrifugé à 1000 tours/minute pendant 5 minutes afin d'éliminer les cellules et caillots encore présents.

- On ajoute au sérum un volume adéquat de BHT (hydroxytolnène butylé) (Merck) 10 mM dans de l'éthanol 90°, pour obtenir une concentration finale de 10  $\mu$ M, afin de protéger les lipoprotéines de l'oxydation de leurs constituants.

- Le sérum est alors ajusté à la densité de 1,25 g/ml avec du KBr solide et réparti dans 2 tubes de centrifugation (Beckman, "QuickSeal", 25 x 89 mm) d'un volume de 40 ml chacun. La densité 1,25 g/ml est supérieure à la densité des lipoprotéines et inférieure à celle des autres protéines sériques.

- Les 2 tubes sont scellés, puis placés dans un rotor vertical Beckman VTI50 et centrifugés pendant 16 heures à 5000 tours/minute à 10°C dans une ultracentrifugeuse Beckman L5-65. Le frein est coupé en fin de décélération à 2000 tours/minute, de manière à permettre la rééquilibration lente des couches ainsi obtenues.

- Le sommet des tubes est ensuite découpé avec un scalpel et la couche supérieure, jaune-orange, est prélevée grâce à une pipette pasteur à extrémité rétrécie.

Cette couche, correspondant aux lipoprotéines, est séparée des autres protéines du sérum par une zone claire.

- Les lipoprotéines des deux tubes sont ajustées à la densité 1,30 g/ml avec du KBr solide.

- On dépose 30 ml de NaCl 0,9% dans un tube de centrifugation Quick Seal et la solution de lipoprotéines (10 ml) est injectée sous cette

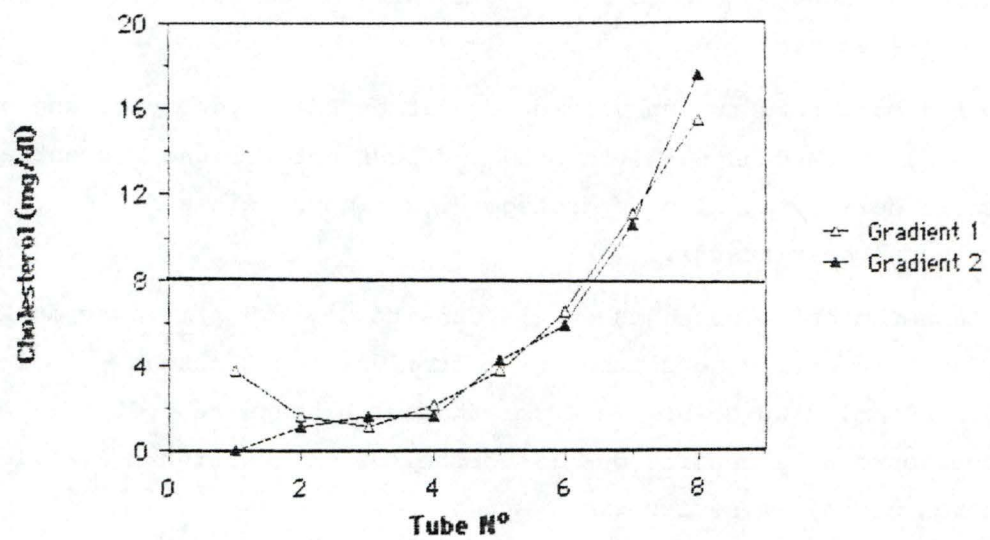


Fig. 2 Concentration en cholestérol dans les fractions du gradient du LPDS.

couche au moyen d'une seringue prolongée par un fin tuyau, formant ainsi un gradient à 2 couches.

- La centrifugation est effectuée comme ci-dessus pendant 180 minutes, mais le dispositif d'accélération ralentie est branché, de manière à ne pas perturber le gradient au départ de la centrifugation.

- A la fin de la centrifugation, les VLDL, LDL et HDL sont nettement séparées (Fig.1), et les LDL sont récupérées à l'aide de pipettes Pasteur à bouts rétrécis, utilisées pour fractionner le gradient.

### B. Dosage des LDL

Les LDL récupérées sont d'abord dialysées contre une solution contenant du NaCl 137 mM, du Tris 10 mM, de l'EDTA 0,01% et du BHT  $10^{-6}$  M pH 7,4.

On procède alors, au minimum, à 5 changements de ce tampon de dialyse. Les LDL sont ensuite filtrées sur un millex 0,22  $\mu$ m; leur concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Lowry et al. (1951).

L'étalon utilisé est la BSA (sérum albumine bovine).

Les LDL se conservent pendant 3 semaines à 1 mois à 4°C.

### C. Préparation du sérum déficient en lipoprotéines (LPDS)

#### 1. Fractionnement du sérum déficient en lipoprotéines

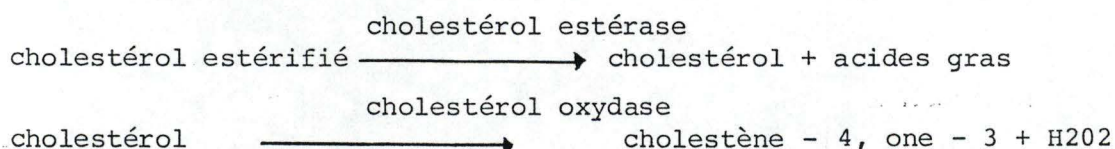
Après la première centrifugation, le fond de chacun des 2 tubes sont percés, au moyen d'une aiguille hypodermique, et le contenu est recueilli en aliquots de 3 ml environ.

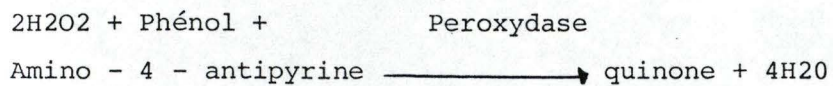
Le contenu en cholestérol est déterminé afin de retenir les fractions les plus dépourvues en cholestérol, pour former le LPDS. (Fig.2).

#### 2. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol s'effectue selon la méthode de Allain et al. (1974) et est réalisé avec un kit enzymatique liquide stable (Analis).

Le dosage s'effectue selon les réactions suivantes :





Les aliquots présentant une concentration en cholestérol inférieure à 8 mg/dl sont rassemblés et dialysés contre du PBS de Dulbecco ou une solution de NaCl 0,9%.

Nous obtenons alors une concentration finale de cholestérol inférieure à 4 mg/dl (Goldstein et al, 1983).

### III. COUPLAGE DE LDL A L'OR COLLOÏDAL

#### A. Préparation de l'or colloïdal

L'or colloïdal est préparé selon la méthode de Handley et al (1981); modifiée par De Mey (1986)..

##### 1. Or colloïdal de 17 nm

La vaisselle utilisée pour cette préparation doit être ultrapropre.

- On prépare une solution stock d'acide tétrachloroaurique (Merck) à 4,12% dans de l'eau bidistillée (1 gr. d' $\text{HAuCl}_4$  hydraté + 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Cette solution, stockée à 4°C, peut-être diluée pour former la solution stock définitive ( $\text{HAuCl}_4$  à 1%).

La préparation de l'or colloïdal se fait dans un erlenmeyer de verre surmonté d'une colonne de refroidissement. La vaisselle de verre est rincée une dernière fois avant utilisation en portant à ébullition de l'eau bidistillée avec une barre magnétique recouverte de téflon. L'eau est ensuite écartée; on place alors dans l'erlenmeyer une solution d'acide tétrachloroaurique (3 ml d' $\text{HAuCl}_4$  portés à 240 ml avec de l'eau bidistillée) que l'on porte à ébullition. La vitesse d'agitation est alors augmentée et on ajoute une solution réductrice préparée le jour même et composée de :

- 12 ml de citrate de sodium 1% filtrée sur Millex 0,22  $\mu\text{m}$ .
- 30  $\mu\text{l}$  d'acide tannique 1% (Mallinckrodt, spécial pour la microscopie électronique)
- 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  25mM.

Cette solution réductrice est portée à 60 ml avec de l'eau bidistillée avant de l'ajouter aux 240 ml de la solution d' $\text{HAuCl}_4$ .

Lors de sa réduction, la solution d' $\text{HAuCl}_4$  va foncer avant de devenir rouge-orangée; l'ensemble est alors chauffé à reflux pendant 30 minutes supplémentaires. Après avoir laissé refroidir 30 minutes la solution à la  $T^\circ$  de la pièce, on peut la stocker à 4°C dans une bouteille stérile, de préférence à l'abri de la lumière. Cette solution reste valable au minimum un à deux mois à cette température.

On dispose ainsi de 300 ml d'une solution contenant des particules d'or colloïdal d'un diamètre moyen d'environ 17 nm.

##### 2. Or colloïdal de 5 nm.

L'or colloïdal de 5 nm est préparé de manière identique à l'or col-

loïdal de 17 nm, seule la solution réductrice est différente :

- 12 ml de citrate de sodium 1%
- 3ml d'acide taunique 1%
- 3 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25mM, le tout porté à 60 ml avec H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

## B. Préparation du conjugué LDL - or colloïdal

### 1. Conjugué LDL - or colloïdal (17 nm)

#### a. Etablissement d'une courbe isotherme

La quantité minimale de protéines nécessaire pour protéger l'or colloïdal de la flocculation provoquée par les électrolytes peut-être déterminée en établissant une isotherme à concentration variable (De Mey, 1986).

La flocculation des particules d'or colloïdal augmente l'absorbance de la solution, ce qui permet de détecter la quantité minimale de protéines nécessaires pour protéger de cette flocculation :

- on prépare diverses dilutions de la solution de LDL.
- On prélève 100  $\mu$ l de chacune de ces dilutions et on les mélange à 1 ml de la solution d'or colloïdal.
- Après 2 minutes, on ajoute 200  $\mu$ l d'une solution de NaCl 10% (Poids/Volume) et le tube est mélangé au vortex.
- Après 5 minutes, l'absorbance est déterminée à 580nm et rapportée à la concentration en protéines de la solution.

#### b. Préparation du conjugué

La conjugaison est réalisée par petits volumes, qui sont ensuite rassemblés, ce qui permet d'augmenter le rendement (Handley et al, 1981).

- On dilue les LDL de manière à avoir une concentration suffisamment élevée pour stabiliser les particules d'or colloïdal : dans notre cas 2 mgr de protéines/ml (Cfr. la courbe isothermique à concentration variable).
- 50  $\mu$ l de cette solution de LDL (100  $\mu$ g de protéines) sont portés à 500  $\mu$ l avec H<sub>2</sub>O bidistillée dans 40 tubes à essai.
- Aux 500  $\mu$ l de chaque tube, on ajoute rapidement 5 ml de la solution d'or colloïdal et on laisse la solution reposer pendant 5 minutes.
- On rassemble alors le contenu de 5 tubes à essai dans un tube de centrifugation en polycarbonate (Nalgene) adapté au rotor Beckman

JA 20.

- On injecte 7,5 ml de saccharose 35% sous la solution de conjugué à l'aide d'une seringue prolongée d'un fin tuyau.

- Les 8 tubes sont centrifugés à 7500 tours/minute pendant 30 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Beckman J21 (Rotor Beckman JA20). Ceci permet de concentrer et de purifier le conjugué puisque seul celui-ci va traverser la couche de saccharose, l'excès de LDL restant dans le surnageant.

- On laisse reposer les tubes pendant environ une heure à 4°C en position verticale de manière à ce que le culot redescende dans le fond du tube. Le culot est dialysé pendant une nuit contre un tampon TRIS-HCl (TRIS 60 mM - NaCl 25 mM - CaCl<sub>2</sub> 2mM pH8).

- Le lendemain, le conjugué est filtré sur un Millex 0,22  $\mu$ m avant d'être utilisé. Le conjugué ne se conserve que 24 heures.

c. Observation du conjugué en microscopie électronique avec coloration négative.

Cette opération permet d'observer les LDL autour des particules d'or et peut servir à estimer le nombre de LDL couplées avec une particule d'or colloïdal. (17 nm).

- A l'aide d'un évaporateur Edwards, on dépose, sous vide, une fine couche de carbone sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de Formvar (Merck).

- On dépose une goutte de conjugué sur cette grille. Après 20 à 30 secondes, l'excès de liquide est aspiré au moyen d'un papier filtre, en veillant à ne pas laisser sécher totalement la surface.

- On dépose alors sur cette grille une goutte de phosphotungstate de potassium 2% pH 6,3. L'excès de colorant est de nouveau absorbé, après 20 à 30 secondes, à l'aide d'un papier filtre.

- Après avoir laissé sécher la grille à l'air, on observe au microscope électronique Philips EM 301 à 60 KV.

- On peut de la même manière observer une solution de LDL ainsi qu'une solution d'or colloïdal; pour cette dernière solution, on ne dépose pas de colorant sur la grille.



## 2. Conjugué LDL - or colloïdal (5nm)

Les LDL, même à concentration très élevée, ne parviennent pas à stabiliser le conjugué LDL - or colloïdal (5nm).

Par contre, pour de si petites particules d'or colloïdal, on peut ajouter un stabilisateur : l'albumine de sérum bovin (BSA) permettant d'obtenir un conjugué parfaitement stable.

On procède de la même manière que pour le conjugué LDL - or colloïdal (17 nm), mais après l'ajout des 5 ml d'or colloïdal (5nm) dans chacun des 40 tubes à essai on ajoute, après 5 minutes, 60  $\mu$ l de BSA 10%.

On rassemble le contenu de 5 tubes à essai dans un tube de centrifugation en polycarbonate (Nalgene) adapté au rotor Beckman JA 20.

On injecte 7,5 ml de saccharose 20% sous le conjugué et les tubes sont centrifugés à 10000 tours/minute pendant 30 minutes. Le culot est récupéré comme décrit ci-dessus et dialysé contre le même tampon (TRIS - HCl).

#### IV. SOLUBILISATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES

---

Avant de solubiliser les protéines, on stimule la synthèse de récepteur grâce à l'incubation des cellules dans le LPDS :

les boîtes de cellules sont rincées une fois avec 2 ml d'HEPES buffer, puis on incube les cellules dans du milieu 199 contenant du LPDS (10%) pendant 48 heures.

##### A. Première méthode : solubilisation directe

C'est une méthode modifiée d'après Friedman et al (1987).

Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS de Dulbecco et on ajoute, pour 3 boîtes de culture 60 mm, issues d'un premier repiquage, 0,1 ml du tampon de solubilisation suivant :

HEPES	10 mM pH 7,4
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
NaCl	200 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
PMSF	1 mM

Triton X-100 1,5% (Volume/Volume).

C'est-à-dire : on ajoute 0,1 ml de ce tampon dans la première boîte, on la racle, le contenu est transvasé dans la seconde et ainsi de suite jusqu'à la troisième boîte. On solubilise 3 boîtes à la fois afin de ne pas trop diluer les protéines.

Les cellules solubilisées sont "poolées" dans des eppendorfs.

Ces derniers seront centrifugés à 4°C, pendant 60 minutes, dans le rotor 40-3 à 39000 tours/minute, flottant dans des tubes Kontron remplis de 7 ml d'eau.

Les surnageants seront "poolés" et stockés à -20°C.

Les surnageants peuvent être concentrés grâce à une membrane d'ultrafiltration (Centricon).

##### B. Deuxième méthode : solubilisation en présence d'urée.

Nous nous sommes inspirés de la méthode de Daniel et al.(1983).

- On dispose au minimum de 2 x 8 boîtes de Pétri confluentes (60 mm) issues d'un seul repiquage. Ces boîtes sont rincées avec du PBS de Dulbecco.

- Par boîte, on ajoute 1,5 ml du même tampon. Les cellules sont

raclées dans ce tampon et "poolées" dans 2 tubes de centrifugation à fond conique.

- Ces derniers sont centrifugés à 1000 tours/minute pendant 5 minutes afin d'obtenir un culot de cellules.

- A ces culots, on ajoute 0,3 ml d'une solution contenant de l'urée 5 M et du PMSF ( phénylméthyl sylfonylfluoride) 1,5 mM. Le tout subit alors 10 passages avec une seringue de 1 ml prolongée d'une aiguille 21 G, pour éclater les cellules.

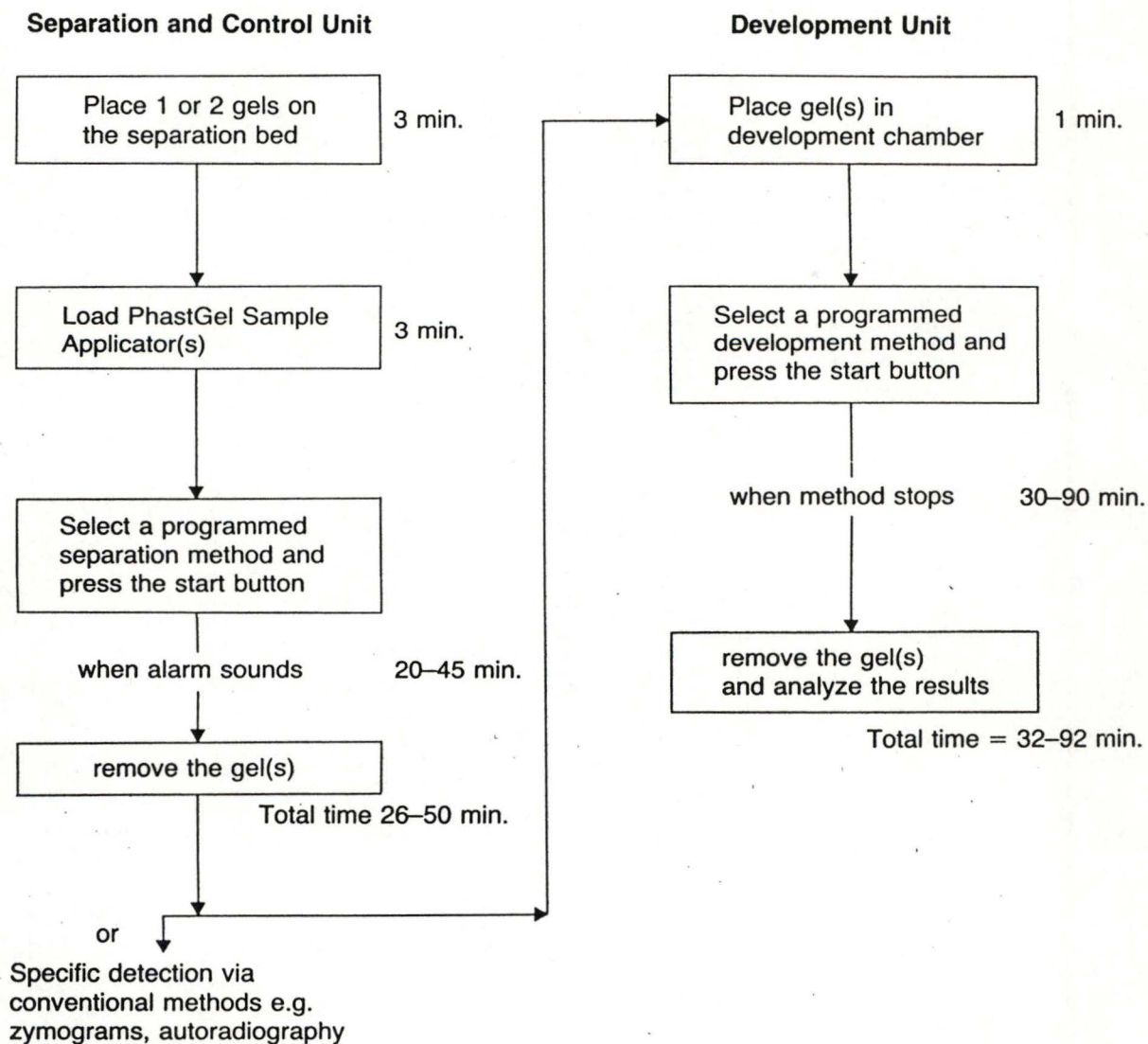
- Chaque homogénat est récupéré dans un eppendorf de 0,5 ml. Les eppendorfs, flottant dans des tubes Kontron, adaptés au rotor 40 et remplis de 8 ml d'eau, sont alors centrifugés à 4°C, pendant 60 minutes, dans ce rotor à 40000 tours/minute.

- Cette étape, non effectuée par Daniel et al, sert à obtenir un culot principalement constitué de membranes.

- A la fin de cette centrifugation, les surnageants sont écartés, et on ajoute au culot 0,2 ml d'une solution contenant de l'urée 5 M, du PMSF 1,5 mM et du Triton X-100 1,6% (Volume/Volume). Le tout subit de nouveau une dizaine de passages avec une seringue de 1 ml prolongée d'une aiguille 21G.

- Les eppendorfs sont toujours placés dans des tubes Kontron et subissent la même centrifugation. Les surnageants se conservent à 4°C et sont prêts à être utilisés.

