



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de l'athérogenèse. 7: Etude la liaison des lipoprotéines de haute densité (HDL) aux cellules endothéliales humaines en culture

Lamotte, Karine

Award date:
1990

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.

Contribution à l'étude de l'athérogenèse. VII. Etude de la liaison des lipoprotéines de haute densité (HDL) aux cellules endothéliales humaines en culture.

LAMOTTE Karine

Résumé

De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'existence d'une corrélation négative entre le taux de HDL plasmatiques et le développement de maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose.

Il semble que les HDL assurent une protection contre ce type de maladies en facilitant l'efflux de cholestérol à partir des cellules de la paroi artérielle et en jouant ainsi un rôle dans l'élimination du cholestérol via le "reverse cholesterol transport".

Dans ce mémoire, nous avons pu mettre en évidence, par des études biochimiques, l'existence de sites de liaison spécifiques pour les HDL sur les cellules endothéliales humaines. Aucune induction de ce site, par le cholestérol, n'a été observée, contrairement à d'autres types cellulaires, mais des études morphologiques ont révélé une altération importante des cellules quand celles-ci sont cultivées dans un milieu enrichi en cholestérol non lipoprotéique.

Mémoire de licence en sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur : M.-F. Ronveaux-Dupai

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Contribution à l'étude de l'athérogenèse. VII Etude de la liaison des lipoprotéines de haute densité (HDL) aux cellules endothéliales humaines en culture.

LAMOTTE Karine

Summary:

A strong inverse correlation exists between levels of HDL-cholesterol and rates of CHD in high risks populations.

One unresolved issue is whether reduction of HDL levels by diet will promote development of atherosclerosis or whether dietary reduction of serum HDL concentration is benign.

HDL is thought by many to be an acceptor of cholesterol in peripheral tissues and this could be the first step in reverse cholesterol transport, that is the process whereby cholesterol is transported from peripheral tissues to the liver for its secretion.

In this work, we studied the binding of total HDL fraction or apo E-free HDL3 subfraction to cultured human umbilical vein endothelial cells. It is shown that this binding is partly a saturable process (evidence was obtained for a specific, high affinity binding site with K_d and B_{max} values respectively in the ranges $6,8 \mu\text{g}$ of HDL/ml and $316,69 \text{ ng}$ of HDL/mg de protéine cellulaire) and partly a low affinity, non specific process, depending on the HDL concentrations in the medium.

Up-regulation of the HDL-binding sites could not be induced by loading the cells with cholesterol/albumin complexes.

The morphological demonstration of the specific binding sites was unsuccessful until now.

We also attempted to find a better way to isolate HDL3 subfraction in a shorter time.

Mémoire de licence en sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur : M.-F. Ronveaux-Dupal

Arrivée au terme de ce mémoire, je tiens à remercier Madame Ronveaux de m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire, de m'avoir guidée tout au long de l'année et sans qui la réalisation de ce travail n'eût pas été possible.

Je remercie Rose pour l'aide considérable qu'elle m'a apportée au cours de cette année, ainsi que Madame Hennin, Noëlle, Ariane, Françoise, Michel, Isabelle et Daniel pour leur disponibilité, leurs nombreux encouragements et tous ces services qu'ils m'ont rendus.

Je remercie également Monsieur et Madame Mazière de m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire et de leurs bons conseils.

Je remercie Martine Auclair pour son aide technique, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie également Edouard Delaive, Monsieur Dubois, Anne Tibor, Madame Mertens, Chantal Davignon, Marie-Paule Peltgen et Monsieur Collet pour leur collaboration, l'aide matérielle et technique qu'ils m'ont apportées et surtout pour tous leurs bons conseils.

Je remercie plus particulièrement toute ma famille de m'avoir aidé à surmonter les épreuves rencontrées tout au long de ces études.

Mes remerciements les plus sincères vont à mes parents qui m'ont permis de réaliser ces études mais surtout, qui ont accepté d'élever mon fils Benjamin au cours de ces dernières années. Sans eux, rien n'eût été possible.

TABLE DES MATIERES :

Introduction	
1. L'athérosclérose	1
1.1 Définition	1
1.2. Description des lésions	1
1.3. Hypothèses pathogénétiques	2
1.4. Athérogenèse et rôle des lipoprotéines	3
1.4.1. Rôle de l'hypercholestérolémie	
1.4.2. Corrélation négative entre HDL et athérosclérose	
1.5. Intervention d'autres facteurs dans l'accumulation intraartérielle de cholestérol	
2. Le métabolisme du cholestérol	6
2.1. Le cholestérol dans les cellules	6
2.1.1. Le cholestérol non estérifié	
2.1.2. Les esters de cholestérols	
2.1.3. Régulation du cholestérol non estérifié membranaire	
2.2. Le cholestérol dans les fluides biologiques	7
2.2.1. Le cholestérol plasmatique	
2.2.1.1. Caractéristiques des différentes lipoprotéines et de leur métabolisme	
2.2.1.2. Fonctions des différentes apolipoprotéines	
2.2.2. Les sels biliaires	
2.3. Transport et mobilisation cellulaires du cholestérol	14
2.3.1 Les influx	
2.3.1.1. Voie endogène ou synthèse du cholestérol in situ	
2.3.1.2. La voie exogène	

2.3.2. Les efflux	
2.3.2.1. La synthèse d'hormones stéroïdes	
2.3.2.2. Le "reverse cholesterol transport"	
2.3.3. Rôle des HDL dans le "reverse cholesterol transport"	
2.4. Mobilisation du cholestérol dans le plasma	19
2.4.1. La lipoprotéine lipase	
2.4.2. La lipase hépatique	
2.4.3. La LCAT	
3. Le transport du cholestérol et athérosclérose	21
3.1. Les lipoprotéines athérogénétiques	21
3.1.1. Les B-VLDL	
3.1.2. Les LDL modifiées	
3.2. Anomalies du "reverse cholesterol transport"	24
3.2.1. Déficience en LCAT	
3.2.2. Déficience en HDL	
But du travail	24
Matériel et méthode	25
1. Culture de cellules endothéliales humaines	25
1.1. Origine et isolement des cellules endothéliales	25
1.2. Le repiquage	25
2. Expériences de microscope électronique	26
2.1. Isolement des HDL	
2.1.1. Dosage des HDL	
2.1.2. Préparation du sérum déficient en lipoprotéines (LPDS)	

1. Fractionnement du LPDS	
2. Dosage du cholestérol	
2.2. Conjugué HDL-or colloïdal 28	
2.2.1. Préparation des particules d'or de 17nm	
2.2.2. Préparation du conjugué HDL-or	
2.3. Observation du conjugué et des HDL en coloration négative	31
2.4. Etude de la liaison du conjugué avec les cellules endothéliales	
2.4.1. Etude de la liaison	
2.4.2. Effet du cholestérol	
2.5. Préparation des cellules endothéliales en culture pour l'observation en microscopie électronique à transmission	32
2.5.1. Fixation des cellules	
2.5.2. Post-fixation	
2.5.3. Déshydratation et enrobage	
3. Expériences de liaison avec HDL3 sans apo E-free iodinisées	33
3.1. Isolement des HDL3	33
3.2. Chromatographie d'affinité pour le retrait de l'apo E	33
3.3. Iodination des HDL3 apo E-free et mesure de l'activité spécifiques	34
3.3.1. Iodination des HDL3	
3.3.2. Mesure de l'activité spécifique	
3.4. Expériences de liaison	35
3.4.1. Préparation des cellules endothéliales	
3.4.2. Etudes de la liaison	
3.4.3. Etudes de la liaison à 37°C	

4. Essai de mise au point d'une technique d'isolement des HDL3	30
4.1. Méthode utilisant un gradient linéaire de KBr et le rotor Vti 50	
4.2. Méthode utilisant un gradient linéaire de KBr, les rotors TI60 et VTI 50	37
4.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-Page)	38
4.3.1. Préparation des gels	
A) gel de séparation	
B) gel d'empilement	
4.3.2. Préparation des échantillons	
4.3.3. Electrophorèse	
 Résultats et commentaires:	 41
 1. Identification des cellules endothéliales en culture:	 41
2. Etude morphologique de l'interaction entre les cellules endothéliales et les HDL.:	
	41
2.1 Isolement des HDL	41
2.2 Mise au point du marquage des HDL à l'or colloïdal:	42
2.2.1 Observation des particules d'or:	
2.2.2 Le conjugué HDL- or colloïdal:	
2.3 Etude morphologique de la liaison des HDL aux cellules endothéliales humaines:	46
2.4. Etude biochimique de la liaison des HDL3 Apo E-free aux cellules endothéliales humaines	49
2.4.1 Iodination des HDL3 apo E-free:	

2.4.2 Résultats des expériences de liaison avec ^{125}I -HDL3 apo E-free:

3. ESSAI DE MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE SÉPARATION DES HDL3

	51
3.1 Technique n°1:	52
3.2 Technique n°2:	52
3.2.1 Centrifugation n°1:	
3.2.2 Centrifugation n°2:	
3.2.3 Centrifugation n°3:	
3.2.4 Centrifugation n°4:	
Discussion et perspectives:	57
4.1 Liaison des HDL aux membranes cellulaires:	57
4.1.1 Liaison des HDL aux membranes cellulaires en général:	
4.1.2 Liaison des HDL aux cellules endothéliales:	
4.2. Interaction des HDL3 avec leurs récepteurs:	59
4.2.1 Caractéristiques de la protéine de liaison des HDL3:	
4.2.2. Comment se réalise l'interaction entre HDL3 apo E free et le "récepteur":	
4.3. Rôle du cholestérol:	60
4.4 Efflux de cholestérol cellulaire médié par le récepteur HDL et sa régulation:	61
5. Expériences de morphologie:	62
5.1. Or colloïdal et conjugué HDL-or:	62
5.2. Expériences de morphologie:	63
6. Isolement des HDL3:	65

Introduction:

1 L'athérosclérose:

1.1. Définition:

L'athérosclérose est une maladie des artères qui touche particulièrement l'intima des gros vaisseaux. Elle consiste en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de dérivés sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires: le tout pouvant être accompagné de modifications de la média (Capron, 1983).

1.2. Description des lésions:

On distingue trois types de lésions correspondant à des stades successifs dans l'évolution de la maladie.

Dès le plus jeune âge, il apparaît, à certains endroits du système artériel, des lésions jaunâtres appelées stries lipidiques. Elles se caractérisent par un épaississement local de l'intima suite à l'accumulation, dans la couche sous-endothéliale, de cellules musculaires lisses, de lipophages (cellules riches en dépôts lipidiques) et d'une matrice extracellulaire constituée de protéoglycans.

La strie va évoluer en une plaque fibreuse qui constitue la lésion la plus caractéristique de l'athérosclérose avancée. Celle-ci est constituée d'un "core" riche en lipides, principalement des cristaux de cholestérol, en protéoglycans et en débris cellulaires. Une coiffe fibreuse composée de cellules musculaires lisses, de collagène, de lipides intra et extracellulaires et de fibroblastes peut recouvrir le "core".

Le troisième type de lésion est appelée lésion compliquée. A la base de l'implantation de la plaque, il se produit une calcification donnant lieu à une plaque calcaire. Ce type de lésion est souvent associée à un phénomène obstructif pouvant donner lieu à des hémorragies, des ulcérations ou des thromboses.

1.3. Hypothèses pathogéniques:

1.3.1. L'hypothèse de la lésion de l'endothélium:

Au 19^{es}. Virchow (1856) interprète l'athérosclérose comme une réponse inflammatoire à une lésion de la paroi artérielle. Selon cette hypothèse, la formation de dépôts de cholestérol résulte de l'infiltration dans la paroi artérielle de lipides sanguins. Ces dépôts provoquent une irritation de la paroi, celle-ci réagit par une inflammation, et une prolifération des cellules, précédant les modifications dégénératives de la paroi artérielle.

Ross et Glomset (1973) montrent que lors de l'aggrégation plaquettaire provoquée par la lésion endothéliale, les thrombocytes synthétisent et libèrent un facteur mitogène qui, avec les autres constituants du sang, pénètre dans la paroi artérielle où il provoque la prolifération des cellules musculaires lisses de l'intima.