## Flow diagram for PhastSystem



The time intervals listed above will depend on the technique that is run.

V. ELECTROPHORESE SUR SDS - PAGE ET TRANSFERT SUR MEMBRANE  
DE NITROCELLULOSE

---

A. Electrophorèse

1. Le Phast System

Le Phast System TM (pharmacia) consiste en une unité de séparation et de contrôle, et une unité de développement.

Le schéma ci-contre illustre les étapes du Phast System impliquées dans la séparation des protéines et dans le développement de gel.

L'unité de séparation et de contrôle contient le microprocesseur qui contrôle à la fois les étapes de séparation et de développement, selon une méthode programmée par l'expérimentateur.

La durée de chaque étape de la méthode est mesurée en Volts heures. Puisque le voltage change continuellement, l'unité est équipée d'un intégrateur de volts avec le temps.

La migration se poursuit horizontalement.

2. Les gels utilisés.

Les gels utilisés sont des gels prêts à l'emploi, en polyacrylamide et sont utilisés en conjonction avec les "buffer strips" (bandes de tampon). Ces derniers sont en agarose IEF et ont été coulés avec le tampon de migration. Les buffer strips servent comme réservoir de tampons pour générer un système de tampon discontinu dans le gel.

Deux bandes de tampon sont utilisées pour chaque gel, un à la cathode, un à l'anode.

Il y a deux types de gel différents : les gels homogènes et les gels en gradient.

a. Le gel en gradient

Les gels ont une zone de stacking gel de 13 mm, et une zone de 32 mm de gel en gradient.

Les gels utilisés sont les gels 8 - 25, ils ont une zone de gel en gradient continu de 8 à 25% en polyacrylamide avec 2% de crosslinking (bisacrylamide).

Le système tampon dans le gel est composé de :

0,112 M acétate

0,112 M TRIS pH 6,4

Les Phast gels 8 - 25 donnent une relation linéaire entre la distance de migration et le logarithme des P.M. pour les P.M. de 6000 à 300000.

#### b. Les gels homogènes

Les gels ont une région de stacking gel de 13 mm et une zone de gel de séparation de 32 mm.

Le gel homogène utilisé est un gel 7,5, il contient une zone de gel de séparation de 7,5% en polyacrylamide et 2% de crosslinking (bisa-crylamide).

Le système tampon pour ces gels est le même que pour les gels en gradient.

Les P.M. des composants qui peuvent être séparés s'étalent de 30000 à 300000.

Les buffer strips sont en Agarose 2%, et le système tampon dans le phast gel buffer strip est composé de :

- 0,20 M tricine
- 0,20 M TRIS           pH 8,1
- 0,55 % SDS

#### 3. Méthode

L'électrophorèse se poursuit à une température de 15°C.

- On dépose quelques gouttes d'eau sur la surface thermostatée sur laquelle le gel sera déposé, afin d'établir un bon contact thermique.

- Les buffer strips sont posés sur leur support.

- Les échantillons sont déposés sur le gel grâce à un applicateur.

Nous avons utilisés 2 types d'applicateurs :

- le 8/05 possède 8 capillaires pouvant contenir 0,5  $\mu$ l chacun,
- le 6/4 possède 6 capillaires pouvant contenir 4  $\mu$ l chacun.

Nous utilisons comme étalon: le kit de calibration HMW (high molecular weight) (Pharmacia) contenant 5 protéines dont les P.M. s'étalent de 53000 à 212000:

1. 53000 Glutamate Déshydrogénase
2. 76000 Transferrine
3. 116000 B-Galactosidase
4. 170000  $\alpha$  2-Macroglobuline
5. 212000 Myosine

Une fois que l'applicateur est chargé de ses échantillons, il est placé au-dessus du gel, dans l'encoche lui étant réservée.

Méthode de séparation optimale pour les phast gels gradient 8-25

(SDS PAGE)

Etape 1	250 V	10 mA	3 W	15°C	65 Vh
Etape 2	50 V	1 mA	0,5 W	15°C	0 Vh

Méthode de séparation pour les phast gels homogènes 7,5 (SDS PAGE)

Etape 1	250 V	10 mA	3 W	15°C	1 Vh
Etape 2	250 V	1 mA	3 W	15°C	1 Vh
Etape 3	250 V	10 mA	3 W	15°C	60 Vh

Une fois ces opérations terminées, on peut démarrer la méthode de séparation que l'on a programmée : les méthodes de séparation optimales sont indiquées dans le tableau ci-dessus.

Le principe de la séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été décrit par Weber et Osborn (1978).

Après migration, le gel est soit coloré par les techniques de coloration par le bleu de Coomassie R250 ou par la coloration à l'argent; soit il est détaché de son support plastique pour subir un "blotting" des protéines vers une membrane de nitrocellulose 0,45  $\mu$ m (Millipore).

## B. Coloration du gel

A la fin de la migration, le gel est placé dans la chambre de développement. Une pompe sert à connecter la chambre de développement avec les diverses solutions utilisées pour la coloration.

### 1. Coloration au bleu de Coomassie

Une pastille Phast gel blue R (Bleu de Coomassie R) (Pharmacia) est dissoute dans 80 ml d'eau bidistillée, et 120 ml de méthanol. Cette solution constitue la solution stock pouvant être conservée à 4°C. Juste avant utilisation, on filtre la solution avant de lui ajouter 1 volume équivalent d'acide acétique 20% (dans de l'eau bidistillée). Le gel est incubé dans cette solution pendant 8 minutes à 50°C. Le gel est ensuite rincé 3 fois (5 minutes, 8 minutes et 10 minutes) dans une solution de décoloration composée de méthanol 30%, d'acide acétique 10% et d'eau bidistillée (dans les proportions 3 : 1 : 6). Les rincages se font toujours à 50°C. Le gel est finalement incubé 5 minutes à 50°C avec une solution de préservation qui varie selon le type de gel : pour les gels en gradient elle est composée de glycérol 10% et d'acide acétique 10% dans de l'eau bidistillée, tandis que pour les gels homogènes elle est composée de glycérol 2,5% et d'acide acétique 10%.

### 2. Coloration à l'argent

La technique de coloration à l'argent est dérivée de la méthode de Henkeshoven & Dernick (1985)

Les solutions sont préparées dans de l'eau bidistillée (Milli-Q<sup>®</sup>).

Le gel est d'abord rincé pendant 2 minutes, à 50°C, dans une solution contenant de l'éthanol 50% et de l'acide acétique 10%, avant d'être



incubé dans la solution de fixation : glutaraldéhyde 8,3% (préparée d'une part de solution de glutaraldéhyde 25% (Fuca) et de 2 parts d'eau bidistillée) pendant 6 minutes à 50°C.

Le gel subit ensuite 2 lavages, de 2 minutes chacun, à l'eau bidistillée et à une température de 50°C.

Le gel est alors incubé pendant 19 minutes, à 40°C, dans une solution de nitrate d'argent 0,25%. Le gel subit encore deux lavages de 0,5 minute à 30°C, à l'eau bidistillée avant d'être incubé dans la solution de développement préparée extemporanément comme suit : 40 ml de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 12,5%, 160 ml d'eau bidistillée et 80  $\mu\text{l}$  d'une solution aqueuse de formaldéhyde 37%.

On procède à 2 incubations : une de 0,5 minutes et une de 4 minutes, à 30°C.

Le gel est finalement rincé avec une solution d'arrêt de développement composé d'acide acétique à 5% pendant 2 minutes à 50°C avant d'être incubé dans une solution de préservation du gel comme décrit ci-dessus.

### C. Transfert sur nitrocellulose

L'électrotransfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose a d'abord été décrite par Towbin en 1979.

Nous utilisons le système Novablot qui est une unité pour les transferts horizontaux en semi-sec.

La technique des transferts en semi-sec ne demande que des papiers-filtres imbibés des tampons de transfert comme réservoir de tampon.

L'entièreté du courant électrique passant par le gel, le transfert est accéléré et les courants appliqués étant plus faibles que dans un système de transfert classique, aucune réfrigération n'est nécessaire.

- La membrane de nitrocellulose est équilibrée dans un tampon de transfert :

glycine . 150 mM

TRIS . 20 mM

méthanol . 20 %

- Le gel est équilibré dans le même tampon, puis détaché de son support en passant un fin fil métallique entre le gel et son support.

- Les électrodes de graphite sont mouillées avec de l'eau bidistillée dont l'excès est absorbé.

- Le gel est accolé à la membrane de nitrocellulose. Ceux-ci sont placés entre 2 couches de 9 papiers-filtres (Munktell, grade 1F) imbibés

des tampons de transfert.

Le transfert est effectué par un courant de 0,8 mA par cm<sup>2</sup> de gel, appliqué pendant 60 minutes.

## VI. REVELATION DU RECEPTEUR

---

### A. Méthode du ligand

#### 1. Dosage du conjugué

Le conjugué LDL-OR colloïdal 17nm a été préparé la veille et est dosé le jour de l'expérience. Le dosage est effectué selon la méthode de Lowry et al, en 1951; mais ici, on tient compte de l'absorbance due aux particules d'or.

#### 2. Révélation de l'étalon

Quand le transfert est terminé, on découpe la portion de membrane correspondant à l'étalon qui peut être révélé de 2 manières différentes :

##### a. Coloration à l'Amido Schwartz (Roach et al, 1987)

- L'étalon est placé, pendant 3 minutes, dans la solution de coloration suivante :

amido schwartz	1%
méthanol	45%
acide acétique	10%
eau bidistillée	44%

- L'étalon est ensuite rincé 3 fois pendant 1 minute dans une solution de décoloration :

méthanol	90%
acide acétique	2%
eau bidistillée	8%

- L'étalon est ensuite séché entre 2 papiers-filtres après un rinçage à l'eau bidistillée.

##### b. Coloration à l'or colloïdal (Moeremans et al, 1986)

- L'étalon est placé 30 minutes à 37°C, dans un tampon PBS contenant 0,3% de TWEEN 20.

- La membrane contenant l'étalon est ensuite rincée 3 fois pendant 5 minutes dans la même solution à température ambiante.

- Elle est ensuite rincée abondamment à l'eau distillée avant d'être placée dans une solution d'or colloïdal 17 nm que l'on a porté à pH3 avec de l'acide citrique.

- L'étalon est incubé dans cette solution entre 2 et 4 heures, sous agitation constante, puis rincé à l'eau bidistillée avant d'être séché entre 2 papiers-filtres.

### 3. Révélation des échantillons

#### a. Milieux d'incubation

<u>A</u>	TRIS HCl	60 mM	pH 8	<u>B</u>	TRIS HCl	60 mM	pH 8
	NaCl	25 mM			NaCl	25 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM			EDTA	1 mM	
	BSA	40 mg/ml			BSA	40 mg/ml	
<u>C</u>	TRIS HCl	60 mM	pH 8	<u>D</u>	TRIS HCl	60 mM	pH 8
	NaCl	25 mM			NaCl	25 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM			EDTA	1 mM	
	BSA	20 mg/ml			BSA	20 mg/ml	
<u>E</u>	TRIS HCl	60 mM	pH 8	<u>F</u>	TRIS HCl	60 mM	pH 8
	NaCl	25 mM			NaCl	25 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM			CaCl <sub>2</sub>	2 mM	
	BSA	10 mg/ml			BSA	10 mg/ml	

Tampon citrate 20 mM pH 3,85 :

34,5 ml d'acide citrique 0,1 M

15,5 ml de citrate de Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 0,1 M

G on ajuste à pH 3,85

on porte à 250 ml.

Tampon citrate 1 M pH 3,85

14,5 ml d'acide citrique 2 M

9,12 ml de citrate de Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 2 M

H on ajuste à pH 3,85

on porte à 100 ml.

#### b. Méthode

- La membrane de NC est incubée pendant 30 minutes à 37°C dans un tampon de "quenching" A, ou, dans d'autres expériences, dans un tampon B.

- La membrane est ensuite incubée pendant 1 à 2 heures à température ambiante sous agitation constante avec le conjugué dans une solution C ou dans une solution D.

La concentration du conjugué varie d'une expérience à l'autre, mais se situe entre 80 µg/ml et 180 µg/ml.

Dans d'autres expériences, la membrane est incubée avec un excès de

LDL à 500  $\mu\text{g/ml}$  dans une solution C contenant le conjugué.

- La membrane est ensuite rincée 2 fois pendant 10 minutes sous agitation constante, dans un tampon E, ou, dans d'autres expériences, dans un tampon F.

- La membrane est ensuite rincée très délicatement, dans de l'eau bidistillée avant d'être placée dans une des 2 solutions de révélation:

. 1ère solution de révélation (photosensible) (Roach et al, 87) :

- la membrane est d'abord équilibrée dans un tampon G, pendant 10 minutes, sous agitation constante.

- La membrane est incubée, dans l'obscurité pendant + ou - 5 minutes, dans une solution de révélation suivante : 10 ml de tampon H, 7,5 ml d'hydroquinone 0,5 M, 7,5 ml d'AgNO<sub>3</sub> 40 mM et 25 ml d'eau bidistillée.

- La membrane est ensuite rincée copieusement à l'eau bidistillée, avant d'être séchée entre 2 papiers-filtres.

. 2ème solution de révélation (non photosensible)

Cette solution est fournie sous forme de kit (Inten SE BL) (Janssen).

On mélange juste avant emploi 1 volume égal d'un réactif amplificateur (Enhancer) et d'un réactif initiateur et on y dépose la membrane qui reste dans cette solution, sous agitation constante, entre 20 et 40 minutes.

## B. Méthode de l'Anticorps antirécepteur

1. L'étalon est révélé selon une des méthodes décrites précédemment.

2. les échantillons sont relevés comme suit :

- la membrane est incubée dans une solution 5% en albumine de sérum bovin (BSA) dans du PBS (10 mM, pH 7,4) :

0,8% NaCl

0,02% KCl

0,144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O

5% BSA

10 mM Na<sub>3</sub>N

pendant 30 minutes à 37°C.

- La membrane est ensuite rincée 3 fois pendant 5 minutes à température ambiante dans une solution 0,1% BSA dans du PBS (10 mM pH 7,4).

- La membrane est ensuite incubée, sous agitation constante, dans la solution du premier anticorps, pendant 2 heures : solution 0,1% BSA-PBS (10 mM, pH 7,4), on ajoute 1% (Volume/Volume) de sérum normal de

chèvre et 5% (Volume/Volume) du premier anticorps : l'antirécepteur R4, très aimablement offert par le Docteur C. Mazière. Cet anticorps a été réalisé et caractérisé par Goldstein et al (1989).

- La membrane est de nouveau rincée 3 fois pendant 5 minutes, sous agitation constante, dans une solution 0,1% BSA dans du PBS (10 mM, pH 7,4).
- La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anticorps de lapin) biotinylé, sous agitation constante, dans une solution : 0,1% BSA-PBS (10 mM, pH 7,4) contenant 2  $\mu$ g d'AC de chèvre biotinylé par ml de ce tampon.
- La membrane est encore rincée 3 fois pendant 5 minutes, sous agitation constante, dans la solution 0,1% BSA dans du PBS (10 mM, pH 7,4).
- La membrane est finalement incubée pendant 2 heures avec la streptavidine couplée à l'or colloïdal : la streptavidine est diluée 100 fois dans la solution 0,1% BSA-PBS (10 mM, pH 7,4) supplémentée par de la gélatine 1:20 (Volume/Volume).
- On procède de nouveau à 3 rinçages de la membrane pendant 5 minutes, sous agitation constante, dans la solution 0,1% BSA dans du PBS (10 mM, pH 7,4).
- La membrane est incubée, sous agitation constante, dans la solution de détection à l'argent décrite précédemment, pendant 20 à 40 minutes.
- La membrane est finalement rincée abondamment dans de l'eau bidistillée avant d'être séchée entre 2 papiers-filtres.

#### V. OXYDATION DES CELLULES

On dissout la Xanthine (500 M) dans le milieu de culture m 199.

Les boîtes sont rincées avec 1ml de ce milieu.

Les cellules contrôles sont incubées avec 3 ml du même milieu.

Pour les cellules tests on ajoute la Xanthine oxydase (10 mU/ml) dans ce milieu pour démarrer la production de dérivés actifs de l'oxygène.

Les cellules sont incubées, à température ambiante, pendant 120 min. dans leur milieu respectif avant d'être solubilisées.

**RESULTATS**

**ET**

**DISCUSSIONS**

## I. PRELIMINAIRES

---

La détection du récepteur dans les cellules endothéliales selon la méthode du ligand comporte plusieurs étapes à savoir :

- solubilisation des protéines des cellules endothéliales.
- Migration de ces protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.
- Transfert des protéines du gel sur membrane de NC.
- Détection du récepteur à l'aide du conjugué LDL - or colloïdal, après marquage des sites non spécifiques.
- Amplification du marquage grâce à une solution de révélation à l'argent.

Ce chapitre a pour but de montrer les différents problèmes et mises au point nécessaires à cette détection.

### A. Couplage LDL - or colloïdal (17nm)

#### 1. Résultats

##### a. Courbe isotherme à concentration variable en LDL.

La courbe isotherme à concentration variable en LDL nous montre que la concentration minimale de LDL nécessaire pour stabiliser les particules d'or de 17 nm est de 10  $\mu$ g de protéines de LDL par ml de solution d'or colloïdal. (Fig.1.1.).

Pour nous laisser une marge de sécurité, nous avons choisi, comme précédemment dans notre laboratoire, une concentration minimale de 20  $\mu$ g de protéines LDL pour la préparation du conjugué.

##### b. Observation du conjugué en coloration négative

L'observation des LDL en coloration négative nous révèle que ces lipoprotéines possèdent une taille relativement homogène et comparable à celle mentionnée dans la littérature (+ ou - 20 nm) (Fig.1.2.a). Les particules d'or possèdent également une taille relativement homogène.

En ce qui concerne le conjugué, le nombre de LDL liées par particules d'or colloïdal semble varier de 5 à 9 (en tenant compte des LDL se trouvant au-dessus et en-dessous des particules). (Fig.1.2.c.)