1.3.2. Hypothèse monoclonale:

Benditt et Benditt (1973) présentent certaines évidences selon lesquelles la prolifération des cellules musculaires lisses dans la lésion ressemblerait à l'établissement d'une tumeur bénigne dérivant d'une seule cellule. Celle-ci aurait subi une mutation à la base de sa prolifération anarchique.

1.3.3. Hypothèse de l'infiltration lipidique:

Anitschkov (1913), chercheur russe, provoque chez les lapins une maladie semblable à l'athérosclérose humaine en utilisant pour leur alimentation du cholestérol et du jaune d'oeuf. Par cette expérience, il a pu démontrer que les lipides apparaissent très tôt dans les lésions artérielles et dérivent des lipides sanguins.

Goldstein et Brown (1977), montrent que dans l'hypercholestérolémie, suite à l'absence ou à une déficience de

récepteurs pour les LDL, les cellules de la paroi artérielle sont incapables de dégrader complètement les molécules lipidiques.

1.3.4. Hypothèse lysosomale:

Selon de Duve et ses collaborateurs (1974), le manque d'activité des estérases lysosomales conduirait à une dégradation insuffisante des LDL au niveau des plaques atheromateuses.

1.3.5. Hypothèse du stress oxydant:

Steinberg (1987) et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que les dérivés actifs de l'oxygène entraînent des modifications dans la structure des lipoprotéines, ce qui permettrait leur reconnaissance par des récepteurs présents sur les macrophages du tissu sous-endothelial et ainsi l'apparition des lipophages dans l'intima.

1.4. Athérogenèse et rôle des lipoprotéines:

1.4.1. Rôle de l'hypercholestérolémie:

Il est actuellement indubitable que l'hypercholestérolémie peut, dans certains cas, être une cause nécessaire et suffisante au développement d'une atherosclérose prématurée. Cette assertion est basée sur un certain nombre de données génétiques expérimentales, cliniques et épidémiologiques dont voici les principales:

1) Les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale présentent un défaut au niveau du gène codant pour le récepteur des LDL. Le nombre de récepteurs est dès lors nettement inférieur à la normale et le taux de LDL et donc de cholestérol plasmatique nettement plus élevé. Ces personnes développent une atherosclérose prématurée, (Goldstein et Brown, 1987).

2) L'accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle peut être évitée si l'influx de cholestérol à partir du plasma est faible. Ce qui est le cas lorsque ses concentrations plasmatiques sont inférieures à

3mmol/l comme on les observe en Chine rurale ou chez la plupart des animaux (Stender, 1990) .

3) Expérimentalement, l'athérosclérose peut être induite chez des animaux subissant des interventions ayant pour effet d'augmenter les taux de cholestérol plasmatique.

4) Les Américains et les individus vivant dans la plupart des pays industrialisés présentent des taux élevés de cholestérol plasmatique et développent des maladies cardiovasculaires à un âge avancé. Suite à ce type de maladie ils décèdent plus rapidement que les individus montrant des concentrations en cholestérol plasmatique faibles.

5) Les Japonais présentent en moyenne, un niveau de cholestérol inférieur à celui des Américains et sont moins enclins à développer des CHD. Mais on observe que, s'ils migrent vers l'Amérique, leur taux de cholestérol augmente, probablement suite à un changement d'alimentation, ainsi que la propension à développer les CHD.

6) Enfin, des études ont montré que le risque de CHD peut être réduit si le taux de cholestérol plasmatique est abaissé grâce à des modifications alimentaires ou suite à des traitements par drogues (Lipid Research Clinics Program, 1984a-b).

1.4.2. Corrélation négative entre HDL et athérosclérose:

Les études épidémiologiques ont démontré à suffisance le rôle majeur de l'athérosclérose dans la mortalité cardiovasculaire et globale. Cependant, mesurer uniquement le cholestérol total semble désormais dépassé car il n'apparaît plus comme le meilleur élément prédictif du risque cardiovasculaire. L'étude de Framingham, celle-là même qui avait mis en évidence l'effet de l'hypercholestérolémie, il y a une quinzaine d'années, a révélé l'importance du taux de HDL (Gordon, 1977).

Ainsi dans cette étude épidémiologique de grande envergure, la maladie coronarienne est moins fréquemment observée chez les personnes présentant des taux élevés de HDL. De plus, "si le taux de HDL est trop bas, même chez les patients possédant une

cholesterolemie entre 180 et 220 mg/dl, les resultats de l'etude de Framingham montrent que ces personnes ont, dans les quatre années suivantes, la même fréquence d'attaques cardiaques que celles possédant des taux élevés de cholestérol".

La corrélation négative entre le taux de HDL plasmatiques et le risque d'athérosclérose est bien établie (Steinberg, 1987).

Par ailleurs, en pathologie humaine, les patients atteints de la maladie de Tangier ont des taux de HDL plasmatiques très bas et accumulent des quantités importantes de cholestérol dans de nombreux tissus: la rate, les ganglions, la muqueuse intestinale et les vaisseaux sanguins (Ducobu et Dupont, 1981).

En dépit de la valeur prédictive réelle des HDL, le mécanisme qui relie le risque cardiovasculaire élevé aux taux faibles en HDL reste inconnu. Il est cependant vital de tenter de comprendre la nature de cette relation afin de développer une stratégie adéquate d'intervention sur les HDL.

Par exemple, il n'est absolument pas prouvé qu'en augmentant les HDL, on pourra réduire le risque cardiovasculaire, même si très récemment, Badimon et al (1990) ont obtenu chez des lapins une régression des lésions athérosclérotiques par injection intraveineuse de fractions plasmatiques d'HDL-VHDL.

Actuellement, nous ne pouvons que spéculer sur la nature de ce lien "HDL peu élevées-risque CV élevé".

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la "protection" assurée par des taux élevés de HDL (Grundy, 1990):

- les HDL faciliteraient l'efflux de cholestérol à partir des cellules de la paroi artérielle. Dans ce cas, des anomalies génétiques accompagnées de taux faibles en HDL devraient se manifester par une athérosclérose prématurée: ce qui ne semble pas le cas pour la maladie de Tangier (Schaefer, 1980).

- une concentration faible en HDL pourrait refléter la présence d'autres lipoprotéines athérogéniques. Ainsi, en présence d'une hypertriglycéridémie, les esters de cholestérol des HDL seraient davantage échangés pour des triglycérides et la concentration en HDL-cholestérol chuterait.

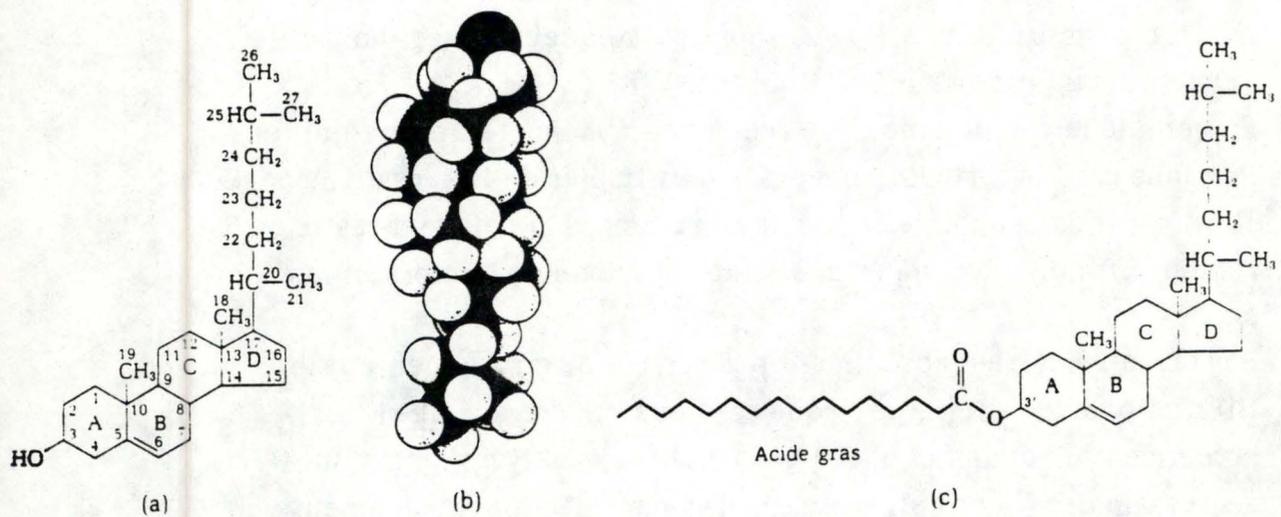


Fig. 1a Représentation de la molécule de cholestérol : l'hydroxyle constitue sa tête polaire; le reste de la molécule est hydrophobe.

1b Modèle compact du cholestérol; l'hydroxyle se trouve à l'extrémité supérieure sur la figure.

1c Ester du cholestérol. (Lehninger, 1970)

1.4.3. Intervention d'autres facteurs dans l'accumulation intraartérielle de cholestérol:

Il est clair qu'un taux faible de HDL pourrait n'être qu'un épiphénomène associé à d'autres facteurs de risque CV tels que le tabac, l'obésité, le manque d'exercice, une perturbation de la tolérance au glucose, par exemple.

De plus, la perméabilité endothéliale, l'environnement oxydatif de l'espace sous-endothélial, la perméabilité de la membrane élastique interne et l'affinité des lipoprotéines pour la matrice intercellulaire dans l'intima peuvent aussi jouer un rôle important dans l'accumulation du cholestérol dans la paroi artérielle.

2 Le métabolisme du cholestérol

2.1 Le cholestérol dans les cellules:

2.1.1. Le cholestérol non estérifié

Le cholestérol est le stérol le plus abondant chez les mammifères. C'est une molécule possédant une tête polaire représentée par un groupement hydroxyle en position 3, le reste de la molécule étant une structure rigide non polaire. (voir schéma ci-contre).

Le cholestérol est un constituant important des membranes plasmiques d'eucaryotes, où il joue un rôle dans le maintien de la stabilité, de la fluidité et de la perméabilité de ces structures.

Sa répartition n'est pas uniforme dans les membranes : il semblerait que sa concentration soit plus élevée dans les membranes plasmiques que dans les membranes intracellulaires. L'étude de sa distribution a été facilitée grâce à l'utilisation de la filipine, un antibiotique qui se lie spécifiquement à la molécule.

Dans les membranes plasmiques, le cholestérol est exclu de certaines régions comme les "tight junctions" et les "gap junctions" et sa concentration est plus faible dans les "coated pits" (Yeagle, 1985).

2.1.2. Les esters de cholestérol:

L'alcool libre présent en position 3 peut être estérifié par des acides gras et le cholestérol devient alors une molécule hydrophobe.

Le cholestérol estérifié constitue la forme de transport et de stockage du cholestérol. Celui-ci peut être utilisé comme précurseur d'hormones stéroïdes dans différents organes tels que les testicules, les ovaires et le cortex surrénalien.

Les cellules surchargées en cholestérol, l'estérifient pour le stocker sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme. Les hépatocytes et les cellules muqueuses de l'intestin estérifient le cholestérol pour l'introduire dans les lipoprotéines riches en cholestérol (Norum et al, 1983).

Deux enzymes catalysent l'estérification du cholestérol. Il s'agit de l'acyl cholestérol acyltransférase (ACAT) dont l'action est intracellulaire et la lecithin cholestérol acyltransférase (LCAT) a action extracellulaire.

2.1.3. Régulation du cholestérol non estérifié membranaire:

Goldstein et Brown (1974) ont montré que le cholestérol non estérifié libéré par l'hydrolyse lysosomale des LDL était utilisé par les cellules pour leur synthèse membranaire. Afin d'éviter une surcharge de cholestérol membranaire, la cellule a mis en place différents mécanismes protecteurs. Suite à l'apport du cholestérol par les LDL, se produisent une inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), enzyme clef dans la synthèse du cholestérol cellulaire, l'inhibition de la synthèse des récepteurs à LDL et une stimulation de l'ACAT qui estérifie le cholestérol cytoplasmique.

2.2. Le cholestérol dans les fluides biologiques.

2.2.1. Le cholestérol plasmatique:

Dans la lymphe et le plasma des animaux, le cholestérol est transporté sous forme de lipoprotéines, complexes macromoléculaires

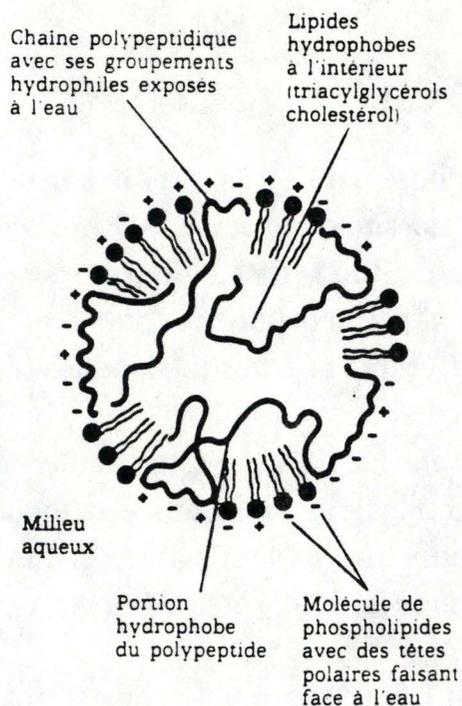


Fig. 2a Représentation schématique d'une lipoprotéine plasmatique.
(Lehninger, 1970)

Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Diamètre (nm)	Mobilité en gel d'agarose	% lipides	% protéines	Lipides principaux (% des lipides totaux)	Apoprotéines principales
Chylomicrons	< 0,95	100-500	origine	98	2	Triglycérides 90 %	A, B, C
VLDL	0,95-1,006	30-100	pré β	92	8	Triglycérides 60 % Phospholipides 15 % Cholestérol 20 %	B, C, E
IDL	1,006-1,019	25-30	β	—	—	Triglycérides 35 % Phospholipides 15 % Cholestérol 45 %	B, C, E
LDL	1,019-1,063	20-25	β	75	25	Phospholipides 30 % Cholestérol 60 %	B
HDL	1,063-1,21	10	α ₁	45-60	40-55	Phospholipides 40 % Cholestérol 40 %	A, C, E

Fig. 2b Principales caractéristiques des différentes lipoprotéines plasmatiques humaines. (Mathé et Lutton, 1984)

constituées de lipides et protéines associées par des liaisons de faible énergie (Mathé et Lutton, 1984).

Ces lipoprotéines sont constituées d'un "core" hydrophobe contenant des triglycérides et du cholestérol estérifié et d'une enveloppe hydrophile formée de cholestérol libre, de phospholipides et d'apolipoprotéines spécifiques (voir schéma ci-joint).

Selon leur densité hydratée, les lipoprotéines sont classées en 4 groupes, chez l'homme:

- chylomicrons $d < 0,95$ g/ml
- VLDL $0,95 < d < 1,006$
- LDL $1,019 < d < 1,063$
- HDL $1,063 < d < 1,21$

Les caractéristiques principales des différentes lipoprotéines sont résumées dans le tableau ci-joint (Mathé et Lutton, 1984).

Dans le plasma, ces lipoprotéines subissent une série de transformations comprenant des échanges de lipides entre les différentes classes et la conversion de lipoprotéines en lipoprotéines différentes. Le cholestérol joue un rôle important dans ces événements métaboliques (Mathé et Lutton, 1984).

2.2.1.1 Caractéristiques des différentes lipoprotéines et de leur métabolisme:

1) Les chylomicrons sont les lipoprotéines de grande taille (100 à 1000 nm de diamètre). Ils sont synthétisés par les cellules muqueuses de l'intestin et leur rôle est de transporter le cholestérol et les triglycérides d'origine alimentaire, absorbés au niveau de l'épithélium intestinal, dans le plasma et dans la lymphe.

Dans le plasma, ils subissent l'action de la lipoprotéine lipase (enzyme présente à la surface des cellules endothéliales) qui hydrolyse leurs triglycérides et produit ainsi des lipoprotéines relativement déficientes en triglycérides qu'on appelle "remnants". Les "remnants" sont enrichis en cholestérol, rapidement et efficacement éliminés du plasma via le foie (Mahley et Innerarity, 1983).

2) Les VLDL sont des particules (leur diamètre varie de 30 à 90 nm) dont les triglycérides constituent le composant lipidique majeur. Elles ont une mobilité électrophorétique pré- β . Elles sont produites par

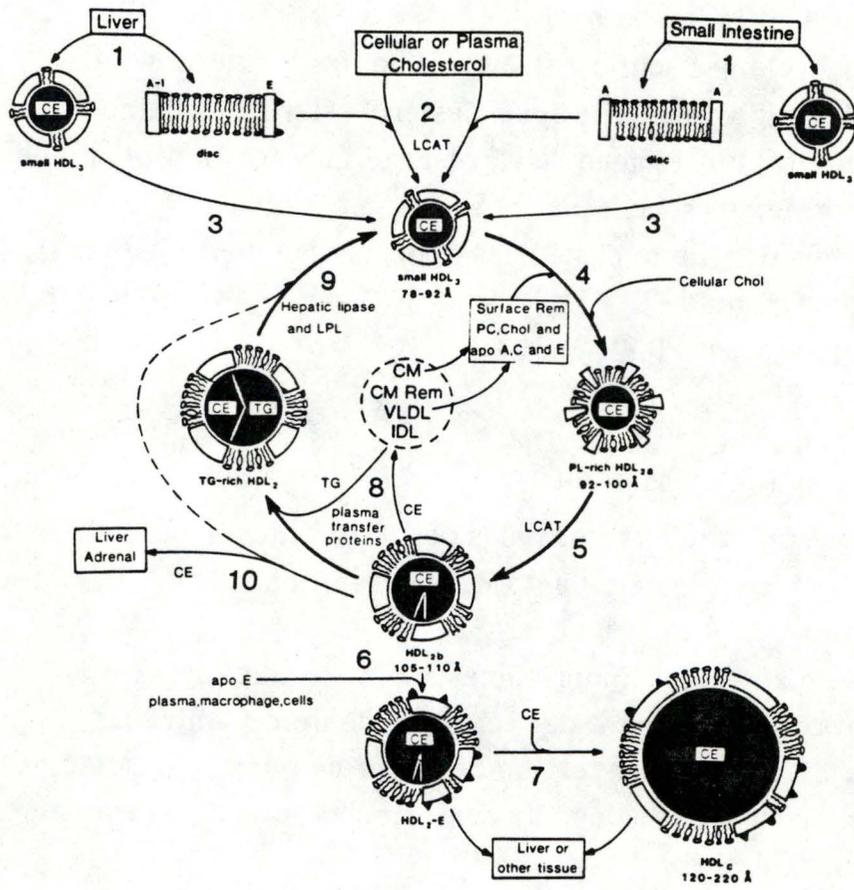


Fig. 3 Representation du métabolisme général des HDL. (Small, 1987)

le foie et l'intestin (Mathe et Lutton, 1984). Leur métabolisme s'apparente à celui des chylomicrons (des triglycérides transportés dans le sang par les VLDL et les chylomicrons génèrent des acides gras libres utilisés comme source d'énergie par différentes cellules). Mais leur dégradation complète conduit à la formation des LDL, particules enrichies en apo B.

3) Les LDL sont les lipoprotéines responsables du transport du cholestérol dans le plasma.

Les LDL présentent une mobilité électrophorétique β et ont un diamètre de 20 nm.

4) Les HDL et le système HDL constituent un groupe hétérogène de lipoprotéines de petite taille parmi lesquelles on distingue, selon leur composition et leur densité: les HDL2 et les HDL3 et une classe minoritaire les HDL1.

Elles font partie du système HDL qui comprend également différents enzymes (la LCAT lecithin: cholestérol acyltransferase, la LPL lipoprotéine lipase et HL lipase hépatique) les protéines de transfert de lipides et des lipoprotéines riches en triglycérides.

Ces particules sont relativement riches en protéines, ce qui rend compte de leur densité élevée; elles contiennent également des phospholipides, des esters de cholestérol, du cholestérol libre et des triglycérides.

Le métabolisme des HDL est compliqué et est schématisé ci-contre (Small, 1987).

Les particules synthétisées par le foie contiennent l'apo A-I et l'apo E tandis que celles synthétisées par l'intestin contiennent l'apo A-I et l' A-II. De plus, elles sont sécrétées sous 2 formes.

Les HDL discoïdales sont sécrétées avec très peu de CH libre et, celles qui possèdent l' apo A-I, acceptent le CH provenant de tissus ou de cellules et peuvent ainsi initier un mouvement net de cholestérol des tissus vers le plasma. Ces HDL enrichies en CH contiennent des PL, du cholestérol libre, de l'apo A-I en surface. Elles constituent un excellent substrat pour l'enzyme LCAT qui convertit les PL et le cholestérol libre en ester de cholestérol. Cette réaction transforme les HDL discoïdales en HDL3 ou HDL sphériques. Lorsque la majorité du substrat de cette réaction (phosphatidylcholine et CH libre) est consommée, la particule HDL3 peut accepter une nouvelle source de PL à partir de la surface des chylomicrons "remnants" et des VLDL. Ces

Apolipoproteins and their association with human diseases

Apo-protein	Plasma concentration (mg/ml)	Isoelectric point (pI)	M.W.	Function	Association with clinical disorders
A-I	1.0-1.2	5.85-5.40 ^a	28K	Activates LCAT	Tangier disease; apoA-I - apoCIII deficiency; atherosclerosis
A-II	0.3-0.5	5.0	8.5K	-	-
A-IV	0.16	5.5	46K	-	-
B-100	0.7-1.0	-	550K	Receptor-mediated catabolism of LDL	Abetalipoproteinemia; normotriglyceridemic abetalipoproteinemia (B-100 deficiency); atherosclerosis
B-48		-	275K	Chylomicron production	-
CI	0.04-0.06	7.5	6.5K	Activates (moderately) LCAT	-
CII	0.03-0.05	4.9	9K	Activates lipoprotein lipase	Familial Type I hyperlipoproteinemia
CIII	0.12-0.14	4.7-5.0 ^b	9K	Inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins	ApoA-I - apoCIII deficiency
E	0.025-0.050	6.0-5.7 ^c	34.2K	Receptor-mediated catabolism of apoE-containing lipoproteins	Familial Type III hyperlipoproteinemia

^a The isoelectric points of apoA-I isoproteins are: apoA-I₂ = 5.85; apoA-I₃ = 5.74; apoA-I₄ = 5.65; apoA-I₅ = 5.52; apoA-I₆ = 5.40. The major plasma isoprotein is apoA-I₄.

^b The isoelectric points of individual apo CIII isoproteins are: apoCIII-0 = 5.0; apoCIII-1 = 4.85; apoCIII-2 = 4.65.

^c The isoelectric points of individual apoE3 isoproteins are: apoE3 = 6.02; apo E3₃₋₁ = 5.89; apoE3₃₋₂ = 5.78; apoE3₃₋₃ = 5.68. The isoelectric points of the common apoE variants are apoE2 = 5.89; apoE4 = 6.18.

Fig. 4 Caractéristiques des différentes apolipoprotéines et leur association dans les maladies humaines. (Breslow, 1987)

"remnants" fusionnent avec les HDL3 pour former une particule plus large et riche en phospholipides, les HDL2a. Comme la surface de ces HDL2a est plus grande, les apolipoprotéines peuvent être étirées dans la phase aqueuse. Ces HDL riches en PL sont de bons accepteurs de cholestérol libre et constituent un bon substrat pour la LCAT. Ce mécanisme explique l'élimination du cholestérol des tissus et l'augmentation de volume du centre hydrophobe de la lipoprotéine qui devient une HDL2b. Une petite fraction de ces lipoprotéines peut recevoir l'apoprotéine E, augmente en taille toujours grâce à la LCAT, puis ces particules sont rapidement capturées au niveau du foie par l'intermédiaire des récepteurs à LDL par les apos E/B ou des récepteurs des chylomicrons "remnants" (le récepteur pour l'apo E) permettant ainsi le retour du CH depuis les tissus périphériques vers le foie.

2.2.1.2 Fonctions des différentes apolipoprotéines:

Les apolipoprotéines constituent les composants protéiques des lipoprotéines et ont 3 fonctions principales:

A)Elles aident à la solubilisation du cholestérol et des triglycérides;

B)Elles régulent l'activité de certains enzymes présents dans le métabolisme des lipoprotéines;

C)Elles peuvent agir soit comme ligands pour la liaison aux récepteurs spécifiques ou comme cofacteurs d'enzymes.