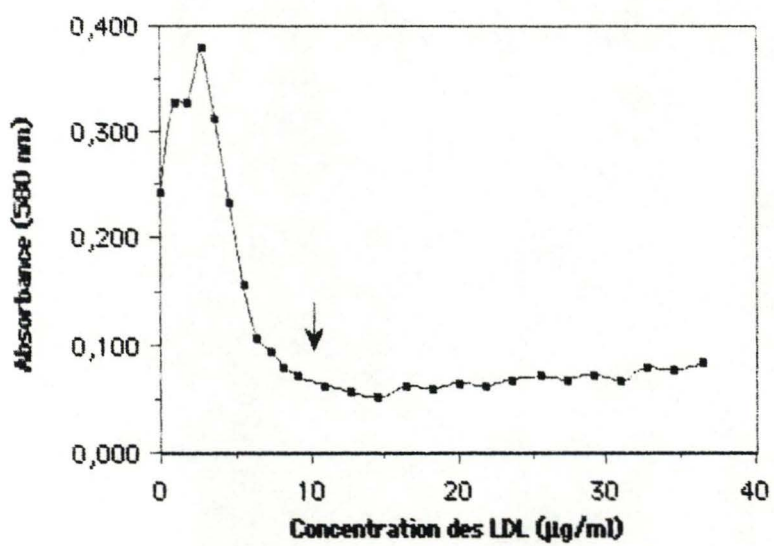
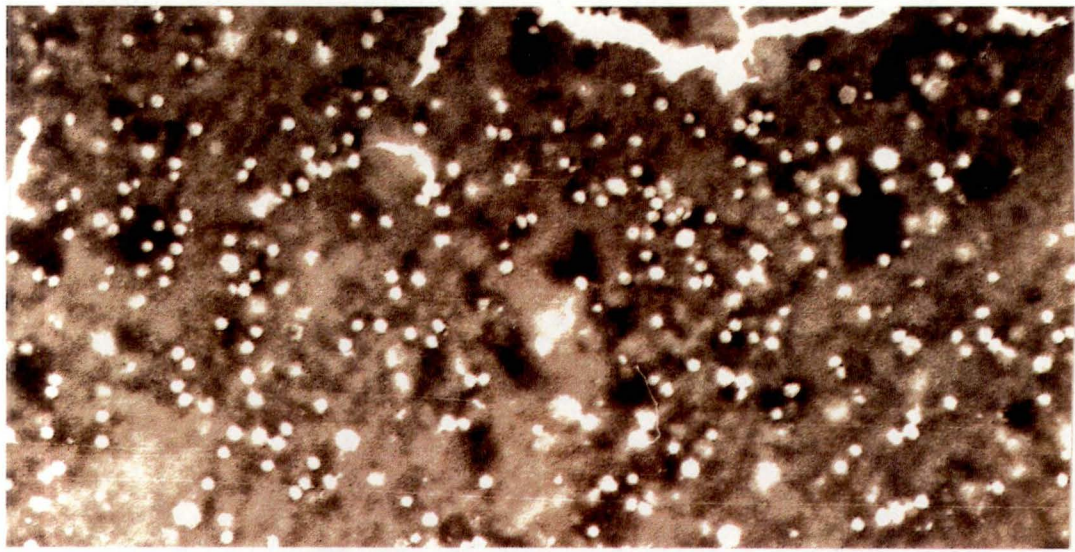


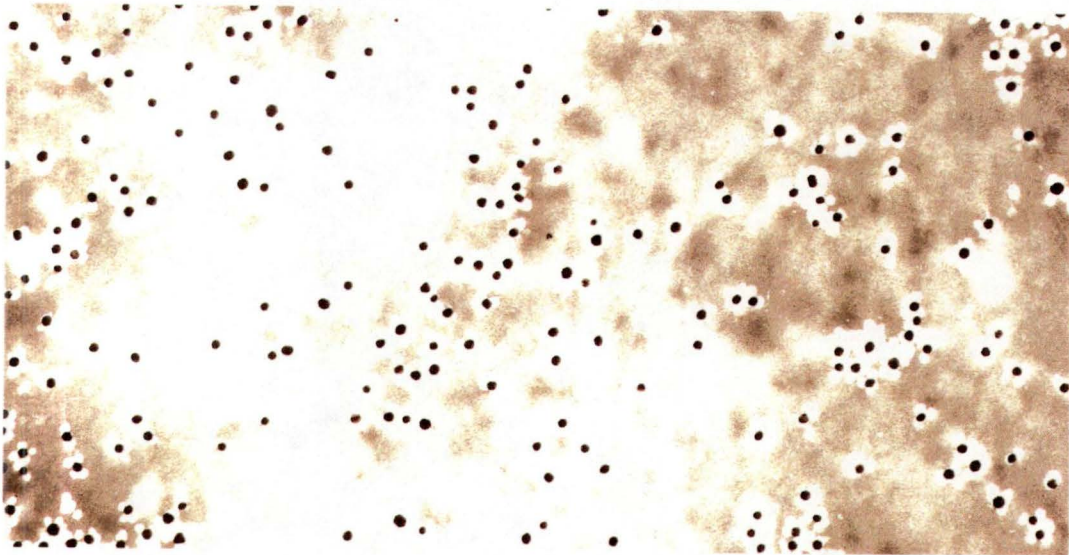
Fig. 1.1. Courbe isotherme à concentration variable en LDL.  
(Construite selon De Mey, 1986).



a



b



c

Fig. 1.2. Observation en coloration négative, au ME à transmission de  
a. LDL purifiées  
b. particules d'or de 17 nm  
c. conjugué LDL - or colloïdal

## 2. Commentaires

### a. Validité du conjugué

Le conjugué étant notre outil de travail principal, il nous a paru nécessaire de vérifier (ou plutôt de confirmer) la validité et les propriétés de celui-ci.

Il nous faut donc répondre affirmativement à ces questions :

- Les LDL sont-elles purifiées de manière satisfaisante ?
- Les particules d'or ont-elles un diamètre attendu et constant ?
- Le couplage LDL - or a-t-il été efficace ?

#### . Pureté des LDL

Pour isoler les LDL, nous avons suivi la méthode de Poumay & Ronveaux-Dupal (1985) (voir matériel et méthodes). Poumay avait isolé 3 classes de lipoprotéines : VLDL, LDL, et HDL; et pour chacune d'elles il avait vérifié leur homogénéité en négative staining et prouvé l'absence de contamination d'une classe de lipoprotéines par une autre, grâce, notamment, au contrôle des mobilités électrophorétiques des lipoprotéines sur gel d'agarose.

Nous avons également confirmé la pureté de nos LDL en négative staining et vérifié l'homogénéité de taille de ces lipoprotéines.

Cette technique, du fait de son rendement (+ ou - 8 ml de LDL purifiées à partir de 80 ml de sérum), s'avère être idéale pour séparer les LDL.

#### . Les particules d'or

Le diamètre des particules d'or est conditionné par la quantité du mélange réducteur que l'on ajoute lors de sa préparation (Handley et al., 1984). Plus on ajoute de cette solution, plus les particules seront petites. Dès lors, il semble facile d'ajuster la quantité de cette solution pour atteindre le diamètre voulu.

Les particules d'or, opaques aux électrons, sont particulièrement utilisées comme marqueurs en microscopie électronique. (Roth, 1983)

#### . Efficacité du couplage

Les particules d'or sont chargées négativement en surface par des ions hydroxydes et adsorbent, de ce fait, des macromolécules dont les protéines sans, pour autant, perdre leur activité.

L'adsorption se réalisant à des valeurs de pH proches du point

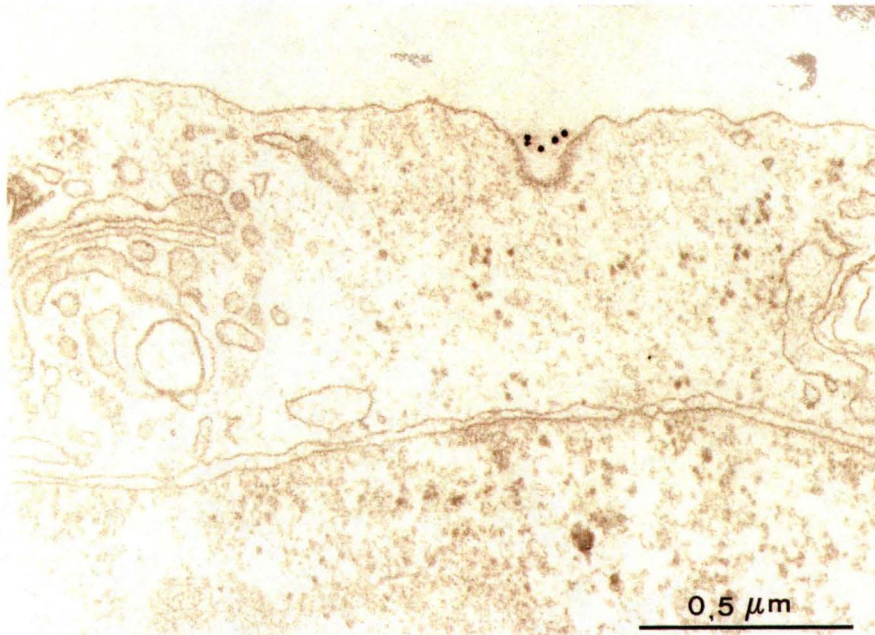


Fig. 1.3. Micrographies électroniques de cellules endothéliales en culture, incubée pendant 60 minutes, à 4°C, avec le conjugué LDL-or colloïdal (17 nm). (Poumay & Ronveaux-Dupal, soumis pour publication).

isoélectrique de ces protéines donne une liaison plus forte et plus stable (De Mey, 1986).

En ce qui concerne l'efficacité de notre couplage, nous remarquons que quelques particules d'or ne sont pas conjuguées aux LDL. (Fig.1.2.C), mais ces particules non conjuguées apparaissent dans des zones dépourvues de colorant. Il est donc fort probable que ces particules soient quand même conjuguées.

Contrairement à d'autres auteurs (Mommaas-Kienhus et al., 1985; Roach et al., 1987), nous n'avons pas observé de lipoprotéines isolées, celles-ci ayant été éliminées lors de la centrifugation sur le sucrose à 35%.

Nous pouvons donc affirmer l'efficacité du couplage.

Le nombre de LDL par particule d'or colloïdal varie de 5 à 9, ce qui semble comparable au conjugué utilisé dans d'autres travaux. (Handley et al., 1981; Mommaas-Kienhus et al., 1985; Poumay & Ronveaux-Dupal, 1985; Roach et al., 1987).

#### b. Le conjugué en tant que sonde pour le récepteur

Le conjugué LDL - or colloïdal semble constituer une sonde idéale pour le microscope électronique, notamment pour l'étude de l'endocytose spécifique des LDL dans les cellules en culture (Handley et al., 1981; Mommaas-Kienhuis et al., 1985; Hesz et al., 1987; Poumay & Ronveaux-Dupal, 1989). Ces derniers ont montré que le conjugué LDL - or colloïdal se lie en surface des cellules endothéliales en culture (Fig. 1.3.) et que ce conjugué est endocyté de manière similaire aux LDL marquées d'une autre manière.

Ceci nous confirme que le récepteur est présent dans les cellules endothéliales et que la LDL est toujours capable de lier le récepteur après avoir été conjuguée à l'or colloïdal.

#### c. But

Si la LDL, après couplage avec l'or colloïdal, est toujours capable de lier le récepteur sur des cellules en culture, elle devrait être aussi capable de se lier au récepteur isolé ayant été transféré d'un gel, après électrophorèse, sur une membrane NC. Ceci, bien sûr, pour autant que le récepteur après ces opérations soit toujours fonctionnel.

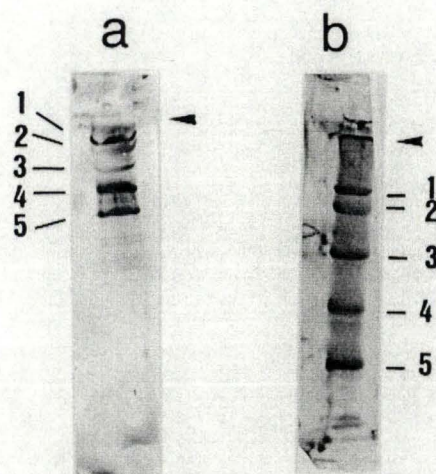


Fig. 1.4. Migration de l'étalon HMW dans un gel en gradient 8-25% (a) et dans un gel homogène 7,5% (b). Après migration et transfert, les protéines ont subi une coloration à l'or colloïdal (pH3).

Poids moléculaires : 1. 212000  
 2. 170000  
 3. 116000  
 4. 76000  
 5. 59000

C'est cette propriété, adaptée au récepteur de cellules endothéliales humaines en culture, que nous avons essayé d'exploiter dans le présent travail.

#### B. Choix du gel et de sa coloration

Les gels utilisés pour l'électrophorèse ont été décrits dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Le choix du gel s'est fait principalement sur base de l'étalement des protéines après migration et de la résolution obtenue aux environs du poids moléculaire du récepteur des LDL (c'est-à-dire 130000) (Fig. 1.4.).

Les protéines de l'étalon semblent beaucoup plus étalées dans le gel homogène 7,5% que dans le gel en gradient 8-25.

En ce qui concerne la coloration du gel, en figure 1.5., on peut observer 2 gels sur lesquels les mêmes échantillons ont migré, mais dont l'un a subi la coloration au bleu de Coomassie et l'autre, la coloration à l'argent. Cette dernière coloration s'avère être beaucoup plus sensible que la coloration du bleu de Coomassie.

Commentaires : propriété des gels homogènes et des gels en gradient. Les gels en gradient ont la propriété d'augmenter la résolution; en effet, le gradient affine les bandes de protéines puisque le front de migration d'une protéine est retardé par rapport à l'arrière de la protéine. De ce fait, les P.M. d'échantillons complexes (dont les protéines ont un large spectre en P.M.) peuvent être estimés aisément. Par contre, les gels homogènes offrent une meilleure séparation (augmentation de la distance entre les bandes) pour des protéines dont les P.M. sont plus rapprochés. Ces gels homogènes présentent également l'avantage d'avoir un effet constant sur les protéines du fait que celles-ci ne doivent pas atteindre une "limite de porosité" qui arrêterait leur migration.

C'est pourquoi, pour détecter le récepteur, dont le P.M. est de 130000, nous avons choisi les gels homogènes 7,5%.

Toutefois, si après un stress oxydant, le récepteur était fragmenté, nous aurions intérêt à employer le gel en gradient (les protéines de trop faible P.M. sortiraient du gel homogène) pour détecter à l'aide d'anticorps les éventuels fragments du récepteur. Par après, nous pourrions revenir à des gels homogènes mais de porosité plus faible.

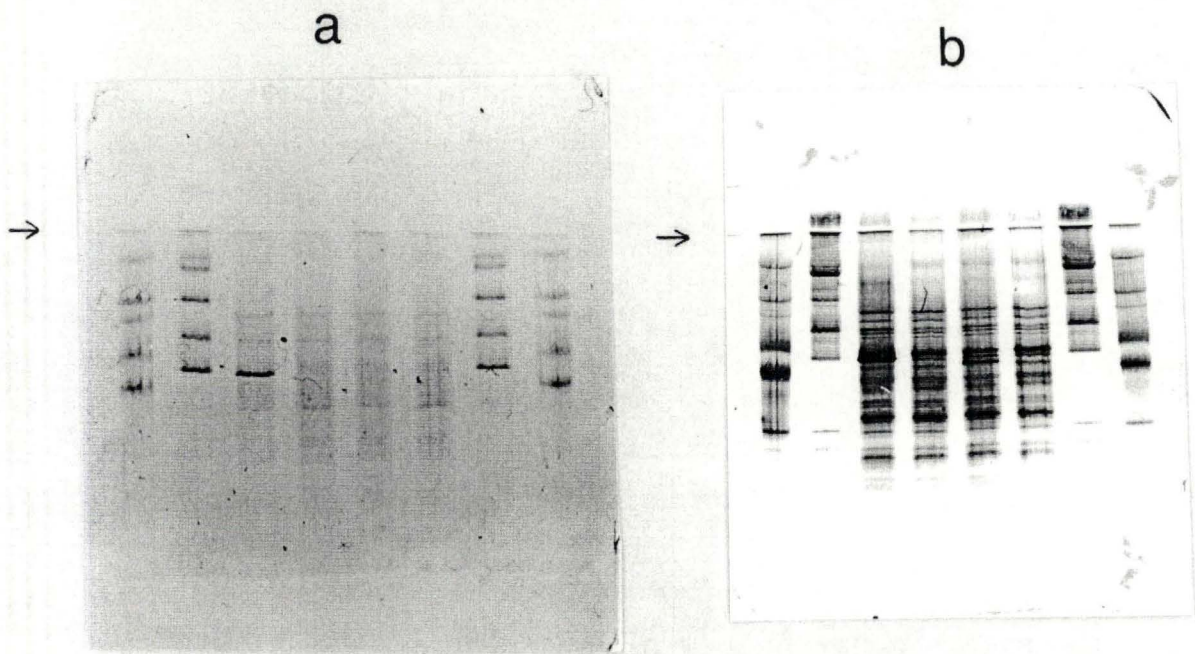


Fig. 1.5. Migration de divers échantillons dans un gel en gradient 8-25 du gel au bleu de Coomassie (a) ou à l'AgNO<sub>3</sub> (b).

Les 4 échantillons extrêmes sont des étalons (étalon HMW en position 2 et 7). Les 4 échantillons centraux sont des protéines de cellules solubilisées par la méthode directe. La flèche indique la limite entre le stocking gel et le gel proprement dit.



## C. Blotting et détection du récepteur avec le conjugué.

### 1. Vérification de l'efficacité du transfert

Les protéines transférées à partir d'un gel de polyacrylamide en présence de SDS, sont éluées comme des anions, dès lors, la membrane de NC est placée du côté de l'anode. De plus, le pH du tampon de transfert est basique (8,3-8,4), ce qui favorise le transfert des protéines dans ce sens.

Cependant, l'éluion des protéines étant dépendante de leur P.M. (Gershoni & Palade, 1983), on peut vérifier si le transfert a été totalement efficace en colorant les protéines sur la membranes de NC. On peut aussi colorer le gel après le transfert, et l'on ne doit rien détecter. En ce qui concerne nos expériences après le transfert, les protéines de l'étalon sont chaque fois nettement colorées, ce qui prouve l'efficacité du blotting.

### 2. Choix du colorant de l'étalon

La coloration à l'Amidoschwartz a pour effet de rétrécir la feuille de NC. Ceci est dû à la présence de méthanol à forte concentration dans le colorant (80%) et dans la solution de décoloration (90%). On peut calculer le taux de rétrécissement : il est de 13%. Ceci pose problème pour l'estimation des P.M., car il faut dès lors tenir compte du facteur de rétrécissement. La coloration à l'or colloïdal ne provoque pas ce rétrécissement, toutes les solutions étant aqueuses. De plus, la coloration à l'or s'avère nettement plus sensible pour la coloration à l'Amidoschwartz. Cette coloration semble donc être intéressante pour colorer les protéines totales sur une feuille de NC.

### 3. Effet de la solubilisation

Une grande partie de nos expériences ont été effectuées sur des échantillons qui ont été solubilisés par la méthode directe (voir "Matériel et Méthodes") sans concentrer les échantillons. Nous avons essayé de détecter le récepteur par la méthode du ligand et nous avons révélé nos échantillons par la technique photosensible. Les résultats que nous obtenions alors, se sont révélés négatifs (aucun marquage spécifique).

Il nous fallait, dès lors, répondre à certaines questions :

- le récepteur est-il dénaturé ?
- Le conjugué est-il toujours valide ?
- La méthode est-elle assez sensible ? Adéquate ?
- Y a t-il un problème lors de la révélation ?

#### a. Possibilité de dénaturation du récepteur

L'électrophorèse des protéines suivi d'un transfert, est une méthode qui a été employée pour détecter et quantifier le récepteur aux LDL dans différents types cellulaires. (Cfr. Chap.II)

Le récepteur est alors, soit détecté avec des anticorps antirécepteurs, soit détecté par la méthode du ligand.

L'anticorps antirécepteur nous permet de montrer la présence du récepteur, mais, mieux encore, la méthode du ligand nous montre si le récepteur est toujours fonctionnel. Le récepteur isolé est toujours capable de lier son ligand pour autant que les ponts disulfures ne soient pas réduits (Daniel et al., 1983).

Lors de la préparation de nos échantillons, nous n'avons bien sûr pas utilisé d'agents réducteurs qui réduiraient les nombreux ponts disulfures présents dans le domaine de liaison du récepteur, ce qui lui ferait perdre la capacité de lier nos ligands (voir introduction).

A priori, donc, le récepteur est toujours fonctionnel.

#### b. Amélioration de la sensibilité

##### α. Concentration des échantillons

Le récepteur aux LDL ne compte que pour moins de 0,01% des protéines cellulaires. Il n'est donc présent que sous forme de "traces". La stimulation des cellules par le sérum déficient en lipoprotéines augmente sensiblement ce pourcentage, mais il nous a semblé toutefois nécessaire de concentrer nos échantillons. Nous avons réalisé cette opération grâce à une membrane d'ultrafiltration ne retenant que les protéines ayant un P.M. supérieur à 10000. Nous avons également choisi de déposer un plus grand volume d'échantillons sur le gel (4  $\mu$ l au lieu de  $\mu$ l). Malheureusement, ces opérations se sont révélées infructueuses. Il nous faut tenir compte du type de cellules employées; en effet, les cellules endothéliales sont des cellules ne pouvant être utilisées au minimum qu'après 1 seul repiquage. Ceci représente, en effet, la limite essentielle de notre travail, en comparaison avec d'autres travaux sur le récepteur des LDL ne requérant pas de telles exigences.