Les techniques biochimiques ont permis d'identifier au moins 8 types d'apolipoprotéines (voir schéma ci-joint).

L'apolipoprotéine A-I ou apo A-I:constituant protéique majeur des HDL. Sa concentration dans le plasma varie de 1 à 1,2 mg/ml. Elle joue un rôle fonctionnel important dans l'activation de la LCAT, enzyme responsable de l'estérfication du cholestérol plasmatique.

Elle intervient dans le " reverse transport" du cholestérol à partir des tissus périphériques vers le foie, pour son excretion.

La protéine formée d'une seule chaîne de 243 acides aminés à laquelle viennent s'ajouter une séquence signal de 18 acides aminés (prépeptides) et un propeptide de 6 acides aminés qui est clivé dans le plasma (Sidoli et al, 1987). Elle est synthétisée, chez les mammifères dans le foie et l'intestin, en quantité équivalente. Actuellement, on a démontré qu'il existait une corrélation négative entre l'Apo A-1 et les CHD au même titre que celle qui existe pour les HDL (Brunzell et al, 1984).

L'apolipoprotéine A-II ou Apo-II : représente le second constituant des HDL, environ 20% de composition protéique.

Sa concentration plasmatique varie de 0,3 à 0,5 mg/ml

In vitro elle est capable d'activer la lipase hépatique, d'inhiber la LCAT et de déplacer l'Apo A-I des HDL.

In vivo aucun rôle physiologique ne lui est connu.

Elle est synthétisée dans le foie et l'intestin (Breslow, 1987).

Elle existe sous la forme d'un dimère constitué de deux sous-unités identiques de 77 acides aminés chacune, reliées de façon covalente par un pont disulfure.

Elle possède une séquence signal de 18 aa suivie d'un propeptide de 5 aa (Sidoli et al, 1987).

L'apoprotéine A-IV ou Apo A-IV : découverte comme constituant majeur des HDL chez le rat, elle représente un constituant mineur des HDL humaines.

Elle existe principalement dans la fraction non lipoprotéique du plasma.

Sa concentration plasmatique chez l'homme est de 0,16 mg/ml. Il semblerait qu'elle joue un rôle fonctionnel dans la biogenèse et la sécrétion des lipoprotéines intestinales riches en triglycérides mais aucune preuve n'a encore été fournie.

In vitro elle active la LCAT.

Elle est synthétisée dans le foie et l'intestin.

L'apoprotéine C-I ou Apo C-I : Constituant des VLDL et HDL. Elle représente 10% du contenu protéique dans les VLDL et 2% dans les HDL. Sa concentration plasmatique varie de 0,04 à 0,06 mg/ml chez l'homme.

In vitro elle active la LCAT mais moins efficacement que l'apo A-I. Aucun rôle physiologique ne lui a été attribué. Elle est constituée d'une chaîne protéique de 57 acides aminés et est synthétisée principalement dans le foie.

L'apolipoprotéine C-II ou apo C-II est le constituant des VLDL et HDL dont elle représente respectivement 10 et 1% des protéines. Sa concentration plasmatique est comprise entre 0,03 et 0,05 mg/ml.

Elle constitue un cofacteur de la lipoprotéine lipase qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et VLDL.

C'est un peptide composé d'une seule chaîne de 78 ou 79 acides aminés. Elle est synthétisée surtout par le foie et à un degré moindre dans l'intestin.

L'apolipoprotéine C-III ou apo C-III est la plus abondante des apo C. Elle représente respectivement 2% et 5% du contenu protéique des HDL et des VLDL.

Sa concentration plasmatique varie de 0,12 à 0,14 mg/ml.

In vitro elle intervient dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, par inhibition de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique.

Elle est constituée d'une seule chaîne protéique composée de 79 acides aminés et existant sous au moins 3 formes polymorphiques dépendantes de leur contenu en acide sialique à la fin de la chaîne carbonée. Elle est synthétisée au niveau du foie principalement.

L'apolipoprotéine E ou apo E est un composant des HDL et VLDL dont elle représente 2% et 10 à 20% du contenu protéique respectivement.

Sa concentration plasmatique varie de 0,025 à 0,050 mg/ml.

Elle peut être reconnue par des récepteurs à haute affinité et peut médier la liaison, l'internalisation et le catabolisme de certaines lipoprotéines.

Elle sert de ligand pour le récepteur B/E des LDL et pour le récepteur à apo E des "remnants" de chylomicrons et des HDLc

enrichies en cholestérol.

L'apo E mature est constituée d'une seule chaîne protéique composée de 299 acides aminés dont la région reconnue par le récepteur est située entre les résidus 140 et 150. Sa synthèse a lieu dans le foie.

L'apolipoprotéine B ou apo B est présente dans les LDL, les chylomicrons

et les VLDL. Sa concentration dans le plasma varie de 0,7 à 1 mg/ml.

Elle joue un rôle physiologique dans la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides intestinales et hépatiques et dans la reconnaissance des LDL par leur récepteur spécifique.

Il s'agit d'une glycoprotéine qui existe sous 2 formes, appelées apo B-100 et apo B-48 (Sidoli et al, 1987).

L'apo B -100 est un peptide de 500 Kd, qui est produit principalement dans le foie. Elle constitue le ligand du récepteur des LDL. Son étude est très difficile car c'est une protéine très insoluble.

L'apo B-48 est synthétisée dans l'intestin et constitue l'apolipoprotéine principale des chylomicrons. Elle est échangeable et demeure dans les chylomicrons durant tout leur métabolisme.

2.2.2 Les sels biliaires

En 1943, Bloch et al. montraient que le cholestérol hépatique était dégradé en acides biliaires. Les 2 principaux acides produits sont l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique. Ils sont synthétisés dans le foie via une série de réactions oxydatives et métaboliquement irréversibles modifiant le noyau et la chaîne latérale du cholestérol (Mathe et Lutten, 1984).

Les modifications nucléaires débutent dans la fraction microsomale; les molécules modifiées subissent les oxydations dans les mitochondries et aboutissent à la formation des acides biliaires. Ceux-

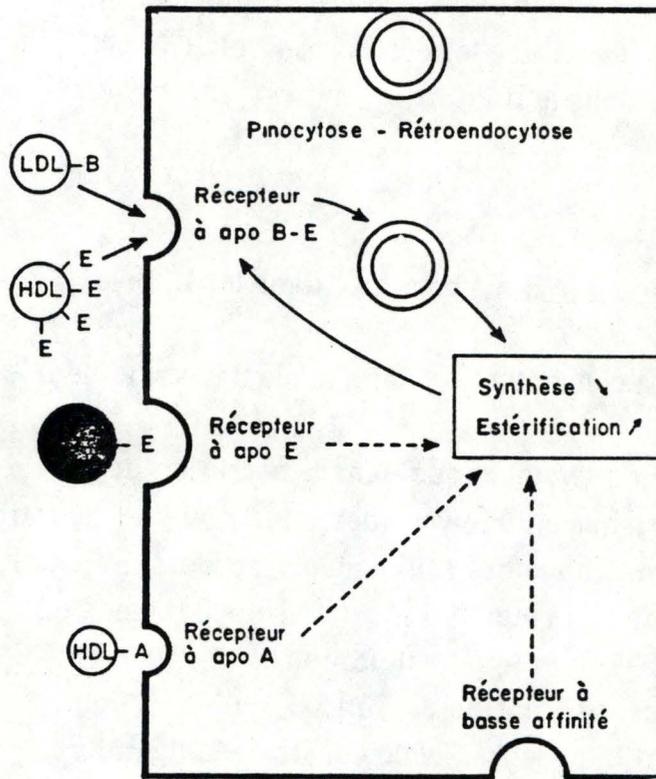


Fig. 5 Schéma des différents mécanismes de la captation intracellulaire de lipoprotéines entières. (Mathé et Lutten, 1984)

ci sont alors conjugués à de la glycine et à de la taurine ce qui augmente leurs propriétés de détergent. Ils sont ensuite sécrétés dans la bile où ils participent à la digestion des lipides et à la solubilisation du cholestérol excrété, par le foie, dans la bile.

Les mécanismes par lesquels le cholestérol est sécrété dans la bile sont encore mal connus : 2 théories sont proposées :

- le cholestérol serait solubilisé, suite à une interaction avec des lipides ou phospholipides plus polaires et avec les acides biliaires, avant d'être sécrété dans la bile
- le cholestérol formerait des complexes avec la lécithine dans les membranes des canalicules biliaires; ceux-ci seraient détachés par les acides biliaires pour former des micelles mixtes.

Il est établi que le cholestérol existe dans la bile sous forme de micelles contenant des acides biliaires et de la lécithine (Carey et Small, 1978). Cependant, il est suggéré que le cholestérol peut aussi quitter les cellules hépatiques sous forme de complexes cholestérol-lécithine ou vésicules. (Kibe et al, 1984) Ces vésicules seraient probablement formées dans les cellules hépatiques et seraient sécrétées directement dans la bile, indépendamment des acides biliaires. Beaucoup de recherches sont encore à réaliser dans ce domaine. (Grundy, 1986).

2.3 Transport et mobilisation cellulaires du cholestérol.

Au niveau cellulaire, on connaît différentes voies d'entrée et de sortie du cholestérol contrôlant l'homéostasie cellulaire du cholestérol (voir schéma ci-joint).

2.3.1 Les influx

2.3.1.1 Voie endogène ou synthèse du cholestérol *in situ*

La synthèse du cholestérol s'effectue dans toutes les cellules (Mathé et Lutton, 1984), mais le foie est le principal organe du corps qui sécrète le cholestérol et dont le taux de synthèse est soumis à un rythme diurne c'est-à-dire qu'il est plus important le jour que la nuit.

La formation du cholestérol est réalisée à partir de l'acétyl CoA cytosolique qui dérive de l'oxydation intramitochondriale du pyruvate et des acides gras, et elle requiert environ 20 étapes.

L'étape limitante dans la cholestérogenèse est la conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA (HMG-CoA) en acide mevalonique; réaction catalysée par l'enzyme HMG-CoA réductase.

L'acide mevalonique subit ensuite toute une série de réactions de condensation pour former une chaîne hydrocarbonée appelée squalène qui est cyclisée pour donner le lanostérol.

Cette molécule va subir différentes modifications qui nécessitent 12 étapes enzymatiques conduisant à l'apparition du cholestérol.

Différents facteurs peuvent influencer le taux de synthèse du cholestérol dans le foie :

- une alimentation trop riche en calories, chez les obèses, augmente sa synthèse ;
- une concentration intracellulaire très élevée en cholestérol inhibe sa synthèse. Il existe donc une régulation de la synthèse du cholestérol par "feedback".

2.3.1.2 La voie exogène.

a) La pinocytose : mécanisme qui épure les lipoprotéines du plasma comme les autres protéines dans les proportions dans lesquelles elles se trouvent dans le milieu. L'influx de cholestérol est donc proportionnel à leur concentration plasmatique. La contribution de ce phénomène à la captation intracellulaire totale des lipoprotéines est modeste et est estimée chez un sujet normocholestérolémique à environ 150 mg/h/10⁶ cellules à 37°C. (Davies et Ross, 1980).

b) Endocytose par récepteurs spécifiques

Dans ce cas, la liaison des lipoprotéines est réalisée par des récepteurs membranaires spécifiques et est suivie de leur "internalisation". Le récepteur le plus étudié fut découvert par Goldstein et Brown (1974) et appelé récepteur extrahépatique à apolipoprotéines E et B. Ainsi, les lipoprotéines contenant de l'apo E ou de l'apo B, principalement les LDL, se lient à un récepteur de surface

situé dans une région membranaire appelée "coated pits". Ceux-ci s'invaginent alors, forment des "coated vésicules" qui fusionnent avec des lysosomes primaires pour constituer des endosomes dans lesquelles le cholestérol estérifié est hydrolysé. Le cholestérol est ainsi libéré dans le cytoplasme et une partie est utilisée par la cellule comme constituant membranaire; l'autre partie induit la régulation du cholestérol déjà décrite au point n° 2.1.3.

Un deuxième type de récepteur spécifique existe sur les cellules hépatiques. Celui-ci fixe les lipoprotéines contenant uniquement l'apo E. Il intervient principalement dans l'épuration du plasma des "remnants" de chylomicrons et des HDLc, lipoprotéines de haute densité enrichies en cholestérol et en apo E.