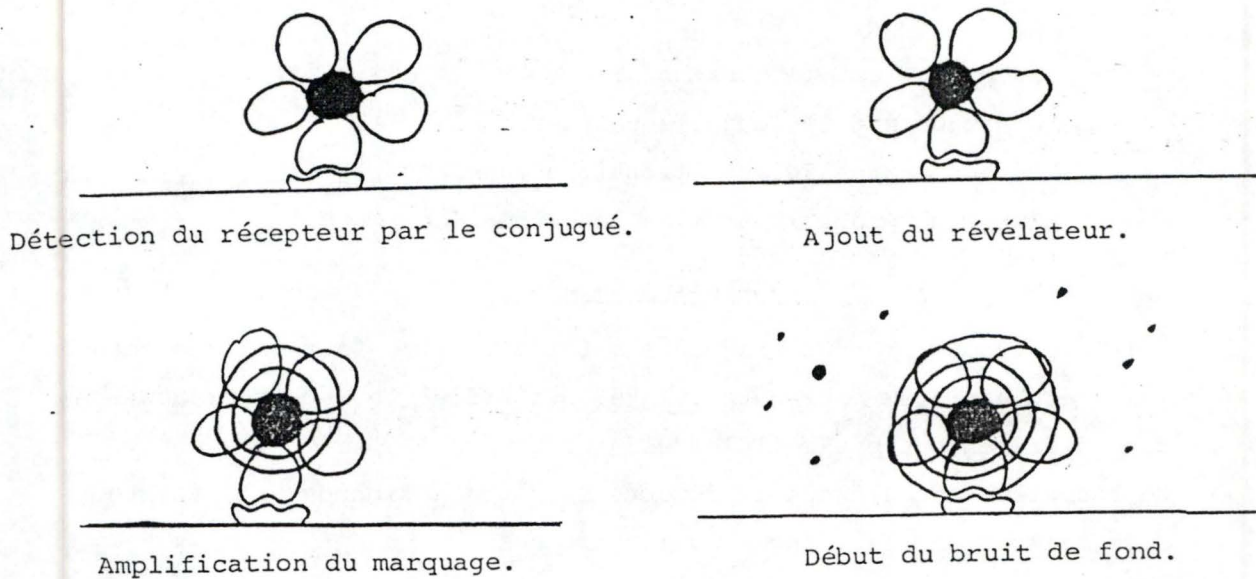


Fig 1.6 Amplification du marquage par la révélation à l'argent

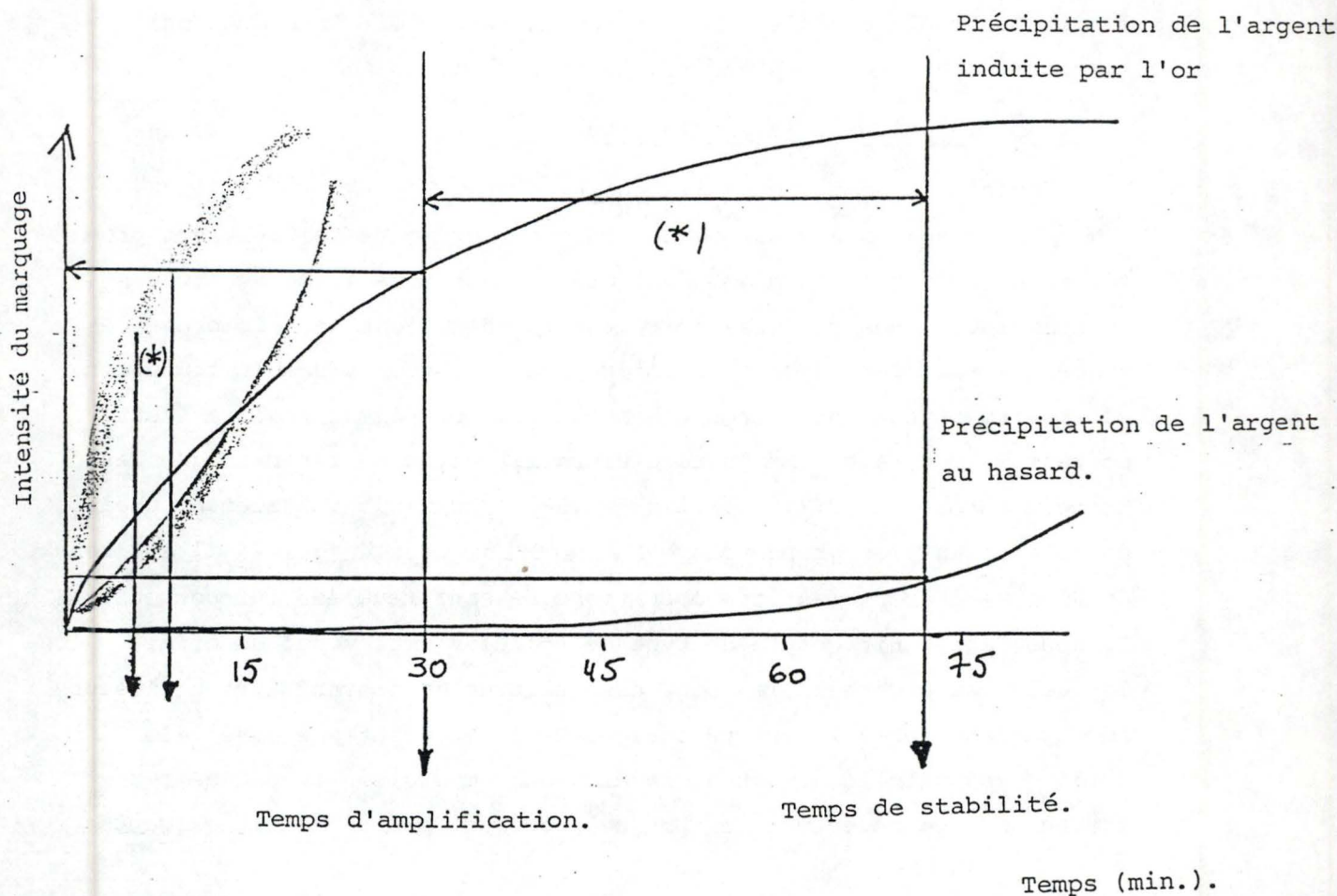


Fig. 1.7 La révélation des particules d'or par l'argent est dépendante du temps Selon le mode d'emploi des réactifs Intense BL (Janssen, life sciences. products).

#### b. Effet de la taille de l'or

La sensibilité de la liaison et de la détection du conjugué LDL - or colloïdal sont tous les 2 inversement proportionnels à la taille de l'or. C'est pourquoi, nous avons décidé pour augmenter la sensibilité du marquage, d'incuber les échantillons avec du conjugué LDL- or colloïdal de 5 nm et non pas de 17 nm.

Mais il s'est avéré que le conjugué LDL - or colloïdal (5 nm), précipitait sur la membrane de N.C. Nous avons alors pensé que les LDL, étant beaucoup plus grosses que les particules d'or de 5nm et ne pouvant pas stabiliser l'or de manière suffisante, se sont "découplées". Nous avons abandonné les incubations avec le conjugué LDL - or colloïdales 5 nm pour éviter une précipitation aspécifique sur la membrane de NC.

#### γ. Choix de la révélation

La révélation à l'argent amplifie le marquage à l'or colloïdal. En effet, si une petite quantité d'or est liée à la feuille de NC, mais est non visible, la révélation à l'argent sert à amplifier ce marquage. (Fig. 1.6).

Nous avons la possibilité entre 2 milieux de révélation. L'un est photosensible, difficile à contrôler car la réaction doit se produire à l'obscurité. L'autre est non photosensible.

Le processus de la révélation des particules d'or par l'argent est dépendant du temps (Fig. 1.7.). Dans une première période, la réaction est très spécifique pour l'or colloïdal dont les particules vont croître très rapidement. Leur vitesse de croissance décline avec le temps. Le temps d'amplification est le temps nécessaire pour atteindre une amplification suffisante. Après un certain laps de temps, l'argent précipite au hasard, et il se forme alors un bruit de fond.

On peut définir une marge de sécurité (\*) comme étant la différence entre le temps d'amplification et le temps de stabilité (= temps pour lequel un bruit de fond homogène commence à se former).

La méthode photosensible est peut-être la plus sensible, mais cependant elle est la plus délicate et la plus difficile à contrôler étant donné que la marge de sécurité n'est que de 3 min. (tandis que pour la méthode non photosensible elle est de + ou - 40 min.).

C'est pour ces raisons que nous préférons la méthode non photosensible. Malgré ce choix, tant que nous solubilisons nos échantillons par la méthode directe, nos résultats se sont avérés infructueux.

#### c. Solubilisation en présence d'urée

Ayant passé en revue certaines possibilités pouvant mettre en cause nos premiers échecs, nous avons pensé changer de méthode de solubilisation.

Nous avons tenté de solubiliser nos échantillons en présence d'urée (voir "Matériel et Méthodes").

En retenant les éléments positifs de ces mises au point, et en solubilisant nos échantillons en présence d'urée, nous obtenons enfin des résultats satisfaisants. (Chap. II et chap. III).

Quels sont les éléments de réussite de cette méthode de solubilisation ?

- Tout d'abord, on procède à deux centrifugations dont la première a pour but de concentrer les membranes, ce qui élimine la majorité des protéines du cytosol.
- Ensuite, l'urée est une molécule qui favorise nettement la solubilisation des protéines. L'urée agirait en grande partie par son action sur les liens hydrophobes, contrairement à ce que pensent certains auteurs qui prétendent que l'urée est capable de rompre les ponts hydrogènes interpeptidiques. L'urée est capable de diminuer les interactions hydrophobes entre les protéines membranaires et les phospholipides, et entre les protéines entre elles, défavorisant leur aggrégation en solution.

Ces deux actions favorisent donc nettement la solubilisation des protéines.

#### D. Conclusion

##### 1. Existence du récepteur dans les cellules endothéliales.

- De nombreuses études démontrent l'existence du récepteur spécifique aux lipoprotéines de faible densité. Son existence a d'abord été montrée par Goldstein & Brown en 1974 : dans certains cas d'hypercholestérolémie, où le récepteur est absent, on observe une nette diminution de la liaison des LDL en surface de fibroblastes provenant de patients présentant cette anomalie.
- L'existence du récepteur a aussi été montrée dans des cellules endothéliales : des expériences de compétition montrent que la liaison

spécifique de LDL radioactives ( $^{125}\text{I}$ -LDL) est fortement diminuée si on ajoute un large excès de LDL froides. Coetze et al., en 1979 et Van Hinsberg et al., en 83 l'ont démontré. La microscopie électronique a aussi permis de montrer la liaison du conjugué au niveau du récepteur: le marquage est particulièrement abondant au niveau des coated pits, et de nouveau des expériences de compétition (c'est-à-dire un excès de LDL non conjuguées) suppriment ce marquage.

## 2. Détection du récepteur par la méthode du ligand

Ce chapitre avait pour but de montrer les difficultés rencontrées pour la détection du récepteur dans des cellules endothéliales dont on a stabilisé les protéines.

Nous avons revu les points pouvant défavoriser la réussite de cette technique :

- la validité du conjugué a été vérifiée, nous avons éliminé l'idée de travailler avec du conjugué préparé avec des particules d'or de 5 nm au lieu de 17 nm, afin d'éviter une précipitation aspécifique sur la membrane de NC.
- L'hypothèse de la dénaturation du récepteur lors de la solubilisation a été éliminée; en effet, le succès de la révélation du récepteur par la méthode du ligand dépend de l'omission d'agents réducteurs durant la solubilisation des protéines.

Si les ponts disulfures intrachânes étaient réduits, ceci ferait perdre au récepteur toute capacité de lier son ligand. Comme nous n'avons pas employé d'agent réducteur, a priori, le récepteur devrait toujours être fonctionnel.

- Roach et al., en 1987, ont estimé la sensibilité de la méthode de la détection du récepteur et ont montré que la méthode du ligand permettait de détecter au minimum 3 ng de protéines de récepteur sur la membrane de nitrocellulose. Donc, cette méthode s'avère être assez sensible, mais il est clair que nous n'avons jamais pu obtenir une quantité de matériel de départ satisfaisante, principalement du fait que les cellules endothéliales ne s'utilisent au maximum qu'après un repiquage. C'est pourquoi, nous avons essayé de concentrer au maximum nos échantillons.

- Le système de révélation a aussi été discuté et nous avons choisi la méthode non photosensible étant donné qu'elle est plus contrôlable.

- Nous avons finalement réussi à détecter le récepteur grâce à la solubilisation en présence d'urée. Il semblerait que cette molécule ait la propriété de favoriser de manière efficace la solubilisation des protéines.

Nous disposons donc, maintenant, des éléments positifs pour la détection du récepteur dans les cellules endothéliales par la méthode du ligand.

## II. DETECTION DU RECEPTEUR DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE

### A. Résultats

#### 1. Amplification de la coloration à l'or colloïdal par la révélation à l'argent

Le but de cette expérience est de montrer l'importance de la révélation à l'argent pour la détection de faibles quantités de protéines de récepteur.

Des échantillons, dont le récepteur a été purifié, ont migré en même temps que nos protéines des cellules endothéliales :

- l'échantillon MRC-5

Cet échantillon provient d'une lignée de fibroblastes de poumon foetal humain et nous a été cédé par le Dr. J-C. Mazière.

La concentration de l'échantillon est de 3,9 mg prot./ml.

- L'échantillon HT-29

Cet échantillon provient d'une lignée de cellules d'adénocarcinome du colon humain et nous a aussi été cédé par le Dr. J-C. Mazière.

Sa concentration est de 6,3 mg prot./ml.

- La concentration des échantillons provenant de nos cellules endothéliales est de 1,8 mg prot./ml.

Après le transfert et l'incubation de la membrane en présence du conjugué, on distingue déjà une bande dans MRC-5 et une bande dans HT-29, mais pas encore dans les cellules endothéliales (CE) (Fig. 2.1.a.).

Après la révélation à l'argent, on distingue aussi une bande dans les CE. (Fig. 2.1.b.).

#### 2. Détermination du poids moléculaire du récepteur

Si le récepteur provient d'échantillons préparés en absence d'agents réducteurs, son PM devrait être de 130000.

Nous avons estimé le PM du récepteur de 3 manières différentes : soit directement sur la membrane de NC, soit sur une photo agrandie de cette même membrane ou, enfin, à l'aide d'un densitomètre à laser Ultrosan XL (LKB) et du programme Gel Scan XL (2.0).

##### a. Estimation du P.M. du récepteur sur la membrane de NC.

Pour plusieurs expériences, nous avons dressé la droite d'étalonnage et, à partir de là, estimé les poids moléculaires.



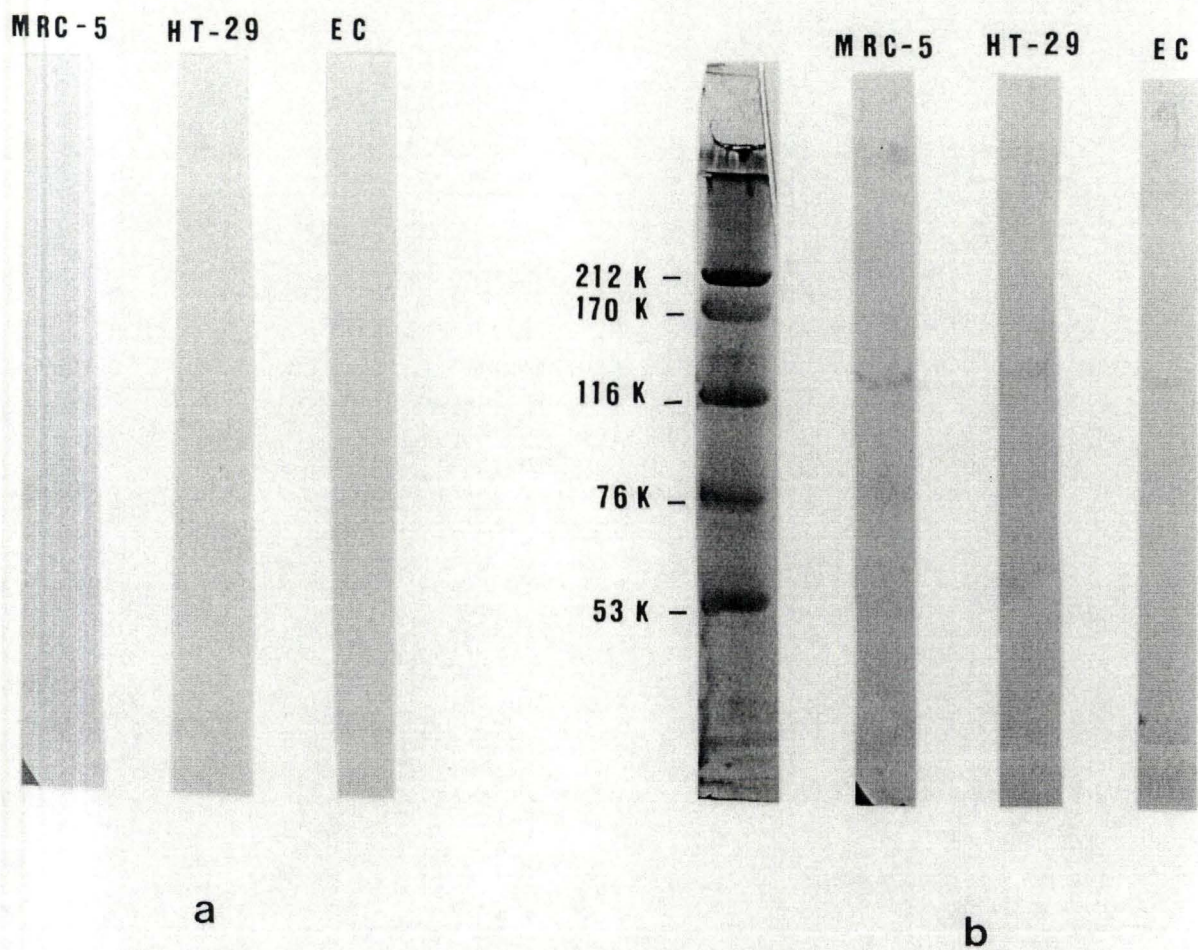


Fig. 2.1. Effet de la révélation à l'argent : 4  $\mu$ l des échantillons MRC-5, HT-29 et EC ont été déposés sur un gel homogène 7,5 % et ont été transférés après migration sur une membrane de NC incubée avec le conjugué LDL - or colloïdal (a), puis révélée à l'argent (système non photosensible) (b).

	exp.1 <sub>(1)</sub>	exp.2 <sub>(2)</sub>	exp.3	exp.4
CE	141.362	147.844	143.552	137.376
PM HRC-5	142.400	138.288		
HT-29	142.400	130.314		

(1) Fig.2.2. et Fig.2.3.

(2) Fig.2.5. et Fig.2.6.

Les P.M. sont assez hétérogènes.

b. Estimation des P.M. du récepteur sur une photo

Si on compare les P.M. calculés à partir de photos agrandies des 4 expériences précédentes aux P.M. calculés sur la membrane de NC, on remarque que l'estimation des P.M. sur la photo s'avère meilleure.

	exp.1 <sub>(1)</sub>	exp.2 <sub>(2)</sub>	exp.3	exp.4
CE	130,692	140.50	141.34	136.88
PM MRC-5	135.081	136.570		
HT-29	135.081	138.920		

(1) Fig. 2.4.

(2) Fig. 2.7.

c. Estimation des P.M. par densitomètre au laser.

Nous avons estimé le P.M., de cette manière, pour 2 expériences.

	exp.2 <sub>(3)</sub>	exp.4
CE	131,428	129.65
PM MRC-5	125.425	
HT-29	131.428	

(3) Fig. 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13.

L'estimation des P.M. par cette méthode s'avère plus exacte.

3. Contrôles

A ce stade, nous possédons plusieurs éléments de poids suggérant que nous avons réussi à détecter le récepteur des LDL mais, nous pouvons en contrôler certaines caractéristiques :

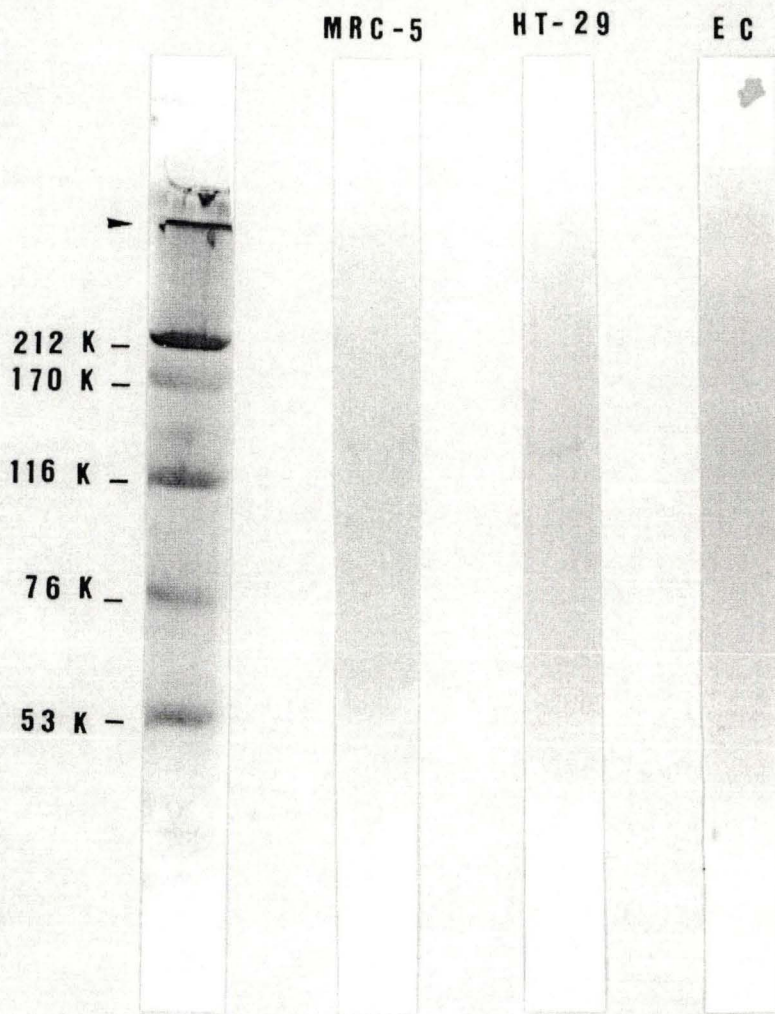


Fig. 2.2 Migration des échantillons MRC-5, HT-29 et CE et révélation des récepteurs selon la méthode du ligand.

La flèche indique la limite entre le stacking gel et le gel proprement dit.

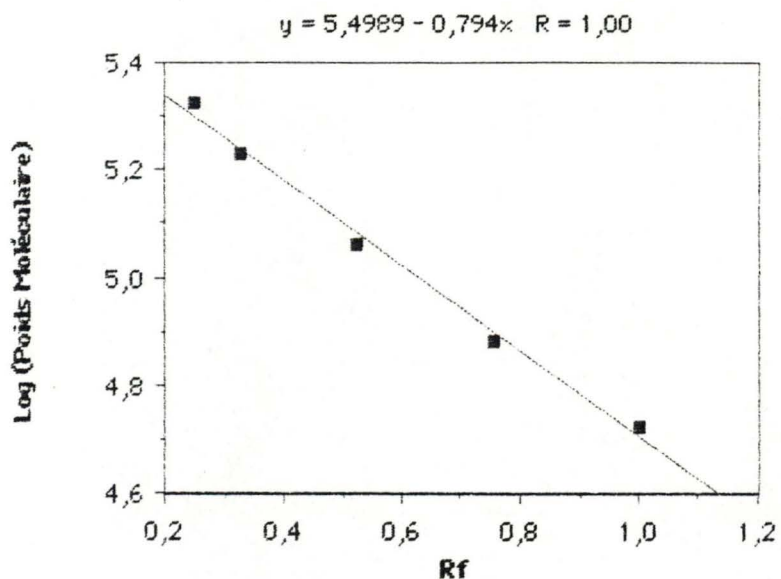


Fig. 2.3 Courbe d'étalonnage  
 Rf est égal à la distance de migration de chaque protéine sur la distance de migration de la protéine étalon ayant migré le plus loin. Cette courbe a été dressée à partir des étalons mesurés sur la feuille de NC directement.

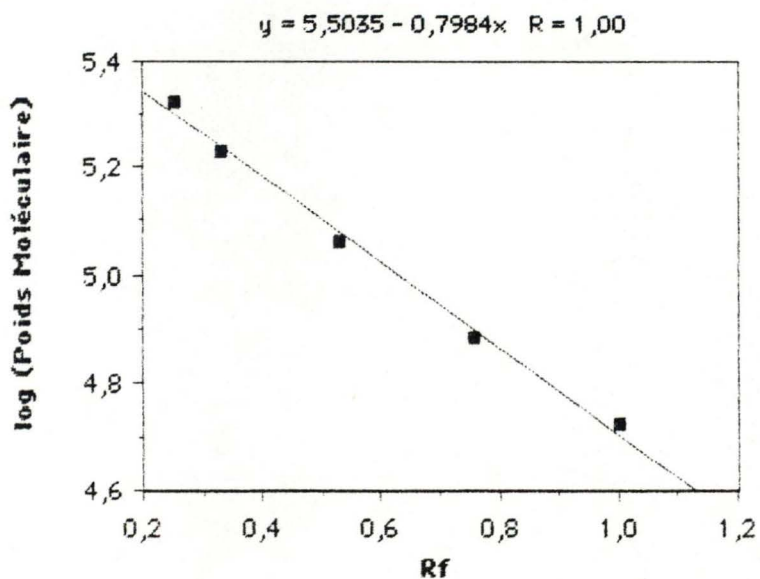


Fig. 2.4 Courbe d'étalonnage dressée à partir de la photo correspondante.

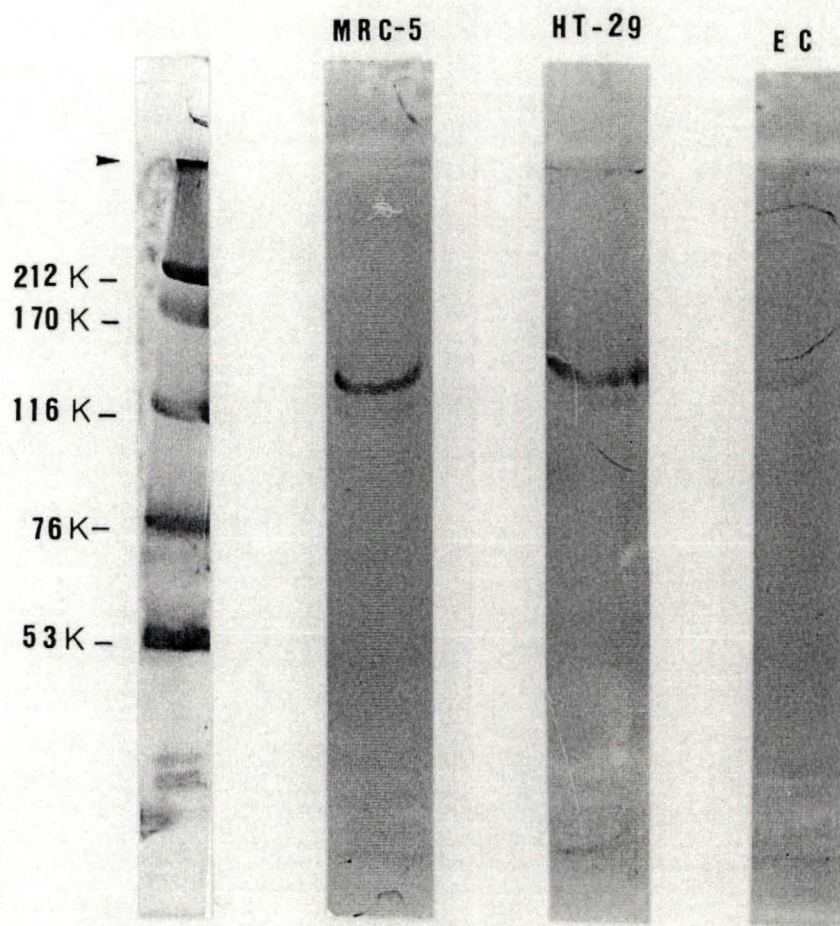


Fig. 2.5. Migration des différents échantillons MRC-5  
HT-29 et EC.  
Révélation du récepteur selon la méthode du  
ligand.

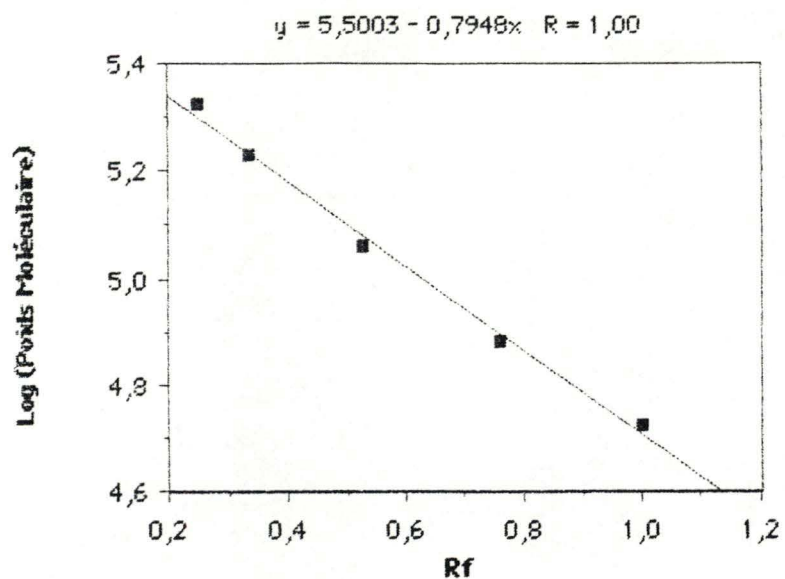


Fig. 2.6 Courbe d'étalonnage dressé à partir des étalons mesurés sur la feuille de NC directement.

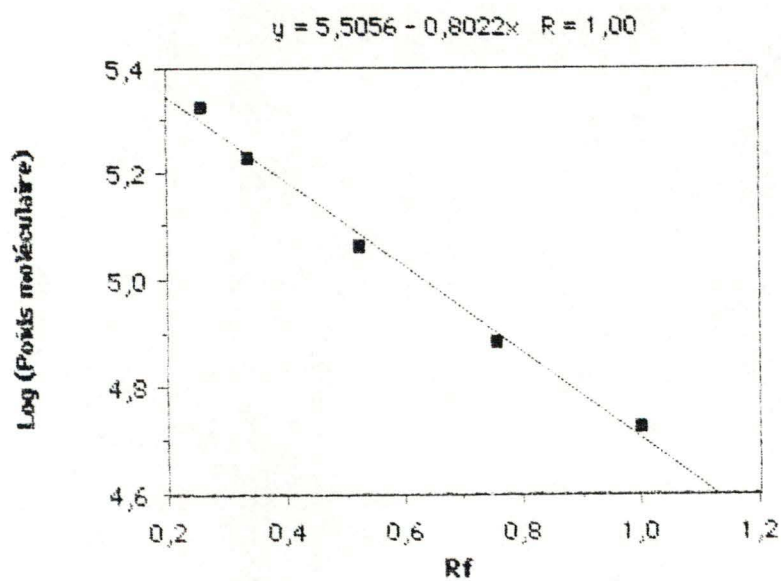


Fig. 2.7 Courbe d'étalonnage dressée à partir de la photo correspondante.

1d\fun11\_4.d01  
Background.  
3.522

Ge1Scan XL (2.00) 3 May 1989 11:20:03

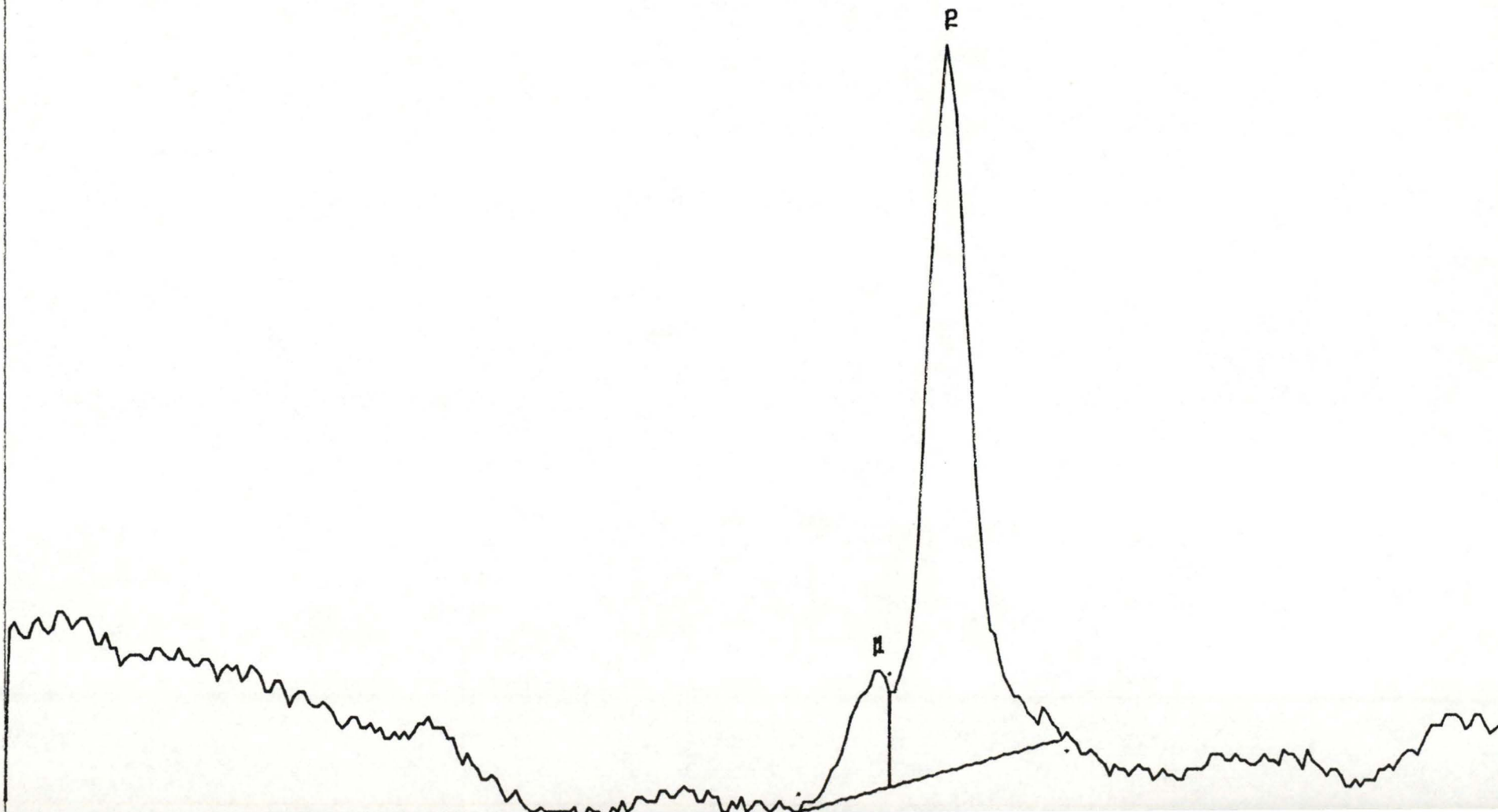


Fig. 2.8 Bande correspondant à MRC-5 (cfr. Fig. 2.5) ayant  
passé au densitomètre.

Molecular weight report.

Calculation using a parabolic polynomial.

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight Kd
1		104.48	0.053	0.04056	12.1	113.98210
2		105.68	0.329	0.29560	87.9	125.42490

Fig. 2.9 Estimation des poids moléculaires correspondant  
aux pics 1 et 2.



= 1d\fun11\_4.d05  
= Background.

GelScan XL (2.00) 3 May 1989 12:22:57

3.142

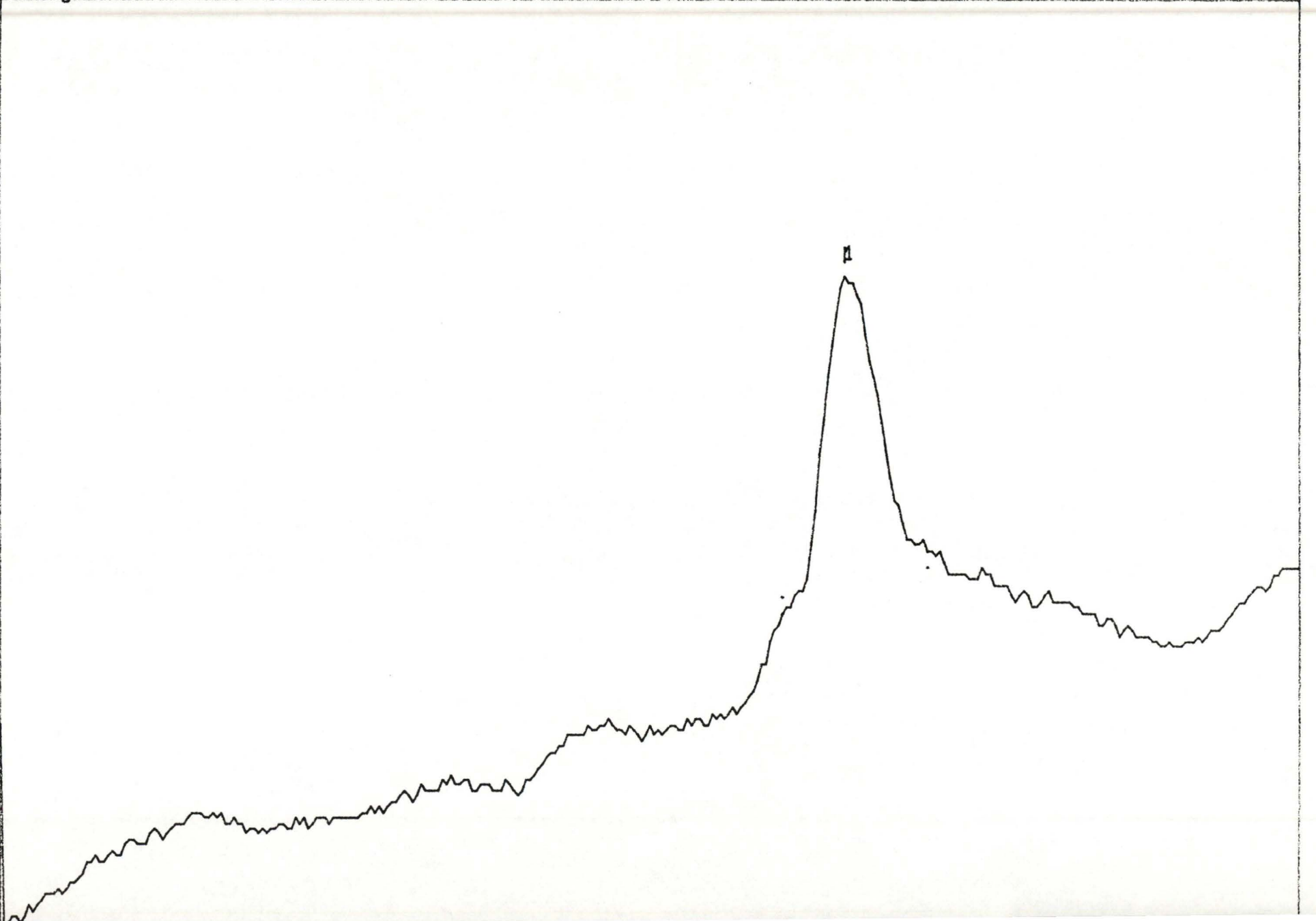


Fig. 2.10 Bande correspondant à HT-29 (cfr. fig.2.5) soumise au densitomètre.

Molecular weight report.

Calculation using a parabolic polynomial.

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight Kd
1		106.24	0.135	0.15608	100.0	131.42880

Fig. 2.11 Estimation du poids moléculaire du pic 1.

= 1d\fun11\_4.d02  
= Background.

Ge1Scan XL (2.00) 3 May 1989 11:28:26

3.317

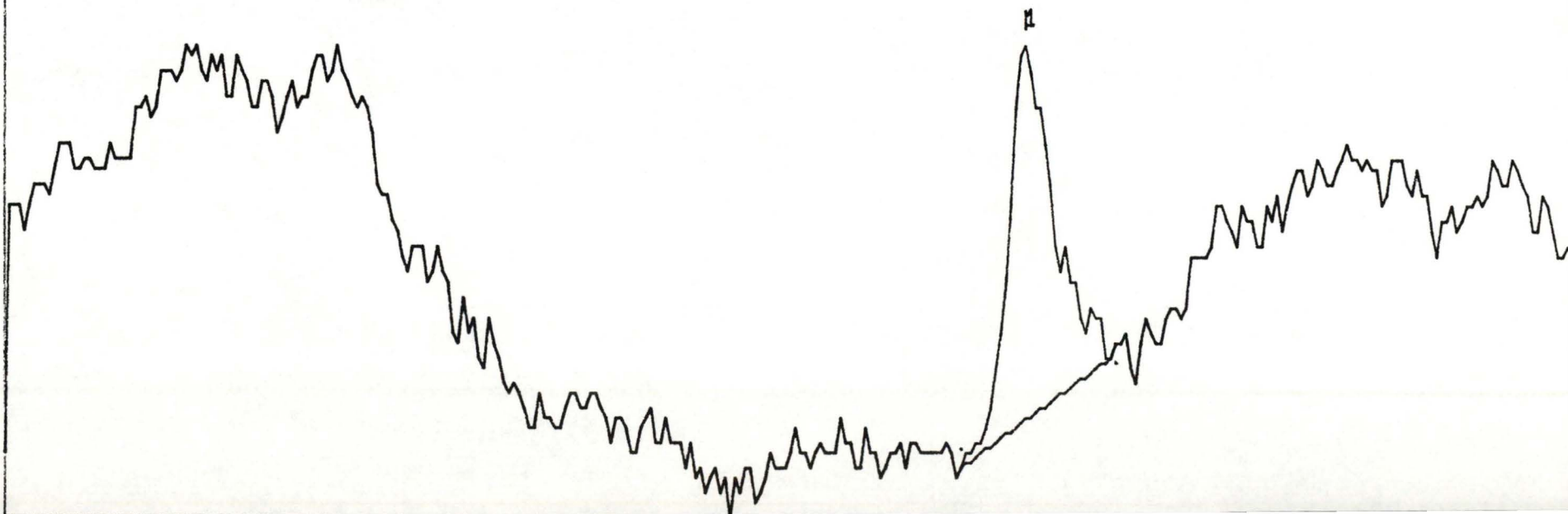


Fig. 2.12 Bande correspondant aux cellules endothéliales  
(cfr. fig. 2.5) soumise au densitomètre.

Molecular weight report.

Calculation using a parabolic polynomial.