L'existence d'une troisième classe de récepteurs spécifiques des lipoprotéines à apoprotéines A est probable, au moins chez le rat. En effet, des HDL2 ou des HDL3 se lient spécifiquement et sont dégradées dans des cellules isolées de parenchyme hépatique (Nakai et al., 1976) ou des hépatocytes en culture (Ghiselli et al., 1981). Les caractéristiques de ces récepteurs ainsi que les conséquences de leur catabolisme sur le métabolisme intracellulaire du cholestérol ne sont pas encore déterminées.

c) Endocytose par des récepteurs de basse affinité.

Ces récepteurs sont également appelés "immunorégulateurs" (Fielding et Fielding, 1982). Ils sont présents sur les membranes des lymphocytes mais également dans les membranes de fibroblastes et de cellules musculaires lisses (Fielding et Fielding, 1982). Ces immunorécepteurs ressemblent aux récepteurs à apo B/E des fibroblastes mais ils s'en distinguent par le fait que, chez des sujets souffrant d'hypercholestérolémie familiale, la stimulation mitogénique des lymphocytes reste soumise à la régulation lipoprotéique, celle-ci étant réalisée par le fait que la liaison seule des lipoprotéines plasmatiques sur ces récepteurs a pour effet d'inhiber les premières étapes de l'activation des lymphocytes à savoir, le renouvellement du phosphoinositol, l'entrée de calcium ionisé et le métabolisme des nucléotides cycliques (Mathé et Lutton, 1984).

d) La rétro-endocytose : ce phénomène est caractérisé par une régurgitation possible des lipoprotéines par les cellules qui les ont capturées. Il a été décrit pour la première fois par Aulinskas et al. (1981) dans les cellules musculaires lisses bovines et dans les fibroblastes de peau pour les LDL.

Schmitz et al. (1985) ont montré grâce à une étude morphologique, que des macrophages péritoneaux de souris chargés en cholestérol internalisent des complexes HDL-or colloïdal, les délivrent aux endosomes et que ceci peut être suivi d'une rétro-endocytose (Takata et al. 1988).

2.3.2 Les efflux

2.3.2.1 La synthèse d'hormones stéroïdes

Les cellules du cortex surrénalien, les ovaires et les testicules peuvent transformer des quantités importantes de cholestérol en hormones stéroïdiennes.

Les HDL sont la principale source de cholestérol pour les cellules du cortex surrénalien, particulièrement chez le rat (Gwynne et Mahaffee, 1989). Kovanen et al. (1979) ont démontré la présence de sites de liaison à haute affinité pour les HDL sur des fractions de membranes provenant de cortex bovin et également de sites de liaison à haute affinité pour les HDL sur le cortex foetal humain (Norum et al., 1983).

En ce qui concerne les gonades, chez le rat il semblerait que les HDL soient aussi la principale source de cholestérol exogène (Talavera et Menon, 1989). Il a été montré sur des membranes provenant de testicules foetaux humains et bovins la présence de sites de liaison à haute affinité pour des LDL (Brown et al., 1979). Il faut remarquer également qu'en plus de la liaison à haute affinité pour les lipoprotéines dans les gonades et les surrénales, l'activité de la HMG-CoA reductase est très élevée indiquant que de grandes quantités de cholestérol sont nécessaires à ces cellules (Norum et al., 1983).

2.3.2.2 Le "reverse cholesterol transport"

Nous avons vu que les tissus extrahépatiques peuvent accumuler le cholestérol par de nombreux processus, principalement par l'endocytose de LDL et par la synthèse de cholestérol *in situ*. Le "reverse cholesterol transport" est le mécanisme qui permet aux cellules extrahépatiques d'éliminer le cholestérol, via un retour au foie où il est peut être excrété. Ce schéma a été proposé par Glomset et Norum (1973) qui postulent que les HDL peuvent récupérer le cholestérol à partir de cellules surchargées en cholestérol. Le stérol est alors estérifié par la LCAT et éventuellement fourni au foie soit via un transfert du cholestérol estérifié aux VLDL ou aux chylomicrons ou soit par la prise directe du cholestérol des HDL par le foie (Catapano, 1987).

Le cholestérol qui est retiré de la surface membranaire des cellules est exclusivement non estérifié (Grundy, 1986). Il faut également noter que l'accepteur du cholestérol membranaire n'a pas encore été déterminé avec certitude; plusieurs candidats ont été proposés dont :

- les HDL naissantes;
 - une sous-fraction des HDL;
 - l'apo AI;
 - l'albumine;
 - un complexe de protéines composés d'apo AI, d'apo D et de LCAT.
- (Fielding et Fielding, 1982).

Si l'accepteur primaire du cholestérol n'a pas encore été déterminé avec certitude, l'HDL constitue cependant une lipoprotéine qui reçoit beaucoup de cholestérol provenant des membranes. Le cholestérol nouvellement estérifié peut entrer dans des HDL de petite taille préférentiellement les HDL3. Les HDL3 circulantes peuvent être transformées en HDL2, particules plus larges et enrichies en esters de cholestérol. L'étape finale du "reverse cholesterol transport" est la récupération partielle du cholestérol par le foie grâce aux récepteurs pour les apoE présents dans la membrane des hépatocytes.

2.3.3 Rôle des HDL dans le "reverse cholesterol transport"

Si beaucoup d'informations sont déjà connues en ce qui concerne le récepteur des LDL et leur interaction avec les cellules, il n'en est pas de même pour les HDL.

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'un récepteur spécifique pour les HDL sur certains types cellulaires extra-hépatiques. Graham et al. (1987), grâce à la technique du "ligand blotting", ont mis en évidence une protéine de 110 Kdaltons présente, en abondance, sur les macrophages, et qui lie les HDL. Cette protéine lie les HDL3 apoE free et son activité de liaison augmente fortement quand les cellules sont traitées avec du cholestérol. L'interaction de la HDL avec son récepteur faciliterait le transport du cholestérol des cellules vers la lipoprotéine (Oram et al., 1983).

En 1988, Kambouris et al. ont mis en évidence sur les membranes de cellules Hep G2, une protéine de 80 Kdaltons qui lie spécifiquement les HDL3.

L'analyse de l'interaction des HDL avec les cellules mène à différentes interprétations souvent opposées en ce qui concerne le mécanisme d'élimination du cholestérol cellulaire par les HDL. Ainsi, selon Oram, la liaison spécifique des HDL à la cellule facilite le retrait du cholestérol des cellules, mais Karlin (1987) propose lui que la liaison des HDL n'inclut pas un transfert de cholestérol des cellules vers les HDL.

2.4 Mobilisation du cholestérol dans le plasma

2.4.1 La lipoprotéine lipase

Il s'agit d'une enzyme qui joue un rôle important dans la production des LDL et surtout des HDL.

Sa fonction principale est de catalyser l'hydrolyse des triglycérides présents dans le "core" des chylomicrons et VLDL circulants.

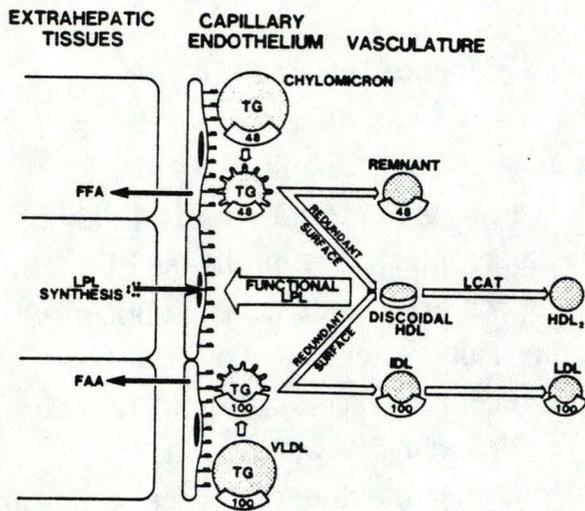


Fig. 6 Transformations des lipoprotéines suite à l'hydrolyse des triglycérides, des chylomicrons et des VLDL par la lipoprotéine lipase. (FFA : acides gras libres). (Garfinkel, 1987)

Les substrats et les réactions de catalyse de la LPL figurent sur le graphe ci-joint (Garfinkel 1987)

La LPL est synthétisée dans les cellules parenchymateuses de différents tissus, sécrétée et liée aux cellules endothéliales (Nilsson-Ehle et al., 1980). Sa synthèse a été démontrée dans des préadipocytes (Chajeh-Shaul et al, 1985), des adipocytes (Vydelingum et al, 1983) des cellules mésenchymateuses de cœur (Chajeh-Shaul et al, 1985) dans le cœur intact de rat (Stum et al, 1984), dans le cœur, le diaphragme, la graisse brune et le foie de souris neonatale (Olivecrona et al, 1985). De plus, la LPL est synthétisée dans les macrophages, et dans le cas où ceux-ci sont présents en tant que constituants normaux d'un tissu comme dans le poumon (Okabe et al, 1984) ces cellules deviennent la source majoritaire de production de l'enzyme au lieu des cellules parenchymateuses. Le site de l'action physiologique de cette enzyme est donc la surface endothéliale des capillaires où les lipoprotéines circulantes sont liées brièvement et leurs triglycérides hydrolysés. Les acides gras ainsi libérés sont disponibles pour d'autres tissus comme source énergétique ou réestérifiés pour être stockés comme triglycérides.

Les lipoprotéines riches en triglycérides comme les chylomicrons et les VLDL, ayant subi l'action de la LPL, deviennent des "remnants" de chylomicrons ou des IDL qui sont éliminés par le foie. Leurs composants de surface, les phospholipides, le cholestérol libre et les apolipoprotéines sont alors transférés aux HDL₃ qui deviennent aussi des HDL₂.

Elle est activée par l'apo C-II.

2.4.2 La lipase hépatique

Elle est localisée à la surface des cellules endothéliales du foie. Il s'agit d'une phospholipase qui joue un rôle dans le retrait des HDL du plasma. Il a été montré qu'il existe une corrélation négative entre la concentration en HDL₂ et l'activité de la lipase hépatique (Van Tol et al., 1978). Ceci atteste donc bien l'hypothèse que la lipase hépatique joue un rôle dans la dégradation des HDL du plasma.

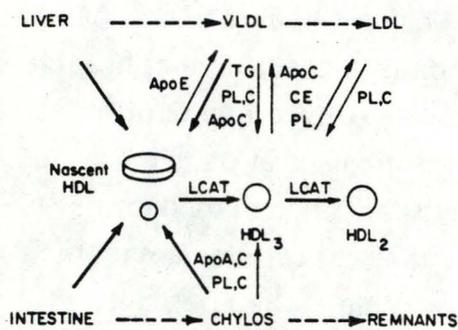


Fig. 7 Rôle de la LCAT dans la transformation des HDL. Les HDL sphériques et discoidales augmentent dans le foie, l'intestin et la circulation suite à la lipolyse des VLDL et chylomicrons car elles reçoivent un excès de phospholipides (PL), de cholestérol (C) et d'apolipoprotéines (A et C). Elles sont alors transformées en HDL₃ et HDL₂ par l'action de la LCAT. (Jonas, 1987)

2.4.3 La LCAT

Cette enzyme est responsable du retrait d'une chaîne acyl de la lécithine et du transfert de celle-ci sur une molécule de cholestérol libre.

Elle est synthétisée par le foie et est sécrétée dans le plasma où elle existe sous forme libre ou associée à des lipoprotéines. Les HDL constituent son substrat préféré, principalement les HDL naissantes discoidales.

Elle est activée par l'apolipoprotéine A-I présente dans les HDL; les esters de cholestérol produits lors de son activation sont stockés dans le "core" des HDL, celles-ci étant capables de les transférer à d'autres lipoprotéines ou aux membranes plasmiques cellulaires. La LCAT joue donc un rôle important dans la maturation des HDL (voir schéma ci-joint).

En diminuant le contenu en cholestérol libre des lipoprotéines, la LCAT affecte le contenu en cholestérol des membranes et participe donc au maintien de la structure des membranes, et indirectement au contenu cellulaire total en cholestérol (Jonas, 1987).