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight Kd
1		90.88	0.057	0.05624	14.7	49.37144
2		92.48	0.062	0.08976	23.4	53.64933
3		92.88	0.065	0.05288	13.8	54.80058
4		93.68	0.059	0.04504	11.8	57.21119
5		94.96	0.053	0.04176	10.9	61.39610
6		95.28	0.053	0.04496	11.7	62.51121
7		106.24	0.069	0.05232	13.7	131.42880

Fig. 2.13 Estimation des poids moléculaires des pics retenus.

- Perte de la fonction du récepteur quand ce dernier a été préparé en présence d'agents réducteurs.
- La liaison est calcium dépendante.
- Le marquage doit disparaître en présence d'un excès de LDL natives.

a. Révélation du récepteur en présence d'agents réducteurs

La liaison de la LDL à son récepteur est tout à fait inhibée quand on incube l'échantillon en présence de  $\beta$ - mercaptoéthanol (Fig.2.14).

b. Révélation du récepteur mis en présence d'un excès de LDL natives

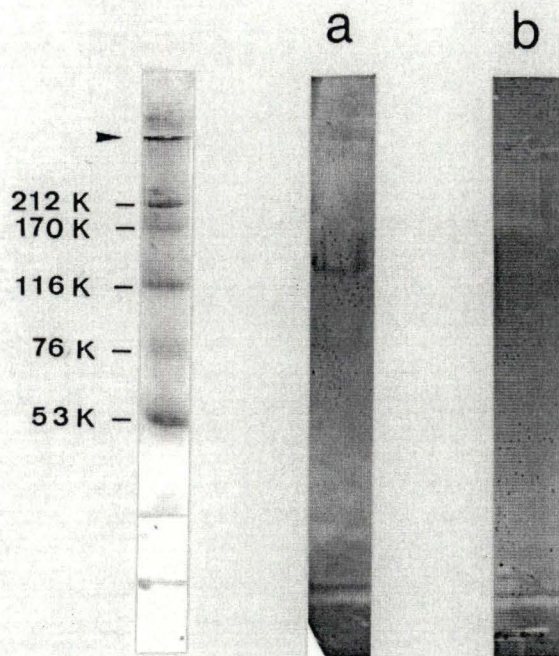
Le marquage disparaît si la membrane de NC est incubée avec un excès de LDL natives (500  $\mu$ g/ml) qui vont entrer en compétition avec les LDL conjuguées (Fig. 2.15).

c. Révélation du récepteur mis en présence de chélateurs de calcium (EDTA)

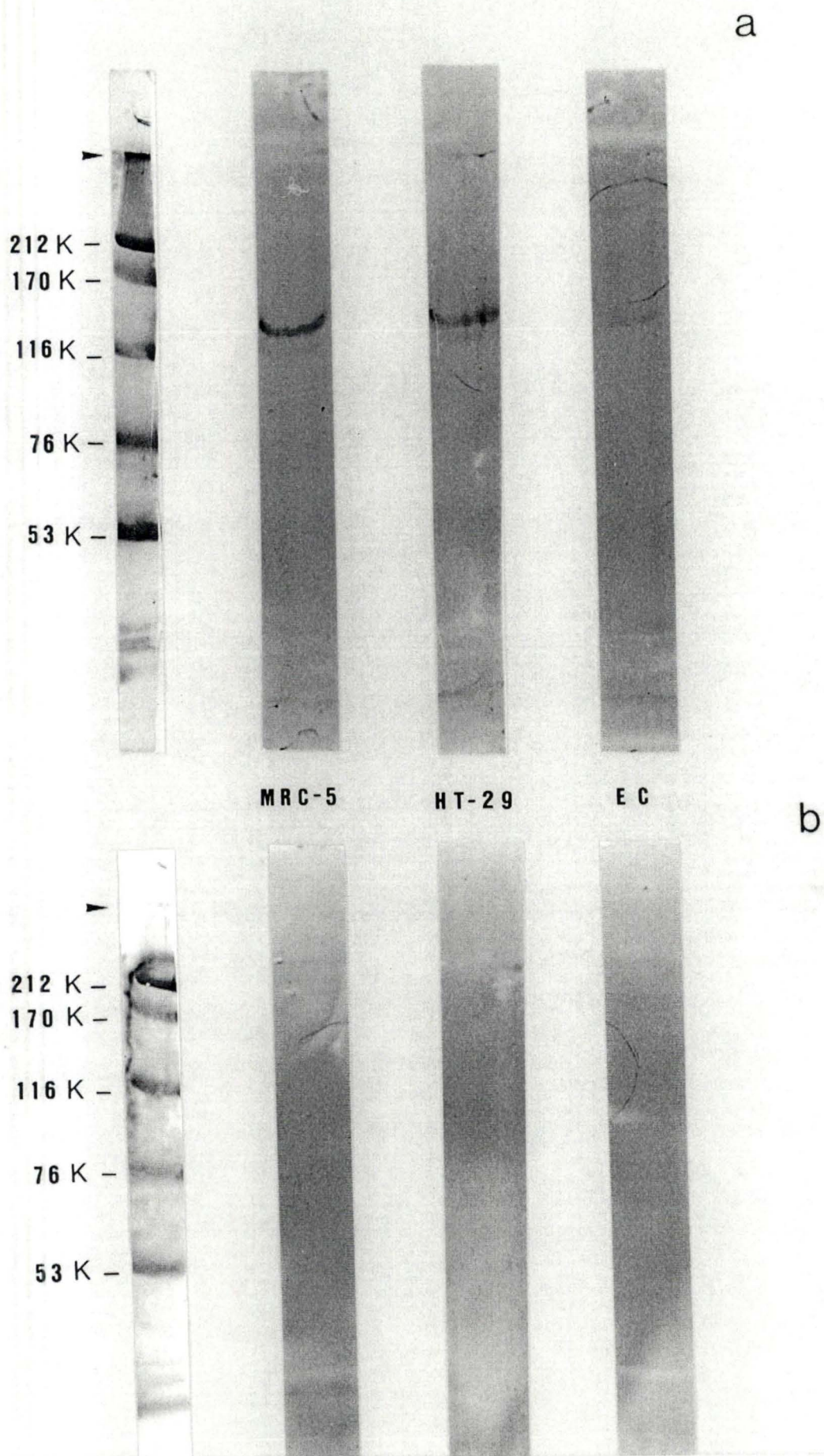
Les divers milieux d'incubation ont été préparés sans calcium et avec un excès d'EDTA (10 mM) pour l'incubation de la membrane avec conjugué. La disparition du marquage montre que la liaison de la LDL à son récepteur est calcium dépendante (Fig. 2.16).

4. Essai de détection du récepteur avec un anticorps antirécepteur

Nous avons essayé de détecter le récepteur avec un AC. antirécepteur caractérisé par Goldstein et al. en 1989. (Voir "Matériel et Méthode"). Ces expériences se sont avérées infructueuses car il y avait une précipitation précoce et aspécifique sur la membrane de NC.



**Fig. 2.14** Détection du récepteur en présence d'agents réducteurs. En a, l'échantillon HT-29 a été déposé tel quel, en b, ce même échantillon a été incubé pendant 3 minutes avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol 1,2% à 100°C. La flèche indique la limite entre le stacking gel et le gel en gradient.



**Fig. 2.15** Révélation du récepteur en présence d'un excès de LDL natives.

Après migration des transferts, la membrane est incubée 2 heures en présence du conjugué (a) ou en présence du conjugué + un excès de LDL natives (500 µg/ml).

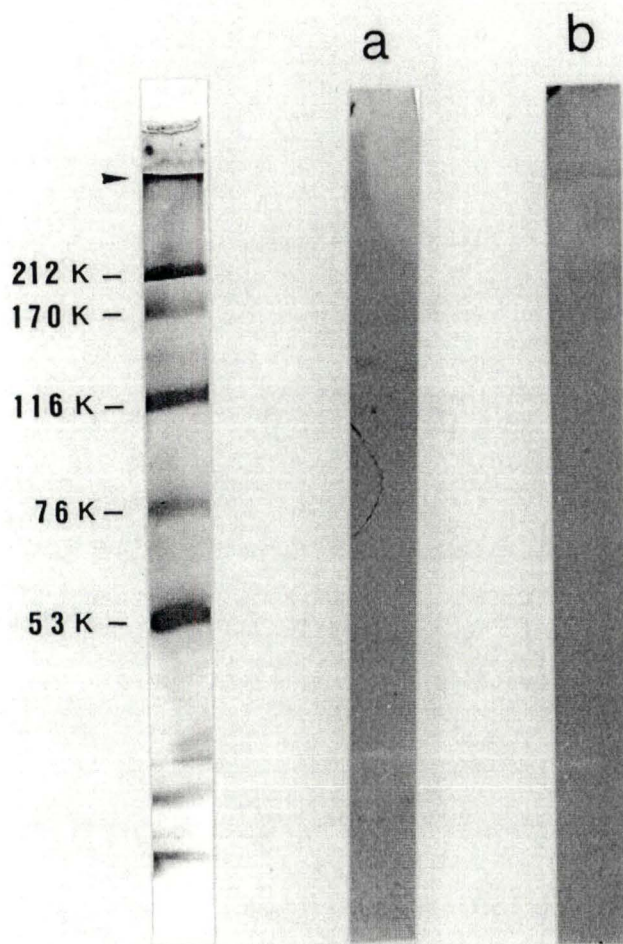


Fig. 2.16 Révélation du récepteur en présence de chélateurs du calcium.

Après électrophorèse et transfert des cellules endothéliales la membrane de NC est incubée deux heures en présence du conjugué (a) ou en présence du conjugué + de l'EDTA (10 mM) (b).



## B. Discussions

Dans ce chapitre, nous avons voulu montrer que :

- nous avons pu détecter le récepteur parmi les protéines de cellules endothéliales solubilisées, après migration sur SDS PAGE et transfert sur NC, par la méthode du ligand.
- Que ce récepteur exhibe une migration électrophorétique comparable à ce que l'on peut trouver dans la littérature.
- Et qu'enfin, le récepteur répond aux différents contrôles tels que la disparition du marquage :
  - a. quand ce dernier a été préparé en présence d'agents réducteurs,
  - b. quand l'incubation s'est poursuivie en présence d'un excès de LDL natives,
  - c. Quand l'incubation s'est poursuivie en présence d'EDTA.

### 1. Identité du récepteur

Nous avons déjà une première affirmation sur la réussite de la détection du récepteur dans les cellules endothéliales, grâce à la comparaison avec d'autres échantillons (MRC-5 et HT-29) pour lesquels le récepteur a été purifié.

La purification de ces échantillons et leur plus forte concentration en protéines par rapport aux échantillons des cellules endothéliales expliquent pourquoi on peut déjà détecter le récepteur avant que la membrane ne soit incubée dans la solution de révélation à l'argent (Fig. 2.1.). Par contre, les cellules endothéliales n'ont pas été purifiées, et leur concentration en protéines est plus faible, ce qui explique que l'on ne sait détecter le récepteur sans passer la membrane dans la solution de révélation à l'argent.

Selon certains auteurs, la limite de détection est 10 fois plus faible après la coloration à l'argent (Roach et al., 1987).

### 2. Poids moléculaire du récepteur

Le P.M. estimé du récepteur devrait être de 130000 et non de 160000 qui est le P.M. du récepteur, quand ce dernier est préparé en conditions réductrices (Daniel et al., 1983).

Le P.M. a été déterminé de 3 manières : soit directement sur la membrane de NC, soit sur une photo agrandie de cette même membrane, soit enfin au densitomètre au laser.

La membrane de NC nous est apparue difficile à manipuler étant donné ses petites dimensions. L'estimation du P.M. directement sur la membrane semble donc assez difficile. Il est déjà plus aisé de calculer les P.M. sur une photo agrandie de cette membrane. L'estimation du P.M. est la meilleure quand on le détermine à l'aide du densitomètre au laser.

Pour l'échantillon MRC-5, on détecte un petit pic de P.M. plus faible que celui du récepteur (+ ou - 114000). Ce pic est aussi visible sur la membrane de NC. ( Fig. 2.5.). Dans d'autres travaux, ce genre de phénomène s'est déjà produit, et certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette bande pouvait correspondre à une forme immature du récepteur qui lierait la LDL, ou alors elle pourrait résulter d'une action protéolytique (Wade et al., 1985).

En conclusion, la détermination du P.M. du récepteur confirme son identité. Le P.M. du récepteur dans les cellules endothéliales semble bien correspondre au P.M. du récepteur mentionné pour d'autres types cellulaires humains :

- Dans les cellules de la glande surrénale, les fibroblastes, et les cellules de carcinome épidermiques (lignée A-43) (Daniel et al., 1983).
- Dans les cellules du foie humain (Sautar et al., 1986).
- Dans des lignées d'hépatomes humains FU5 AH (Friedman et al., 1987) et Hep G2 (Semenkovich & Ostlund, 1987).
- Dans la lignée HeLa (Havinga et al., 1987).
- Dans les lignées MRC-5 et HT-29
- Egalement dans des cellules animales : le foie de rat (Roach & Noël, 1987), dans le foie de chien (Wate et al., 1986) et dans le foie de lapin (Gherardi et al., 1988).

D'autres méthodes que celle du ligand ont été également employées pour détecter le récepteur dans ces types de cellules.

Dans les cellules endothéliales, c'est la première fois que l'on détecte le récepteur à partir de protéines solubilisées.

### 3. Les contrôles

La détermination du P.M. du récepteur confirme bien la réussite de détection de ce dernier. Mais, nous avons voulu soumettre cette détection à un certain nombre de contrôles afin de renforcer nos affirmations.

#### a. Détection du récepteur en présence d'agents réducteurs.

Il a déjà été précisé que la réussite de la détection du récepteur par la méthode du ligand est basée sur l'omission d'emploi d'agents réducteurs lors de la préparation des échantillons. (Daniel et al., 1983). Ce qui suggère que les ponts disulfures du récepteur sont nécessaires pour la liaison de la LDL à son récepteur.

Nous avons observé (dans les cellules HT-29) la perte de la fonction du récepteur dans de telles conditions.

De plus, dans de telles conditions, le P.M. est augmenté de 30000 (160000). Daniel et al., en 1983, ont alors supposé que quand les ponts disulfures sont réduits, la conséquence est que la protéine est plus dépliée, causant ainsi une diminution de la mobilité électrophorétique. Nous n'avons pas pu vérifier ce phénomène par la détection du récepteur avec l'AC. disponible. Rappelons ici, que le ligand ne peut plus reconnaître le récepteur dont les ponts disulfures ont été réduits.

#### b. Détection du récepteur en présence d'un excès de LDL

Nous avons détecté le récepteur selon la méthode de Roach et al., 1987. Ces derniers avaient employé, pour l'incubation de leur membrane, une concentration de conjugué LDL - or colloïdal de 20 g/l.

Certains auteurs ont prétendu que l'augmentation de la concentration n'augmentait pas l'intensité du marquage (Wade et al., 1985).

Pourtant, en employant une si petite quantité de conjugué, nous n'aurons pas obtenu de marquage.

Pour avoir un marquage suffisant, nous avons dû employer des concentrations de conjugué au minimum de 100 g/ml.

Dans leur étude de la liaison des conjugués en surface des cellules endothéliales, Mommaas-Kienhuis et al., (1985) ont employé une concentration de conjugué se situant entre 20 et 50 g/ml, et ont relevé le fait que puisque + ou - 5-8 particules de LDL étaient couplées aux particules d'or, la concentration "efficace" pour la liaison est nettement diminuée (5 à 8 fois plus faible que la concentration mesurée). Ceci explique pourquoi un excès de 5 fois en LDL natives (500 g/ml) est suffisant pour que l'on ne puisse plus détecter le récepteur sur la membrane de NC.

#### c. Détection du récepteur en présence d'EDTA

La liaison de la LDL à son récepteur est dépendante du calcium (Goldstein & Brown, 1977).

Nous avons vérifié cette propriété en rajoutant de l'EDTA, qui est un chélateur du calcium, dans le milieu d'incubation du conjugué en concentration de 10 mM.

Récemment, le site de liaison du calcium au récepteur a été déterminé (Driell et al., 1987) et semble correspondre aux acides aminés 2 à 42.

#### 4. Essai de détection du récepteur par l'anticorps antirécepteur

Nous avons vainement tenté de détecter le récepteur à l'aide de l'AC. antirécepteur R4 cédé par le Dr. J-C. Mazière (Goldstein et al., 1989).

Mais, lors de la révélation à l'argent il y a eu une précipitation précoce et aspécifique sur la membrane de NC. Ceci était certainement dû au fait que nous n'avons pas assez dilué le premier anticorps.

La dilution proposée par J-C. Mazière était de 1:50.

La préparation de l'AC. est peut-être aussi à mettre en cause (Goldstein et al., 1988). Ces derniers avaient purifié le récepteur à partir de membranes de syncytiotrophoblaste et avaient fait migrer cet échantillon sur gel d'électrophorèse en présence de SDS. L'aire du gel correspondant aux protéines ayant un P.M. de 160000 a été pulvérisée et ce sont ces protéines émulsifiées qui ont été injectées à des lapins pour reproduire l'antisérum. Mais, au départ, l'échantillon avait été préparé en condition non réductrice, donc le P.M devrait se situer à 130000 et non à 160000.

### III. DETECTION DU RECEPTEUR DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES OXYDEES

---

#### A. Résultats

Les cellules endothéliales ont été incubées 120 minutes en présence du système Xanthine/Oxydase (= test) et ont été solubilisées de la même manière que les cellules contrôles. Les cellules contrôles et oxydées proviennent d'un même repiquage.

#### 1. Effet de la durée de la révélation sur la détection du récepteur dans les cellules oxydées

Nous avons réalisé deux séparations différentes avec les mêmes échantillons : "tests" et "contrôles". Nous avons suivi le protocole de la détection du récepteur par la méthode du ligand. Pour la première expérience, la membrane de NC est restée 25 minutes dans le réactif de coloration à l'argent. On ne détecte aucune bande parmi les protéines des cellules tests (Fig. 3.1.a).

Pour la seconde migration, les échantillons sont restés 40 minutes dans ce réactif et un marquage apparaît dans le test quoique plus léger que dans le contrôle (Fig. 3.1.b).

#### 2. Comparaison des protéines solubilisées à partir des cellules tests et des cellules contrôles

Des échantillons "contrôles" et "tests" ont été déposés sur un gel et ont subi une coloration à l'argent (Fig. 3.2). La composition des pistes du gel, correspondant aux échantillons "tests" et "contrôles" a été analysée par le densitomètre (Fig. 3.3).

Cette comparaison ne révèle pas de différence massive entre ces 2 échantillons.

#### 3. Etude quantitative du récepteur des LDL dans les cellules "tests" et "contrôles"

Le marquage étant directement proportionnel à la liaison entre le récepteur et la LDL, la mesure du densitomètre pourrait nous apporter une quantification des récepteurs fonctionnels. (Fig. 3.4, 3.5) et (Fig. 3.6, 3.7).

Les surfaces des pics des récepteurs à 130000 ont été estimées afin de mesurer la différence de liaison entre les cellules "tests" et "contrôles".

La liaison des LDL dans les cellules "tests" est diminuée de 59%.

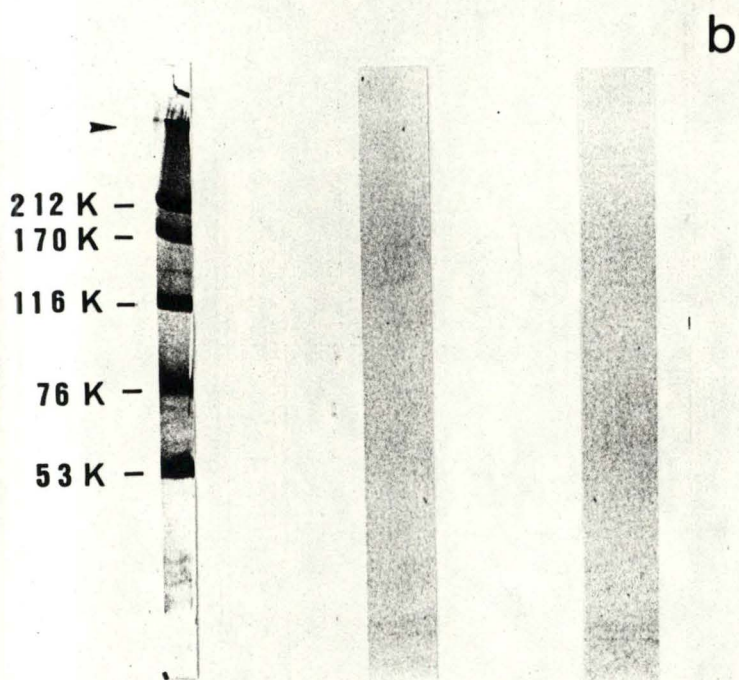
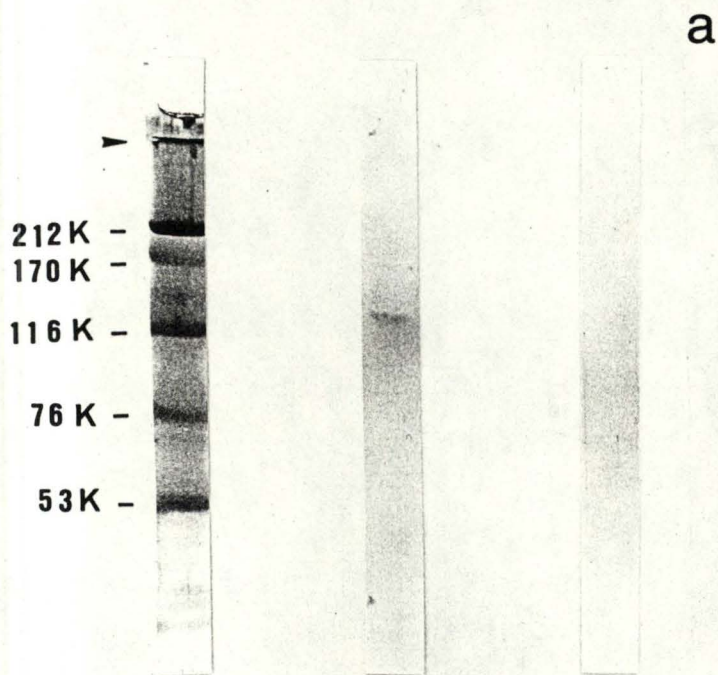


Fig.3.1 Effet de la durée de la révélation dans la solution d'argent sur la détection du récepteur dans les cellules endothéliales oxydées.

Après migration, transfert et incubation avec le conjugué, les échantillons ont été révélés pendant 25 min. (a) ou pendant 40 min. (b).

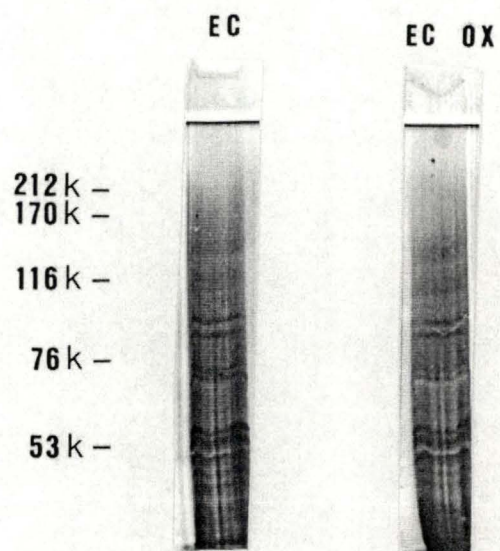


Fig.3.2 Migration des échantillons "tests" et "contrôles" suivie d'une coloration à l'argent.  
On ne détecte pas de différence massive entre les profils des 2 migrations.

Fig.3.3 Profil des migrations correspondantes à la figure 3.2. estimé au densitomètre.





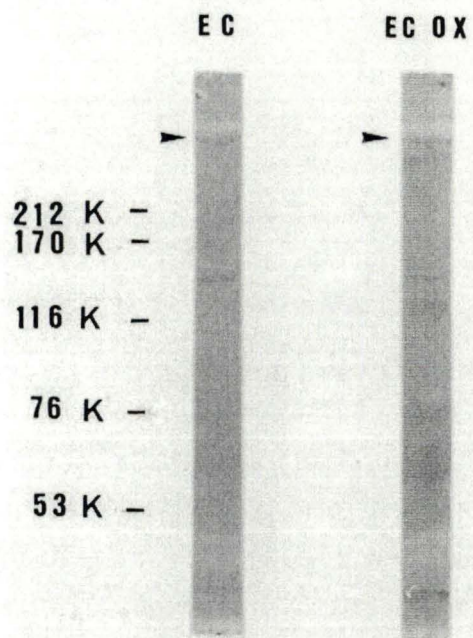


Fig.3.4 Révélation du récepteur dans des cellules oxydées (b) et non oxydées (a).

Les cellules oxydées ont été incubées deux heures avec le système Xanthine/Oxydase. Après solubilisation, migration et transfert, la membrane de NC a été révélée selon la méthode du ligand.

= 1d\fun11\_4.d02  
= Background.

Ge1Scan XL (2.00) 3 May 1989 11:28:26

3.317

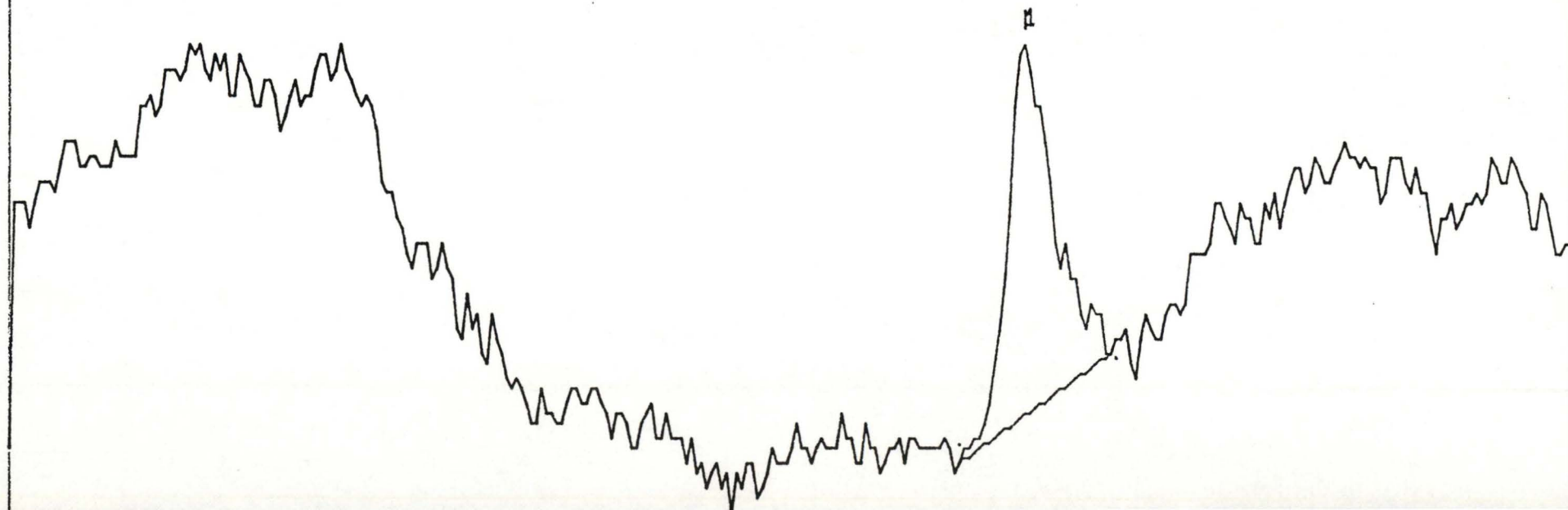


Fig.3.5 Bande correspondant aux cellules endothéliales non oxydées soumises au densitomètre.

Molecular weight report.

Calculation using a parabolic polynomial.

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight Kd
1		90.88	0.057	0.05624	14.7	49.37144
2		92.48	0.062	0.08976	23.4	53.64933
3		92.88	0.065	0.05288	13.8	54.80058
4		93.88	0.059	0.04504	11.8	57.21119
5		94.96	0.053	0.04176	10.9	61.39610
6		95.28	0.053	0.04496	11.7	62.51121
7		106.24	0.069	0.05232	13.7	131.42880

Fig.3.6 Estimation des poids moléculaires des pics retenus en figure 3.5

1d\fun11\_4.d03  
Background.  
3.385

Ge1Scan XL (2.00) 3 May 1989 12:15:03

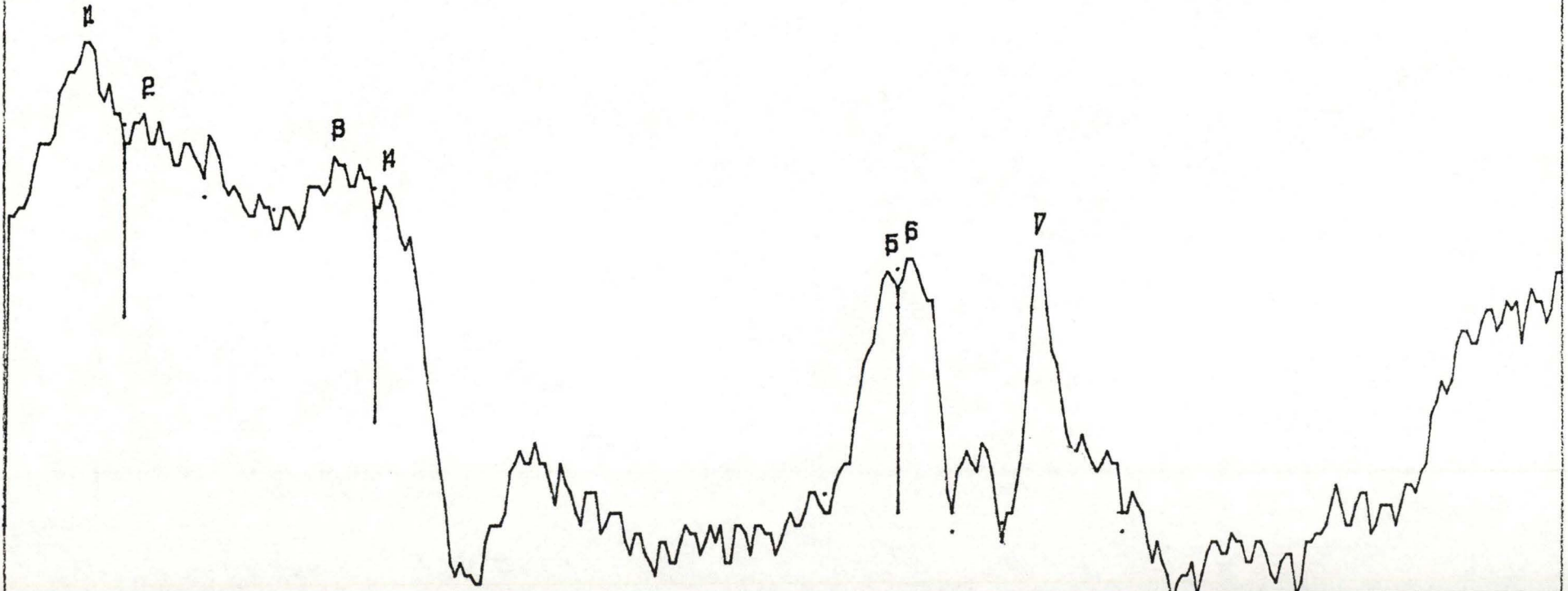


Fig.3.7 Bande correspondant aux cellules endothéliales oxydées soumises au densitomètre.

Molecular weight report.

Calculation using a parabolic polynomial.

No	Component name	Locn mm	Height AU	Area AU*mm	Rel ar %	Mol weight Kd
1		91.28	0.082	0.13448	33.3	50.39445
2		92.24	0.040	0.03312	8.2	52.97499
3		95.28	0.045	0.05272	13.1	62.51121
4		96.08	0.061	0.05464	13.5	65.43092
5		104.16	0.058	0.03848	9.5	111.21530
6		104.48	0.061	0.04056	10.1	113.98210
7		106.56	0.068	0.04928	12.2	135.07900

Fig.3.8 Estimation des poids moléculaires des pics retenus en figure 3.7

## B. Discussions

Les différences entre les profils des échantillons oxydés et non oxydés sont les suivantes :

1°. Dans les cellules endothéliales incubées avec le système Xanthine/Oxydase on observe, après révélation par la méthode du ligand une double bande positive correspondant à des protéines de poids moléculaire inférieur à celui du récepteur dans les cellules "contrôles".

Nous avons déjà discuté ce genre d'observations (voir Chap.II) et nous avons suivi l'hypothèse selon laquelle ces pics pourraient correspondre à des formes immatures du récepteur capables de lier la LDL. Ces bandes positives peuvent également représenter le résultat d'une action protéolytique n'affectant pas la partie liante du récepteur.

Comme ces pics ne s'observent pas dans les cellules endothéliales "contrôles", il semble peut probable que ces hypothèses se vérifient.

Par contre, ces pics pourraient éventuellement résulter de l'action directe des dérivés actifs de l'oxygène sur la protéine qu'est le récepteur. En effet, de nombreux auteurs ont montré la fragmentation d'autres protéines (albumine, collagène, apolipoprotéine B) durant une attaque radicalaire (Davies, 1987; Wolff et al., 1986; Fong et al., 1987) (Cfr. Introduction).

De plus, des produits de la peroxydation des lipides membranaires sont également capables d'engendrer la fragmentation de protéines (Hunt et al., 1988).

Pour détecter le récepteur par la méthode du ligand, le site de liaison doit toujours être intact. Donc, ces bandes devraient correspondre à des récepteurs sur lesquels une action des radicaux libres a eu pour effet de diminuer leur P.M. sans affecter leur site de liaison.

D'après le P.M. correspondant de ces bandes, le clivage devrait s'être produit au niveau de la région des sucres, c'est-à-dire une région extracellulaire. Si tel était le cas, nous n'aurions pas pu retrouver ces protéines qui seraient perdues lors de la solubilisation. Pour expliquer ce phénomène, on peut envisager une autre hypothèse : certains acides aminés oxydés (par ex. : la méthionine) sont des sites favorables pour l'action de protéases. On peut dès lors supposer que si dans nos cellules "tests" soumises à un stress oxydant, de tels résidus se voient oxydés, la présence éventuelle de protéases

pourrait produire un clivage après la solubilisation.

2°. La surface du pic correspondant au récepteur de P.M. 130000 s'avère être plus petite.

La diminution de la surface du pic du récepteur traduit une diminution du nombre de récepteurs fonctionnels.

En étudiant l'influence des radicaux libres sur l'endocytose spécifique des LDL par les cellules endothéliales en culture, Poumay & Ronveaux-Dupal (1988) ont montré une diminution de la liaison des LDL à leur récepteur. Après un temps d'oxydation de 120 min., la liaison de haute affinité semblait être diminuée de manière significative (+ ou - 70%). Le problème qui se posait alors, était de détecter la raison de cette diminution. Soit, elle était due à une réduction du nombre de sites de liaison, soit, elle était due à une diminution de l'accessibilité de ces sites. Etant donné que les modifications morphologiques observées dans ces conditions ne semblent pas empêcher l'accessibilité des LDL à la membrane plasmique, cette dernière hypothèse est donc peu probable. Par contre, une réduction du nombre de sites de liaison, donc du nombre de récepteurs fonctionnels devait pouvoir expliquer la diminution de la liaison des LDL à leur récepteur lors d'un stress oxydatif. Ceci implique une altération du récepteur dans ces conditions.

Dès lors, nous avons essayé dans ce travail de tester cette dernière hypothèse : nous espérons aussi détecter une diminution de cette liaison dans les mêmes conditions à partir de protéines solubilisées et démontrer ainsi que la diminution de la liaison impliquait une perte de la fonction du récepteur lui-même.

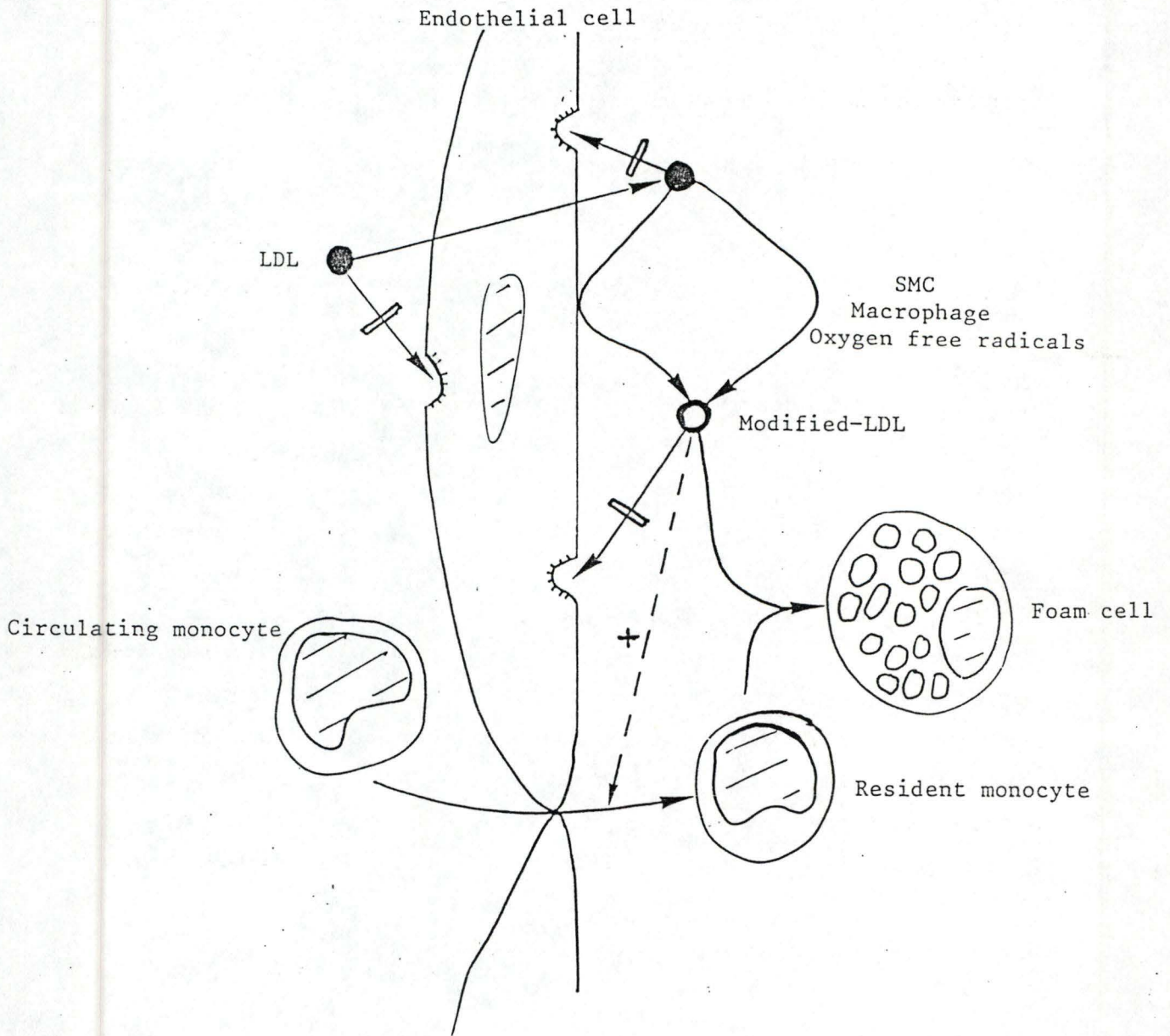
Dans les expériences montrées ici, nous avons mesuré une diminution de liaison de 59%.

Malheureusement, nous n'avons pas eu les possibilités de confirmer ces résultats.

Cependant, on peut se demander quelles pourraient être les conséquences, d'un point de vue plus général, de cette diminution de liaison dans de telles conditions.

# **CONCLUSION**





Dans ce travail, nous avons démontré, par la technique du ligand-blotting, la présence du récepteur spécifique des LDL dans les cellules endothéliales humaines en culture.

Nous avons vu également que ce récepteur exhibait le même P.M. en SDS-PAGE que ce même récepteur dans d'autres types cellulaires humains. Malheureusement, la technique d'immunoblotting s'est avérée infructueuse. L'utilisation d'un AC. commercial monoclonal (Amersham) ou la préparation d'un sérum polyclonal devrait permettre de confirmer l'identification effectuée par ligand-blotting.

Nous avons détecté, également par la technique du ligand-blotting, une diminution du nombre de récepteurs fonctionnels après incubation des cellules endothéliales avec des dérivés actifs de l'oxygène. Cependant, comment peut-on relier ce phénomène dans le cadre plus général de l'athérosclérose ?

Les cellules les plus caractéristiques des lésions primaires sont les "foam cells" (macrophages chargés de lipides) qui possèdent un récepteur spécifique pour les LDL modifiées (récepteur "scavenger").

Dans leurs travaux, Poumay & Ronveaux-Dupal (1988) ont montré que les radicaux libres avaient pour effet de diminuer le processus d'endocytose spécifique des LDL et notamment la liaison spécifique des LDL à leur récepteur au niveau de cellules endothéliales.

Selon ce schéma, l'accumulation des LDL dans l'espace sous-endothélial serait favorisée. (cfr. figure ci contre). Ceci peut augmenter le nombre de LDL modifiées et favoriser la formation des "foam cells", ce qui est en faveur du développement d'une lésion primaire.

Selon cette hypothèse, le développement de l'athérosclérose nécessite donc la production de radicaux libres à proximité des cellules endothéliales.