3. Le transport du cholestérol et l'athérosclérose

3.1 Les lipoprotéines athérogéniques

3.1.1 Les B-VLDL

Ce sont des lipoprotéines contenant de grandes quantités d'esters de cholestérol, peu de triacylglycérols, des apos B et E et qui apparaissent dans le plasma d'animaux recevant une alimentation riche en graisses et cholestérol et chez les personnes souffrant d'hyperlipoprotéïnémie de type III. Chez ces individus, on assiste de plus, à une mauvaise élimination des B-VLDL par les voies hépatiques et extrahépatiques suite à une structure anormale de leur apolipoprotéine E.

Elles ont une migration électrophorétique de type B.

Les B-VLDL peuvent se lier à un récepteur présent à la surface des macrophages dérivant de monocytes humains; elles sont alors internalisées, hydrolysées dans les lysosomes et le cholestérol libéré

est reesterifiée avec de l'oléate pour être stockée sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme, donnant aux macrophages l'aspect de "foam cells". Ces B-VLDL pourraient être à l'origine d'un engorgement lipidique des macrophages et jouer un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Gianturco et Bradley, 1987).

3.1.2. Les LDL modifiées

Des LDL modifiées pourraient apparaître dans le plasma, ainsi que lors de l'agrégation plaquettaire et dans certains états pathologiques. Il y aurait libération de malondialdéhyde qui modifie les LDL (Fogelman et al, 1980). Ces LDL modifiées entraîneraient l'accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages grâce à un récepteur spécifique sur ces cellules.

Les études de Henriksen et al. (1983) ont montré que les LDL peuvent être dramatiquement altérées suite à une incubation avec des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses : une modification oxydative présumée engendre des LDL modifiées qui peuvent être reconnues par un récepteur à LDL acétylées (Gianturco et Bradley, 1987).

Toutes ces modifications ont pu être réalisées, *in vitro* par acétylation ou par traitement chimique à la malondialdéhyde des LDL. Elles ont pour effet d'augmenter les charges négatives des LDL en abolissant la charge positive du groupement lysine (Mahley et Innerarity, 1983).

Le récepteur à LDL acétylées est présent sur les cellules d'origine reticulo-endothéliale comme les macrophages et les cellules endothéliales. Les LDL acétylées, par la liaison au récepteur, entrent dans la cellule par endocytose et sont fournies aux lysosomes où l'apoprotéine est dégradée et les acides aminés sécrétés dans le milieu de culture. Les esters de cholestérol sont hydrolysés, le cholestérol produit est réestérifié dans le cytoplasme par l'ACAT et peut être rehydrolysé par une estérase neutre cytoplasmique. Ce cycle se perpétue jusqu'à ce que le cholestérol soit repris par un accepteur et ainsi retiré de la cellule. Dans le cas contraire, il y a une accumulation des esters de cholestérol dans la cellule sous forme de gouttes lipidiques qui donnent l'apparence de "foam cells" aux macrophages et qui sont souvent associées aux lésions athéromateuses.

3.2. Anomalies du "reverse cholesterol transport":

3.2.1. Déficience en LCAT:

L'estérification du cholestérol intravasculaire étant presque entièrement réalisée par la LCAT, on pourrait s'attendre à une abondante accumulation de cholestérol dans les tissus et à une atherosclerose prématurée chez les personnes souffrant de déficience familiale en LCAT. Cela ne semble pas être le cas ou en tous cas les anomalies sont modérées (Reichl et Miller, 1989).

3.2.2. Déficience en HDL:

Les patients présentant une absence de HDL due à des anomalies du groupe de gènes des Apo A-I, C-III et A-IV, développent une atherosclerose prématurée et sévère, sans élévation du rapport plasmatique CL/CE (Norum et al, 1982). Ce qui signifie que des lipoprotéines autres que les HDL peuvent servir de substrat pour la LCAT *in vivo*.

But du travail:

Nous avons souligné, en accord avec Miller et Miller (1975), l'importance des HDL dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, particulièrement dans l'athérosclérose.

Différents travaux ont été récemment consacrés à l'étude du rôle des HDL dans l'efflux de cholestérol à partir de diverses cellules et notamment des cellules endothéliales.

En effet, l'endothélium constitue le site primaire d'interaction entre la paroi du vaisseau et les lipoprotéines plasmatiques.

Slotte et al (1987) ont montré que des fibroblastes humains et des cellules endothéliales aortiques bovines possédaient des récepteurs membranaires pour les HDL favorisant l'efflux de cholestérol.

Tauber (1981) a observé une augmentation du nombre de sites de liaison pour les HDL à la surface de cellules endothéliales vasculaires bovines quand celles-ci sont en contact avec des quantités élevées de 25-hydroxy-cholestérol.

Savion et al (1989) ont étudié l'efflux de cholestérol dans les cellules endothéliales et musculaires vasculaires bovines.

Notre laboratoire souhaite également orienter une partie de ses travaux dans cette direction en utilisant des cellules endothéliales humaines obtenues à partir des cellules en culture de la veine ombilicale (HUVEC=Human umbilical vein endothelial cells).

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'existence d'un site de liaison pour les HDL sur ces cellules par des études biochimiques et morphologiques et observer l'influence du cholestérol sur cette liaison.

Parallèlement à cette étude, nous avons tenté de mettre au point une technique permettant d'isoler la sous-fraction HDL₃ des HDL mais en un temps nettement plus court que par la méthode d'ultracentrifugation séquentielle (Havel, 1955). En effet, cette méthode, très longue, requiert presque 15 jours de centrifugations, ce qui est tout à fait impensable aux Facultés pour des raisons évidentes.

Matériel & Méthodes:

1 Culture de cellules endothéliales humaines:

1.1 Origine et isolement des cellules endothéliales:

Les cellules endothéliales sont prélevées à partir de la veine ombilicale. Les cordons ombilicaux sont fournis par les maternités Sainte Elisabeth et la Maternité Provinciale de Namur, occasionnellement par d'autres cliniques du pays.

Les cordons sont prélevés stérilement de suite après l'accouchement et conservés, 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). Les maternités nous communiquent la date, l'heure de la naissance, le sexe de l'enfant ainsi que la consommation de cigarettes par la mère durant la grossesse.

La mise en culture est réalisée stérilement au minimum 4 heures et au maximum 5 jours après l'accouchement. On introduit un trocard à l'une des extrémités de la veine et on perfuse le vaisseau avec 20 ml de Cord buffer, afin d'ôter le sang qu'il pourrait contenir. La veine est alors remplie de 10 ml de collagénase 0,1% (Type CLS, Worthington ou Cooper Biomedicals) dans du PBS Dulbecco et incubée 20 minutes à 37°C dans du Cord buffer. Après incubation, on récolte le contenu de la veine dans un tube à centrifuger à fond cône ainsi que 20 ml de Cord buffer ayant servi à reperfuser la veine.

Les cellules endothéliales détachées de la veine sont séparées de la solution de collagénase et de Cord buffer par une centrifugation à 1000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les cellules est resuspendu dans 4 ml de milieu M 199 (Flow Laboratories) contenant de la L-glutamine (Sigma) 2mM, de l'Hepes 15 mM, des antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 ug/ml, Nystatin 25 U/ml) ainsi que 20 % de sérum de veau nouveau-né (Flow Laboratories).

Les cellules provenant d'un cordon sont déposées dans une boîte de Pétri en plastique de 60 mm de diamètre (Nunc) prétraitée par une solution de gélatine (Sigma) 0,2% dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite incubées en atmosphère humide contenant 95% d'air et 5% de CO₂, à 37°C.

Le milieu est renouvelé le lendemain de la mise en culture et ensuite tous les 2 jours.

1.2 Le repiquage:

Quand les cellules sont confluentes, environ 5 jours après la mise en culture, elles sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Nunc) suivant le rapport 1 à 9.

Les cellules sont lavées une fois avec 4 ml d'Hepes buffer (137 mM NaCl - 4 mM KCl - 12 mM glucose - 10 mM Hepes pH 7.5) à température ambiante. Ensuite, elles sont incubées, 20 minutes à 37°C, dans une solution contenant 2 ml de collagénase (Type CLS, Worthington ou Cooper Biomedicals) 0,2% dans de l'Hepes buffer et 2 ml d'une solution de BSA/EDTA 0,5 et 0,02% respectivement. On récupère les cellules et la solution dans laquelle elles flottent, dans un tube à centrifuger à fond cône ainsi que 2 ml d'Hepes qui ont servi à rincer la boîte. Le tout est centrifugé 5 minutes à 1000 tours/minute. Le surnageant est éliminé alors que le culot est resuspendu dans 18 ml du milieu décrit ci-dessus et homogénéisé. On dépose, dans chaque boîte de 35 mm de diamètre, 2 ml du milieu contenant les cellules.

2. Expériences de microscopie électronique:

2.1. Isolement des HDL:

L'isolement des HDL (Poumay et Ronveaux-Dupal; 1985) est réalisé à partir de 80 ml de serum fraîchement récolté par le centre de Transfusion de la Croix-Rouge, à partir de différents donneurs volontaires. Le mélange de serum ainsi obtenu permet d'éviter l'influence d'éventuelles variations individuelles.

Les 80 ml de serum sont soumis à une première centrifugation de 5 minutes à 1000 tours/minute afin d'éliminer les éventuels globules rouges présents dans le serum.

On ajoute au serum un volume adéquat de BHT (Hydroxytoluène butylé) (Merck) 10 mM dans de l'éthanol 90°, pour obtenir une concentration finale de 10 µM, le BHT servant à protéger les lipoprotéines de l'oxydation.

La densité du serum est ajustée à 1.25 g/ml avec du KBr solide. Il est ensuite transféré dans deux tubes à centrifuger (Beckman Quick Seal) de 40 ml de volume; ceux-ci sont alors fermés. Une première centrifugation est réalisée dans un rotor vertical Beckman Vti 50 pendant 16 heures à 10°C et 49 000 tours/minute, dans une ultracentrifugeuse Beckman L5-65 équipée d'un système d'accélération lente. En fin de centrifugation, plus précisément à 2000 tours/minute, le frein est coupé pour permettre une décélération lente.

Le sommet des tubes est coupé à l'aide d'un scalpel et les lipoprotéines constituant la bande supérieure, sont récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rétréci. Les lipoprotéines des 2 tubes sont rassemblées (10ml) et mises à la densité de 1.30mg/ml avec du KBr solide. Nous déposons dans un tube à centrifuger Quick Seal, 30 ml de NaCl 0,9 % additionné de BHT(10 uM) et la solution de lipoprotéines est placée dans le fond du tube, sous le NaCl, à l'aide d'une seringue prolongée d'un fin tuyau. Une fois le tube rempli, il est scellé. La centrifugation est réalisée comme décrit ci-dessus pendant 180 minutes. Après la centrifugation, on peut observer dans le tube, 3 bandes distinctes correspondant aux VLDL, LDL et HDL. Ces 3 bandes sont récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rétréci et les HDL sont dialysées, pendant 72 heures contre un tampon isotonique contenant du NaCl 137 mM, du Tris 10 mM, de l'EDTA 0,01% et du BHT 10(-6) M, pH 7,4. Six changements sont effectués.

2.1.1. Dosage des HDL:

Après dialyse, les HDL sont filtrées sur un millex 0,22 µm; leur concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Lowry et al. (1951).

L'étalon utilisé est de l'albumine bovine (BSA) à une concentration de 0,4 mg/ml.

2.1.2 Préparation du sérum déficient en lipoprotéines (LPDS):

1. Fractionnement du LPDS

Après la première centrifugation, le fond de chaque tube est percé, 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 pauvres en cholestérol, pour constituer le LPDS.

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 stable (Analisis).

Le dosage s'effectue selon les réactions suivantes :

cholestérol estérase

Cholestérol esterifié -----> cholestérol + acides gras

cholestérol oxydase

Cholestérol -----> Cholestène-4, one-3+H₂O₂

2H₂O₂ + Phénol +

Amino-4-antipyrine -----> Quinone + 4H₂O

Les aliquots présentant une concentration en cholestérol inférieure à 8 mg/dl sont rassemblés et dialysés contre du PBS Dulbecco, pH 7,4.

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

2.2 Conjugué HDL-or colloidal:

2.2.1 Préparation des particules d'or de 17 nm:

Une solution d'acide tétrachloroaurique (Merck) à 1% dans de l'eau distillée est préparée à partir d'une solution stock à 4,12% conservée à l'abri de la lumière et à 4°C.

Extemporément, on prépare la solution réductrice en déposant, dans un pied gradué de 100 ml, 12 ml d'une solution de citrate de sodium à 1% (1,14g de citrate de Na, 2H₂O dans 100 ml d'H₂O distillée), filtrés sur une membrane Millex de 0,22µm auxquels

on ajoute 30 μ l d'une solution à 1% d'acide tannique (0.2g dans 20 ml d'H₂O distillée) et 30 μ l de K₂CO₃ (Merck) 25 mM (0,07g dans 20 ml d'H₂O distillée). Le volume est ensuite porté à 60 ml.

L'or colloïdal est préparé dans un erlenmeyer en verre, surmonté d'une colonne à refroidissement permettant un chauffage à reflux. La vaisselle utilisée pour la préparation de l'or colloïdal doit être extrêmement propre et est rincée une dernière fois avant utilisation, en portant à ébullition de l'eau distillée qui est ensuite éliminée.

Dans l'erlenmeyer, on dépose 3 ml de la solution d'HAuCl₄ à 1%, portée ensuite à 240 ml avec de l'H₂O distillée, chauffée jusqu'à ébullition en présence d'un agitateur magnétique.

Au moment de l'ébullition, on diminue la vitesse d'agitation et on ajoute la solution réductrice en une seule fois; la vitesse d'agitation est réaugmentée et l'ensemble est chauffé pendant 30 minutes. Au moment de la réduction, la solution d'HAuCl₄ devient mauve puis, vire au rouge (couleur vin) après 5 minutes.

La solution est ensuite refroidie et conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

2.2.2 Préparation du conjugué HDL-or:

2 méthodes ont été utilisées :

a) Méthode n°1

C'est la méthode de Handley (1981) modifiée par De Mey (1986). Toutes les dilutions de protéines sont réalisées dans de l'eau distillée.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une courbe isotherme de façon à déterminer la quantité minimale de protéines nécessaire pour stabiliser les particules d'or (De Mey, 1986).

Différentes dilutions de la solution de HDL sont préparées avec de l'eau distillée. On prélève 100 μ l de chaque dilution que l'on mélange à un ml de la solution d'or colloïdal. On ajoute ensuite 100 μ l d'une solution de NaCl 10% dans de l'eau distillée. Le tout est mélangé au vortex et l'absorbance est mesurée à 580 nm (A₅₈₀) après 5 minutes. La floculation augmentant l'absorbance de la solution, il est

possible de détecter la quantité minimale de protéines nécessaire pour stabiliser l'or.

Dans 40 tubes à essai, on dépose 50ul de la solution de HDL (3mg/ml dans de l'eau distillée) auxquels on ajoute 450 ul d'eau distillée. A ces 500 ul, on ajoute rapidement et en un jet, 5 ml d'or colloïdal, à l'aide d'une pipette. Le contenu de 5 tubes à essai est rassemblé dans un tube à centrifuger en polycarbonate et on dépose un coussin de 7,5 ml de saccharose 35%, préparé extemporanément, dans de l'eau distillée, dans le fond du tube à l'aide d'une seringue munie d'un fin tuyau. Les tubes sont centrifugés 30 minutes à 7500 tours/minute et à 4°C dans une centrifugeuse Beckman type JA 21 (rotor Beckman JA 20).

Après la centrifugation, le surnageant contenant les lipoprotéines non conjuguées est éliminé et le culot mobile contenant le conjugué, est récupéré et dialysé, une nuit, contre du PBS Dulbecco PH 7.4, afin d'éliminer le saccharose.

Le lendemain, le conjugué est filtré sur une membrane Millex 0,22um avant son utilisation.

b) Méthode n°2

Le conjugué HDL-or est préparé de manière identique à la préparation du conjugué des LDL décrite par Handley et al.(1981); cependant la concentration en protéines est beaucoup plus élevée(Toth,1986).

Différentes dilutions de la solution de HDL sont réalisées. D'une part, les HDL sont diluées dans de l'eau distillée et dans de l'EDTA 0,05M de façon à obtenir une concentration de 200 ug de protéine par ml de la solution d'or colloïdal. On prélève 500ul de ces solutions auxquelles on ajoute rapidement, en un jet 5ml de la solution d'or colloïdal. On obtient ainsi une concentration finale de 18,2ug de protéines par ml de la solution d'or.

D'autre part, on prélève 200, 300, et 400ul de la solution de HDL dans de l'eau distillée (200ug/ml), auxquels on ajoute un volume adéquat d'EDTA 0,05 M de façon à obtenir 500ul au total. On ajoute alors les 5ml d'or colloïdal comme décrit ci-dessus. On obtient

respectivement des concentrations finales en protéines de 7,3, 11,4 et 14,8 ug/ml.

Le reste de la manipulation est identique à la méthode n°1, excepté que la centrifugation est d'une durée de 60 minutes au lieu de 30.

2.3 Observation du conjugué et des HDL en coloration négative:

Grâce à un évaporateur Edwards, on dépose, sous vide, une fine couche de carbone sur des grilles recouvertes d'un film de Formvar(Merck). Une goutte de la solution de HDL ou de conjugué est déposée sur la grille grâce à une pipette Pasteur. L'excès de liquide est éliminé avec un papier filtre. La coloration est réalisée en déposant une goutte d'acétate d'uranyle 1% (1g dans 100 ml d'eau distillée) préparée extemporanément, pendant 30 secondes. L'excès de colorant est enlevé avec un papier filtre. Les grilles sont observées au microscope Philips EM 301 à 60Kv.

2.4 Etude de la liaison du conjugué avec les cellules endothéliales:

2.4.1 Etude de la liaison:

Les cellules endothéliales sont cultivées comme décrit au point 1.1 et utilisées à confluence de la première sous-culture, dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre.

Les cellules sont incubées pendant 18 heures dans du milieu M199 (Flow Laboratories) additionné de LPDS 10%.

Les cellules endothéliales sont alors préréfroidies pendant 30 minutes à 4°C, puis incubées à 4°C pendant 60 minutes avec le conjugué HDL-or colloïdal diluées dans du milieu préréfroidi de façon à obtenir une concentration de 15 à 20 ug de protéines par ml de milieu. Les cellules ensuite lavées 3 fois, à 4°C, avec du PBS Dulbecco contenant de l'albumine bovine 0,2%(Merck), puis lavées 3 fois avec du PBS Dulbecco seul de façon à éliminer les conjugués liés de façon non spécifique (Poumay, 1988).

2.4.2 Effet du cholestérol:

Les cellules sont incubées pendant 24 et 48 heures dans du milieu M199 additionné soit de LPDS 10%, soit de serum de veau nouveau-ne 20% auxquels sont ajoutés de l'albumine bovine "fatty acid free" (Sigma) 0,2 % et du cholestérol, 50ug/ml de milieu provenant d'une solution stock a 10 mg/ml dans de l'ethanol 97°.

Les cellules sont alors lavées intensément à température ambiante avec du milieu additionné d'albumine 0,2% afin d'éliminer le cholestérol en excès.

Les cellules sont prérefroidies 30 minutes à 4°C. Les HDL marquées sont diluées dans du milieu avec ou sans LPDS 10% de façon à obtenir des concentrations de 5,10,25 et 50 ug de protéines par ml de milieu. Les lavages sont identiques à ceux décrit ci-dessus.

2.5 Préparation des cellules endothéliales en culture pour l'observation en microscopie électronique à transmission:

2.5.1 Fixation des cellules:

On dépose dans la boîte de culture un ml d'une solution de glutaraldéhyde 2,5%(Ladd Laboratories) dans du tampon cacodylate 0,1M PH 7,4. Les cellules sont incubées 90 minutes à 4°C dans ce fixateur.

Trois rinçages rapides au cacodylate 0,1M PH 7,4 sont alors réalisés à 4°C.

2.5.2. Post-fixation:

Celle-ci est effectuée en plaçant dans la boîte de Pétri un ml de tetroxyde d'osmium (OSO₄ BDH Chemicals) 0,5% dans du tampon cacodylate 0,1M, PH 7,4 pendant une heure à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont alors rincées rapidement trois fois dans du tampon cacodylate 0,1M, PH 7,4.

2.5.3 Déshydratation et enrobage:

Les cellules sont déshydratées dans des solutions de plus en plus concentrées d'éthanol. Les cellules sont soumises à 3 rinçages de 1 minute chacun, avec de l'éthanol 70° et à 4°C. Les mêmes opérations sont répétées avec de l'éthanol à 90° à 4°C et sont suivies de trois rinçages de 10 minutes chacun dans de l'éthanol absolu à température ambiante.

L'enrobage est réalisé dans de l'Epon 812 (TAAB). Les boîtes sont rincées pendant 2 à 3 minutes avec de l'Epon liquide. Cet Epon est éliminé et remplacé par de l'Epon frais de façon à obtenir une épaisseur d'environ 5mm. La polymérisation est réalisée dans une étuve Reichert à 60°C pendant 72 heures.

Des coupes ultrafines réalisées parallèlement et perpendiculairement à la surface de la culture, ont été réalisées à l'ultratomer LKB. Les coupes perpendiculaires sont déposées sur des grilles recouvertes d'un film de formvar. Les grilles sont colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb.

3. Expériences de liaison avec HDL3 sans apo E-free iodées:

3.1 Isolement des HDL3:

Les HDL3 utilisées pour ces expériences ont été isolées dans le laboratoire de Biochimie (Docteur Mazière) du CHU Saint-Antoine à Paris, à partir de sérum humain et par la technique d'ultracentrifugation séquentielle (Havel, 1955).

3.2 Chromatographie d'affinité pour le retrait de l'apo E:

Les HDL3 sont passées sur une colonne de 16 mm de diamètre et 20 cm de longueur (C16/20, Pharmacia) contenant 5g de gel Sepharose-Héparine (Pharmacia) équilibrés dans un tampon contenant du TRIS 0,005 M, du NaCl 0,05M et de l'EDTA 0,1%. Le tampon utilisé pour le passage des HDL3 est le même que celui utilisé pour l'équilibration de la colonne.

Le débit de la colonne est de 21 ml à l'heure (Weisgraber and Maley, 1980). On ne récupère que les tubes contenant les HDL₃ correspondants au sommet du pic obtenu pour éviter une dilution trop importante des lipoprotéines.

L'élution de l'apo E est réalisée grâce à un tampon contenant du TRIS 0,005 M et du NaCl 0,5M

3.3 Iodination des HDL₃ apo E-free et mesure de l'activité spécifique:

33.1 Iodination des HDL₃ (Méthode de Mc Farlane (1958) modifié par Bilheimer et al (1972)):

Les lipoprotéines sont dialysées 24 heures contre un tampon glycine à pH 10 contenant du NaCl 0,1M; du NaOH 1N et de la glycine (Janssen Chimica) 0,1 M.

Dans un tube à centrifuger en verre siliconé, on dépose 3 ml d'une solution stock d'ICI (Merck - 53,4 mg dans 10 ml d'HCl 1N) auxquels on ajoute 5 ml de CCl₄ (Merck). Le tout est fortement vortexé et centrifugé 10 minutes à 4000 RPM et 10°C. On récupère 1 ml d'ICI après centrifugation dont on dilue 40 µl dans 960 µl de glycine 2M.

Les HDL₃ apo E-free sont diluées dans le tampon glycine pH 10 de façon à obtenir un volume de 1,5 ml à une concentration de 2 mg/ml.

Sous la hotte, on ajoute 200 µl de tampon glycine pH 10 à 1 mCurie d'Iode 125 (Amersham). Le tout est récupéré et ajouté aux HDL avec un rapide mouvement d'agitation. Les HDL iodées sont dialysées en continu durant 24 heures contre un tampon à pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M, du TRIS 10 µM et de l'EDTA 0,01%.

33.2 Mesure de l'activité spécifique.:

A 5 µl de HDL₃ marquées; on ajoute 1 ml de BSA (Boehringer) 1% dans de l'eau distillée et 500 µl de TCA 50%. On réalise une centrifugation à 3500 RPM pendant 10 minutes. On prélève 500 µl du

surnageant et on compte la radioactivité de ce volume mais également du culot grâce au compteur (LKB, Wallac Minigamma 1275).

Les protéines sont dosées par la méthode de Peterson.