Tout d'abord, les leucocytes activés peuvent engendrer ce phénomène, mais dans ce cas, on observe après un certain temps une lyse des cellules endothéliales. Cependant, lors du développement de l'athérosclérose, les cellules endothéliales sont toujours présentes pour couvrir la lésion.

Or, par ailleurs, des auteurs ont montré que les cellules endothéliales activées pouvaient produire elles-mêmes des radicaux libres (Ryan et Vann, 1987), et en conséquence, les cellules endothéliales seraient

non seulement la cible des radicaux libres, mais aussi la source de ces radicaux libres.

Voici donc une situation idéale où l'on pourrait avoir une altération du récepteur par les radicaux libres; leur perte de fonction créerait localement une situation similaire à celle rencontrée dans l'hypercholestérolémie familiale, où l'on sait que l'athérosclérose se développe dès le plus jeune âge.

## Bibliographie

- Anderson, R.G.W., Vasile, E., Mello, R.J., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1978).  
Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts : relation to low density lipoprotein receptor distribution.  
Cell, 15, 919-933.
- Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. & Brown, M.S. (1981).  
Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts.  
Cell, 24, 493-502.
- Beisiegel, U., Schneider, W.J., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. & Brown, M.S. (1981).  
Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia.  
J. Biol. Chem., 256, 11923-11931.
- Beisiegel, U., Schneider, W.J., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1982).  
Immunoblot analysis of low density lipoprotein receptors in fibroblasts from subjects with familial hypercholesterolemia.  
J. Biol. Chem., 257, 13150-13156.
- Beisiegel, U., Kita, T., Anderson, R.G.W., Schneider, W.J., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1981).  
Immunologic cross-reactivity of the low density lipoprotein receptor from bovine adrenal cortex, human fibroblasts, canine liver and adrenal gland, and rat liver.  
J. Biol. Chem., 256, 4071-4078.
- Benditt, E.P. & Benditt, J.M. (1973).  
Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerosis plaques.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70, 1753-1756.
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1984).  
How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis ?  
Scientific American, 251, 52-60.
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1981).  
Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors.  
N. Engl. J. Med., 305, 515-517.
- Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Basu, S.K. & Goldstein, J.L. (1982).

Recycling of cell-surface receptors : observations from the LDL receptor system.

Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 46, 713-721.

Brown, M.S., Anderson, R.G.W. & Goldstein, J.L. (1983).  
Recycling receptors : the round-trip itinerary of migrant membrane proteins.  
Cell, 32, 663-667.

Brown, M.S., Dana, S.E. & Goldstein, J.L. (1974).  
Regulation of 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygote familial hypercholesterolemia.  
J. Biol. Chem., 249, 789-796.

Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1975).  
Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts.  
Cell, 6, 307-316.

Brown, M.S., Petri, T.K. & Goldstein, J.L. (1981).  
Regulation of plasma cholesterol by lipoproteins receptors.  
Science, 212, 628-635.

Coetzee, G.A., Stein, O. & Stein, Y. (1979).  
Uptake and degradation of low density lipoproteins(LDL) by confluent, contact-inhibited bovine and human endothelial cells exposed to physiological concentration of LDL.  
Atherosclerosis, 33, 425-431.

Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hopgoos, K.K., Tolleshaug, H., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1983).  
Biosynthesis of N- and O- linked digosaccharides of the low density lipoprotein receptor.  
J. Biol. Chem., 258, 15261-15273.

Daneels, G., Moeremans, M., De Raeymacker, M. & De Mey, J. (1986).  
Sequential immunostaining (gold/silver) and complete protein staining (AuroDye) on Western Blots.  
J. Immunol. Methods, 89, 89-91.

Daniel, T.O., Schneider, W.J., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1983).  
Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting.  
J. Biol. Chem., 258, 4606-4611.

Davies, K.J.A. (1987).  
Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects.  
J. Biol. Chem., 262, 20, 9895-9901.

- Davies, K.J.A. & Delsignore, M.E. (1987).  
Protein damage and degradation by oxygen radicals. III.  
Modification of secondary and tertiary structure.  
J. Biol. Chem., 262, 9908-9913.
- Davies, K.J.A., Delsignore, M.E. & Lin, S.W. (1987).  
Protein damage and degradation by oxygen radicals. II.  
Modification of amino-acids.  
J. Biol. Chem., 262, 9902-9907.
- De Loof, H., Rosseneu, M., Brasseur, R. & Ruyschaert, J.-M.  
(1986).  
Use of hydrophobicity profiles to predict receptor  
binding domains on apolipoprotein E and the low density  
lipoprotein apolipoprotein B-E receptor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2295-2299.
- Fielding, P.E., Vlodavsky, I., Gospodarowicz, D. & Fielding,  
C.J. (1979).  
Effects of contact inhibition on the regulation of  
cholesterol metabolism in cultured vascular endothelial  
cells.  
J. Biol. Chem., 254, 749-755.
- 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.
- Freeman, B.A., Rosen, G.M. & Barber, M.J. (1986).  
Superoxide perturbation of the organization of vascular  
endothelial cell membranes.  
J. Biol. Chem., 261, 6590-6593.
- Freeman, B.A. & Crapo, J.D. (1982).  
Free radicals and tissue injury.  
Lab. Invest., 47, 412-426.
- Freeman, B.A., Turrens, J.F., Mirza, Z., Crapo, J.D. &  
Young, S.L. (1985).  
Modulation of oxidant lung injury by using  
liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase.  
Fed. Proc., 44, 2591-2595.
- Friedman, G., Wernette-Hammond, M.E., Hui, D.Y., Mahley,  
R.W. & Innerarity, T.L. (1987).  
Characterization of lipoprotein receptors on rat FU5AH  
hepatoma cells.  
J. Lipid Res., 28, 1482-1497.
- 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.

- Gershoni, J.M. & Palade, G.E. (1983).  
Protein blotting : principles and applications. .  
Anal. Biochem., 131, 1-15.
- Gherardi, E., Brugni, N.S. & Bowyer, D.E. (1988).  
Purification of low density lipoprotein receptor from  
liver and its quantification by anti-receptor  
monoclonal antibodies.  
Biochem. J., 253, 409-415.
- Gianturco, S.H. & Bradley, W.A. (1987).  
Lipoprotein receptors.  
in Plasma lipoproteins (Gotto, A.M., ed.) p. 183-214,  
Elsevier Publisher, Amsterdam.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1974).  
Binding and degradation of low density lipoproteins by  
cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a  
normal subject and from a patient with homozygous  
familial hypercholesterolemia.  
J. Biol. Chem., 16, 5153-5162.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. & Brown, M.S. (1979).  
Binding site on macrophages that mediates uptake and  
degradation on acetylated low density lipoprotein,  
producing massive cholesterol deposition.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 333-337.
- Goldstein, J.L., Kita, T. & Brown, M.S. (1983).  
Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. -  
Lessons from an animal counterpart of familial  
hypercholesterolemia.  
N. Engl. J. Med., 309, 288-296.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977).  
Genetics of the LDL receptor : evidence that the  
mutations affecting binding and internalization are  
allelic.  
Cell, 12, 629-641.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1985).  
The LDL receptor and the regulation of cellular  
cholesterol metabolism.  
J. Cell Sci., suppl. 3, 131-137.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977).  
The low-density lipoprotein pathway and its relation to  
atherosclerosis.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 897-930.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Russel, D.W.  
& Schneider, W.J. (1985).  
Receptor-mediated endocytosis : concepts emerging from  
the LDL receptor system.  
Ann. Rev. Cell Biol., 1, 1-39.

- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.L. (1984).  
Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.  
Biochem. J., 219, 1-14.
- Handley, D.A., Arbeeny, C.M., Witte, L.D. & Chien, S. (1981).  
Colloidal gold-low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 368-371.
- Harlan, J.M., Killer, P.D., Harker, L.A., Striker, G.E. & Wright, D.G. (1981).  
Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. Mechanisms of cell detachment.  
J. Clin. Invest., 68, 1394-1403.
- Havinga, J.R., Lohse, P. & Beisiegel, U. (1987).  
Immunoblotting and ligand blotting of the low-density lipoprotein receptor of human liver, HepG2 cells and HeLa cells.  
FEBS Lett., 216, 275-280.
- Hennig, B. & Chow, C.K. (1988).  
Lipid peroxidation and endothelial cell injury : implications in atherosclerosis.  
Free Radic. Biol. Med., 4, 99-106.
- Henriksen, T., Mahoney, E.M. & Steinberg, D. (1981).  
Enhanced macrophage of degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells : recognition by receptors for acetylated low density lipoprotein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 6499-6503.
- Hesz, A., Ingolic, E., Krempler, F. & Kostner, G.M. (1987).  
The existence of B/E & E receptors on HEP-G2 cells : a study using colloidal Gold- and 125I- labelled lipoproteins.  
Exp. Mol. Pathol., 46, 372-382.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985).  
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.  
Electrophoresis, 6, 103-112.
- Hoover, R.L. & Karnovski, M.J. (1984).  
Adhesive interactions between polymorphonuclear leukocytes on endothelium.  
in Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., ed.) PP. 277-285, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, M.A.
- Hunt, J.V., Simpson, J.A. & Dean, R.T. (1988).  
Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins.  
Biochem. J., 250, 87-93.



- Innerarity, T.L. & Mahley, R.W. (1978).  
Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins.  
*Biochemistry*, 17, 1440-1447.
- Jaffe, E.A. (1984).  
Synthesis of factor VIII by endothelial cells.  
in *Biology of endothelial cells*(Jaffe, E.A., ed.)  
pp.209-214, Martinus Nijhoff publishers, Boston, M.A.
- Kannel, W.B., Castelli, W.P., Gordon, T. & Mc Namara, P.M. (1971).  
Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease : the Framingham study.  
*Ann. Intern. Med.*, 74, 1-12.
- Mahley, R.W. & Innerarity, T.L. (1983).  
Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 737, 197-222.
- Mc Cord, J.M. (1985).  
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.  
*N. Engl. J. Med.*, 312, 159-163.
- Mills, G.L., Lane, P.A. & Weech, P.K. (1984).  
A guidebook to lipoprotein technique.  
in *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Vol. 14 (Burdon, R.H. & Van Knippenberg, P.H., eds), Elsevier, Amsterdam, 512 p.
- Mommaas-Kienhuis, A.M., Krijbolder, L.H., Van Hinsbergh, V.W.M., Daems, W.Th. & Vermeer, B.J. (1985).  
Visualization of binding and receptor-mediated uptake of low density lipoproteins by human endothelial cells.  
*Eur. J. Cell Biol.*, 36, 201-208.
- Moncada, S., Gryglewski, R.J., Bunting, S. & Vane, J.R. (1976).  
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.  
*Nature*, 263, 663-665.
- Niwa, Y., Miyaka, S., Sakane, T., Shingu, M. & Yokoyama, M. (1982).  
Auto-oxidative damage in Behçets's disease. Endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 49, 247-255.
- Nordøy, A., Svensson, B., Wiebe, D. & Hook, J.C. (1978).  
Lipoproteins and the inhibitory effect of human endothelial cells on platelet function.  
*Circ. Res.*, 43, 527-534.

- Pangburn, S.H., Newton, R.S., Chang, C-M., Weinstein, D.B. & Steinberg, D. (1981).  
Receptor-mediated catabolism of homologous low density lipoproteins in cultured pig hepatocytes.  
J. Biol. Chem., 256, 3340-3347.
- 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.
- Pearse, B.M.F. (1976).  
Clathrin : a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1255-1259.
- Pitas, R.E., Innerarity, T.L., Arnold, K.S. & Mahler, R.W. (1979).  
Role and equilibrium constants for binding of apo-E HDLc (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoprotein to human fibroblasts : evidence for multiple receptor binding of apo-E HDLc.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 2311-2315.
- Poumay, Y. (1988).  
Contribution à l'étude de l'athérogenèse. Effets des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des lipoprotéines de faible densité par les cellules endothéliales humaines en culture.  
Thèse de Doctorat. Facultés Universitaires N-D de la Paix, Namur.
- Poumay, Y. & Ronveaux-Dupal, M.F. (1988).  
Incubation of endothelial cells in a superoxide-generating system : impaired low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis.  
J. Cell Physiol., 136, 289-296.
- Poumay, Y. & Ronveaux-Dupal, M.-F. (1985).  
Morphological studies of the cellular processing of the low density lipoproteins in endothelial cells.  
Arch. Biol., 96, 500.
- Poumay, Y. & Ronveaux-Dupal, M.-F. (1985).  
Rapid preparative isolation of low density lipoproteins and of lipoprotein-deficient serum using vertical rotor gradient ultracentrifugation.  
J. Lipid Res., 136, 289-296.
- Roach, P.D., Zollinger, M. & Noël, S.P. (1987).  
Detection of the low density lipoprotein (LDL) receptor on nitrocellulose paper with colloidal gold-LDL conjugates.  
J. Lipid Res., 28, 1515-1521.

- Roach, P.D. & Noël, S.P. (1985).  
Solubilization of the 17 alpha-ethinyl  
estradiol-stimulated low density lipoprotein receptor  
of male rat liver.  
J. Lipid Res., 26, 713-720.
- 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.
- Russell, D.W., Schneider, W.J., Yamamoto, T., Luskey, K.L.,  
Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1984).  
Domain map of the LDL receptor : sequence homology with  
the epidermal growth factor precursor.  
Cell, 37, 577-585.
- Ryan, U.S. & Vann, J.M. (1988).  
Endothelial cells : a source and target of oxidant  
damage.  
in Oxygen radicals in biology and medicine, Basic life  
sciences, vol.49 (Simic, M.G., Taylor, K.A., Ward,  
J.F. & von Sonntag, C., eds), . 963-968.
- Satoshi, S., Tadashi, S., Takashi, Y., Kimitoshi, K.,  
Mayumi, O. & Michikiko, K. (1988).  
A new class mutation of low density lipoprotein  
receptor with altered carbohydrate chain.  
J. Biol. Chem., 263, 19286-19289.
- Schneider, W.J., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1980).  
Partial purification and characterization of the low  
density lipoprotein receptor from bovine adrenal  
cortex.  
J. Biol. Chem., 255, 11442-11447.
- Schneider, W.J., Basu, S.K., Mc Phaul, M.J., Goldstein, J.L.  
& Brown, M.S. (1979).  
Solubilization of the low density lipoprotein receptor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5577-5581.
- Schneider, W.J., Slaughter, C.J., Goldstein, J.L., Anderson,  
R.G.W., Capra, J.D. & Brown, M.S. (1983).  
Use of antipeptide antibodies to demonstrate external  
orientation of the NH<sub>2</sub>-terminus of the low density  
lipoprotein receptor in the plasma membrane of  
fibroblasts.  
J. Cell Biol., 97, 1635-1640.
- Semenkovich, C.F. & Ostlund, R.E. (1987).  
Estrogens induce low-density lipoprotein receptor  
activity and decrease intracellular cholesterol in  
human hepatoma cell line HepG2.  
Biochemistry, 26, 4987-4992.

- Shasby, D.M., Lind, S.E., Shasby, S.S., Goldsmith, J.L. & Hunninghake, G.W. (1985).  
Reversible oxidant-induced increases in albumin transfer across cultured endothelium : alterations in cell shape and calcium homeostasis.  
*Blood*, 65, 605-614.
- Shingu, M., Yoshioka, K., Nosunaga, M. & Yoshida, K. (1985).  
Human vascular smooth muscle cells and endothelial cells lack catalase activity and are susceptible to hydrogen peroxide.  
*Inflammation*, 9, 309-320.
- Slater, T.F. (1984).  
Free-radical mechanism in tissue injury.  
*Biochem. J.*, 222, 715.
- Soutar, A.K., Harders-Spengel, K., Wade, D.P. & Knight, B.L. (1986).  
Detection and quantification of low density lipoprotein (LDL) receptors in human liver by ligand blotting, immunoblotting, and radioimmunoassay.  
*J. Biol. Chem.*, 261, 17127-17133.
- Starke, P.E., Hoek, J.B. & Farber, J.L. (1986).  
Calcium dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 261, 3006-3012.
- Stein, O. & Stein, Y. (1976).  
High density lipoprotein reduce the uptake of low density lipoproteins by human endothelial cells in culture.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 431, 363-368.
- Stein, O., Leitersdorf, E. & Stein, Y. (1985).  
Verapamil enhances receptor-mediated endocytosis of low density lipoproteins by aortic cells in culture.  
*Arteriosclerosis*, 5, 35-44.
- Steinberg, D. (1987).  
Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis.  
*Circulation*, 76, 508-514.
- Thorgeirsson, G. (1983).  
Structure and morphological features of vascular endothelium.  
in *Biochemical interactions at the endothelium* (Cryer, A., ed.), pp. 5-39. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands.
- Tolleshaug, H., Goldstein, J.L., Schneider, W.J. & Brown, M.S. (1982).  
Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia.

Tolleshaug, H., Hobgood, K.K., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1983).

The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia : multiple mutation disrupt transport and processing of a membrane receptor.

Cell, 32, 941-951.

Van Driel, I.R., Goldstein, J.L., Südhof, T.C. & Brown, M.S. (1987).

First Cystein-rich repeat in ligand-binding domain of low density lipoprotein receptor binds  $Ca^{2+}$  and monoclonal antibodies but not lipoproteins.

J. Biol. Chem., 262, 17443-17449.

Van Hinsberh, 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.

Vasile, E., Antoche, F., Simionescu, M. & Simionescu, N. (1989).

Transport pathways of  $\beta$ -VLDL by aortic endothelium of normal and hypercholesterolemic rabbits.

Atherosclerosis, 75, 195-210.

Vasile, E., Simionescu, M. & Simionescu, N. (1983).

Visualization of the binding, endocytosis and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ.

J. Cell Biol., 96, 1677-1689.

Vlodavsky, I., Fielding, P.E. & Gospodarowicz, D. (1978).

Role of contact inhibition in the regulation of receptor-mediated uptake of low density lipoprotein in cultured vascular endothelial cell.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 356-360.

Wade, D.P., Knight, B.L. & Soutar, A.K. (1986).

Binding of low density lipoprotein and chylomicrons remnants to the hepatic low-density lipoprotein receptor of doop, rats and rabbits demonstrated by ligand blotting.

Eur. J. Biochem., 159, 333-340.

Wade, D.P., Knight, B.L. & Soutar, A.K. (1985).

Detection of the low-density lipoprotein receptor with biotin-low-density lipoprotein.

Biochem. J., 229, 785-790.

Weber, K. & Osborn, M. (1969).

The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.

- Weibel, E.R. & Palade, G.E. (1964).  
New Cytoplasmic components in arterial endothelia.  
*J. Cell Biol.*, 23, 101-112.
- Weinstein, D.B., Carew, T.E. & Steinberg, D. (1976).  
Uptake and degradation of low density lipoprotein by  
swine arterial smooth muscle cells with inhibition of  
cholesterol biosynthesis.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 424, 404-421.
- Weiss, S.J., Young, J., Labuglio, A.F., Slivka, A. & Nimeh,  
N.F. (1981).  
Role of hydrogen peroxide in neutrophil mediated  
destruction of cultured endothelial cells.  
*J. Clin. Invest.*, 68, 714-721.
- Welsh, M.J., Shasby, D.M. & Husted, R.M. (1985).  
Oxidants increase paracellular permeability in a  
cultured epithelial cell line.  
*J. Clin. Invest.*, 76, 1155-1168.
- Wissler, R.W. (1979).  
The emerging cellular pathobiology of atherosclerosis.  
*Artery*, 5, 409-423.
- Wolff, S.P. & Dean, R.T. (1986).  
Fragmentation of proteins by free radicals and its  
effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis.  
*Biochem. J.*, 234, 399-403.
- Wolff, S.P., Garner, A. & Dean, R.T. (1986).  
Free radicals, lipids and protein degradation.  
*Trends Biochem. Sci.*, 11, 27-31.
- World Health Organization Study Group. (1958).  
Classification of atherosclerotic lesions.  
W.H.O. Technical report series N°143, W.H.O., Genève.
- Yamamoto, T., Davis, L.G., Brown, M.S., Schneider, W.J.,  
Casey, M.L., Goldstein, J.L. & Russell, D.W. (1984).  
The human LDL receptor : a cysteine-rich protein with  
multiple Aln sequences in its mRNA.  
*Cell*, 39, 27-38.
- Yang, L-Y., Chen, S-H, Gianturco, S.H., Bradley, W.A.,  
Sparrow, J.T., Tanimura, M., Li, W-H, Sparrow, D.A.,  
DeLoof, H., Rosseneu, M., Lee, F-S, Gu, Z-W, Gotto, A.M  
& Chan, L. (1986).  
Sequence structure receptor-binding domains and  
internal repeats of human apolipoprotein B-100.  
*Nature*, 323, 738-742.