3.4 Expériences de liaison:

3.4.1 Préparation des cellules endothéliales:

Les cellules sont incubées 24 heures soit dans du milieu de culture additionné d'albumine bovine fatty acid-free (Sigma) 0,2% et de cholestérol, 50ug/ml, provenant d'une solution stock à 10 mg/ml dans de l'éthanol 97°, soit dans le même milieu mais sans cholestérol. Dans le cas où les cellules ont été mises en présence de cholestérol, elles sont lavées deux fois à température ambiante avec du milieu de culture additionné d'albumine bovine 0,2% de façon à éliminer le cholestérol en excès.

3.4.2 Etudes de la liaison:

Les cellules sont prérefroidies pendant 15 minutes à 4°C dans du milieu MF10 ou M199 contenant de l'albumine 0,2% et de l'Hepes(4,5g/l). Pour les expériences de compétition, les LDL et HDL froides sont également ajoutées à ce moment.

Ensuite, on ajoute les HDL marquées à l'iode 125 et le tout est incubé une heure à 4°C.

Après incubation, les boîtes sont lavées deux fois avec du PBS Dulbecco additionné d'albumine 0,1%, deux fois avec du PBS Dulbecco seul et, une fois avec du NaCl 0,9%.

On dépose alors dans chaque boîte environ 2ml de NaCl 0,9% et on gratte le fond de la boîte, à l'aide d'une tige de plastique, pour décoller les cellules. On récupère le tout dans un tube à centrifuger ainsi que le NaCl 0,9% utilisé pour rincer une fois la boîte après le grattage.

Une centrifugation de 5 minutes à 1500 tours/minute et 10°C est alors réalisée. Le surnageant obtenu alors est éliminé et on compte la radioactivité présente dans le culot à raison de 1 minute par tube avec le compteur ad hoc.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Peterson.

3.4.3 Etudes de la liaison à 37°C:

Les cellules sont incubées à 37°C dans du milieu contenant de l'albumine 0,2%, de l'Hepes (4,5 g/l) et les I 1 2 5 - HDL3 apo E-free (20 ug/ml). Différents temps d'incubations ont été réalisés.

Après incubation, le même protocole que les expériences à 4°C est suivi excepté que dans ce cas, le milieu d'incubation est récupéré de façon à éliminer la dégradation spécifique de I-HDL en mesurant la radioactivité soluble dans l'acide trichloracétique.

Dosage de protéines par la méthode de Peterson:

Ce dosage est valable pour des concentrations en protéines de l'ordre de 0 à 100 µg.

L'étalon utilisé est l'albumine bovine (BSA) à une concentration de 0,1 mg/ml. Pour chaque dosage, une nouvelle droite d'étalonnage est réalisée à partir des concentrations de 25, 50, 75 et 100 µg/ml.

Dans chaque tube contenant le culot, on ajoute 100 µl de NaOH 0,1 N, on mélange et on laisse reposer 30 minutes à température ambiante.

On prépare une solution contenant 1 volume d'une solution CTC (50 g de Na₂CO₃, 0,5 g de CuSO₄ · 5 H₂O, 1 g de tartrate de Na et K dans 500 ml H₂O distillée), 1 volume de NaOH 0,8 N, 1 volume H₂O distillée et 1 volume de SDS 10 %.

On ajoute 1 ml de cette mixture à chaque tube et on agite. Après 10 minutes, on ajoute 0,5 ml du réactif de Folin dilué 6 fois dans de l'eau distillée, on agite et on attend que la coloration soit stabilisée (20 à 30 minutes).

On lit l'absorbance à 750 nm.

4. Essai de mise au point d'une technique d'isolement des HDL3:

4.1 Méthode utilisant un gradient linéaire de KBr et le rotor VTI 50:

La fraction des HDL est obtenue par la méthode d'isolement de Poumay et Ronveaux-Dupal (1985) déjà décrite ci-dessus, au point 2.1.

La bande correspondante aux HDL (7 ml) est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur à bout recourbée ainsi qu'une partie de la couche sous-jacente de façon à obtenir un volume d'environ 10 ml.

Dans un tube Quick Seal d'une capacité de 40 ml, on réalise un gradient linéaire de KBr pour des densités comprises entre 1,11 et 1,21 g/ml, sur lequel, on dépose avec précaution les 10 ml de la fraction de lipoprotéines récupérée.

Le tube est scellé et centrifugé pendant 17 heures dans un rotot VTi 50 (Beckman) à 10°C, 50 000 tours/minute et dans une centrifugeuse Beckman L5-65.

Après centrifugation, le tube est coupé à l'aide d'un appareil à couper les gradients et des fractions d'environ 2 ml sont recueillies. La densité de chaque fraction est mesurée au réfractomètre et calculée par interpolation à partir des tables de densité pour le KBr. Les fractions comprises entre les densités de 1,11 à 1,13 g/ml sont rassemblées ainsi que celles comprises entre les valeurs 1,14 et 1,21 g/ml.

4.2 Méthode utilisant un gradient linéaire de KBr, les rotors TI60 et VTI 50:

Un volume de 100 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 (Coetzee et al., 1986).

On ajoute à ce sérum, un volume adéquat de BHT (Merck) 10 mM dans l'éthanol 97°, afin d'obtenir une concentration finale de 10 µM pour protéger les lipoprotéines de l'oxydation de leurs constituants.

Le sérum est ensuite ajusté à la densité de 1,063 g/ml avec du KBr solide et réparti dans 3 tubes à centrifuger (en polyallonger (Kontron) d'une capacité de 39ml) Cette valeur correspondant à la limite inférieure de la densité des HDL. Les 3 tubes sont scellés avec des bouchons adéquats, sont placés dans un rotor Ti 60 et centrifugés pendant 15 heures à 50 000 tours/minute à 10°C dans une centrifugeuse Beckman L5-65.

Après centrifugation, la bande présente au sommet de chaque tube, de couleur orange-blanchâtre, est éliminée et les infranatants sont rassemblés, mis à la densité de 1,25 et centrifugés pendant 20 heures

dans un rotor Vti 50, à 50 000 tours/minute, 10°C dans la même centrifugeuse que celle déjà utilisée.

On récupère alors les 3 bandes supérieures présentes dans le tube, on les met à la densité de 1,25 g/ml avec du KBr solide et on les dépose dans le fond d'un tube Quick Seal d'une capacité de 40 ml. On réalise alors sur ces lipoprotéines, un gradient linéaire de KBr pour des valeurs de densité comprises entre 1,11 et 1,21 g/ml. Le tube est scellé et centrifugé pendant 15 heures dans les mêmes conditions que la centrifugation précédente.

Le tube est coupé à l'aide de l'appareil à couper les gradients et des fractions d'environ 2 ml sont récupérées. Leur densité est mesurée comme décrit au point 4.1. Les fractions dont la densité est comprise entre 1,13 et 1,21 g/ml sont recueillies, mises à la densité de 1,25 avec du KBr solide et centrifugées sur un coussin de KBr à la densité de 1,30 g/ml, pendant 20 heures dans les mêmes conditions de centrifugation que précédemment.

La bande supérieure de couleur jaune est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rétréci.

4.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE):

Ces électrophorèses sont réalisées de façon à mettre en évidence les apolipoprotéines caractéristiques des différentes lipoprotéines. Nous avons utilisés des gels à 12 et 15%.

4.3.1. Préparation des gels:

a) gel de séparation

Les solutions utilisées pour les 2 types de gel sont identiques, seules les quantités varient dans la préparation

	gel 12%	gel 15%
Tris Hcl 1,5 M pH 8,8		
SDS 0,4%	2,5 ml	2,5
ml		
Acrylamide 30%		
BIS 0,8%	4 ml	5
ml		
H2O	3 ml	2
ml		
Temed	10 ul	
10 ul		
APS 1%	0,5 ml	
0,5 ml		

b) gel d'empilement est identique dans les 2 cas :

Tris Hcl 0,5 M pH 6,8	
SDS 0,4%	1,25 ml
Acrylamide 30%	
Bis 0,8%	0,5 ml
H2O	2,75 ml
Temed	5 ul
APS 1%	0,5 ml

Le gel de separation est coule en premier lieu et sa polymerisation dure 45 minutes; ensuite on coule le gel d'empilement qui nous

permettra de déposer les échantillons. Sa polymérisation dure également 45 minutes.

4.3.2 Préparation des échantillons:

Dans des Eppendorfs, on dépose 50 µl des échantillons à analyser auxquels on ajoute 50 µl d'un tampon solubilisateur et 7 µl de 2B-mercapto-éthanol 20%. Celui-ci servant à réduire les protéines. Le tout est chauffé 4 minutes dans de l'eau bouillante.

4.3.3 Electrophorèse.

Celle-ci est réalisée dans une unité de séparation Mini-PROTEAN II alignant Card des laboratoires BIO-RAD. On dépose dans chaque puits du gel d'empilement 10 µl des échantillons à analyser. Ceux-ci sont soumis, pendant 45 minutes, à un champ électrique d'une tension de 200 Volts.

La fixation des gels est réalisée dans du TCA 12% et dure 30 minutes.

Les protéines sont mises en évidence par une coloration au Bleu de Coomassie R 250.

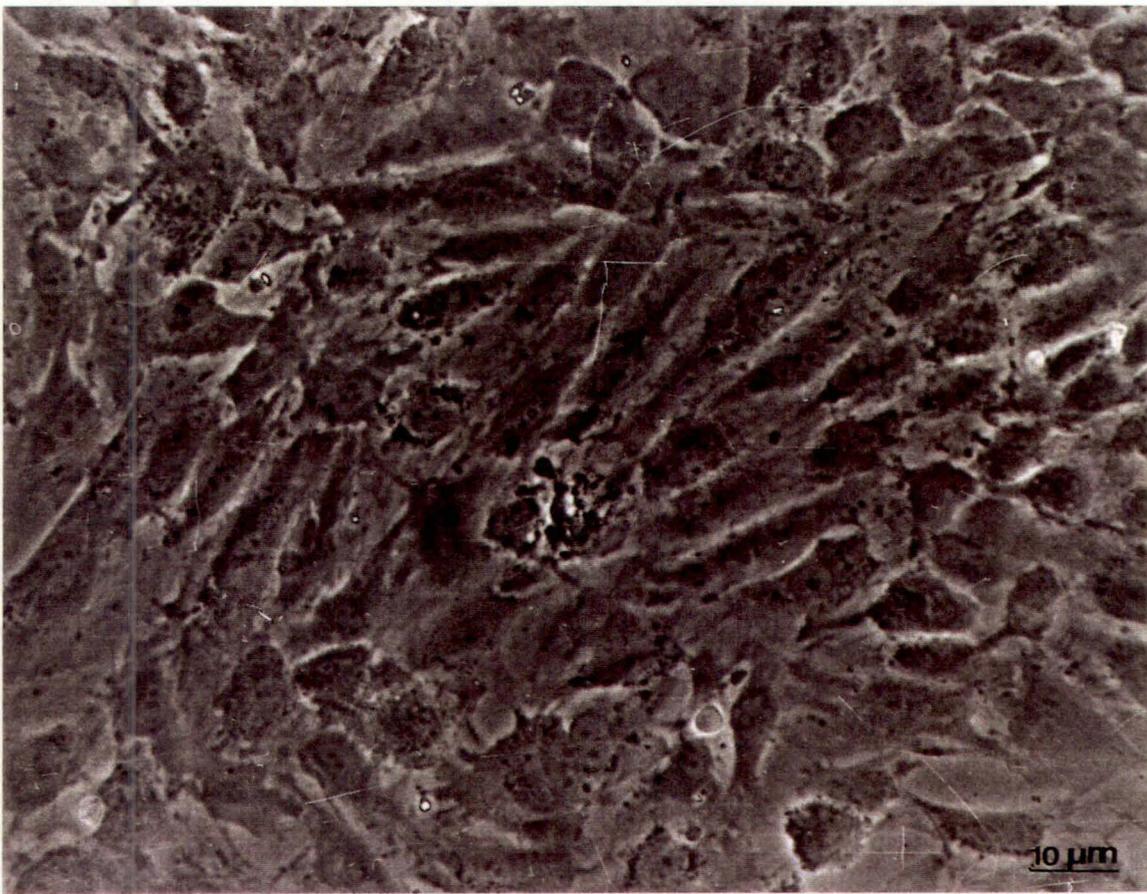


Fig. 1 Cellules endothéliales humaines de veine ombilicale, à confluence, en fin de première sous-culture, photographiées au microscope inversé à contraste de phase.

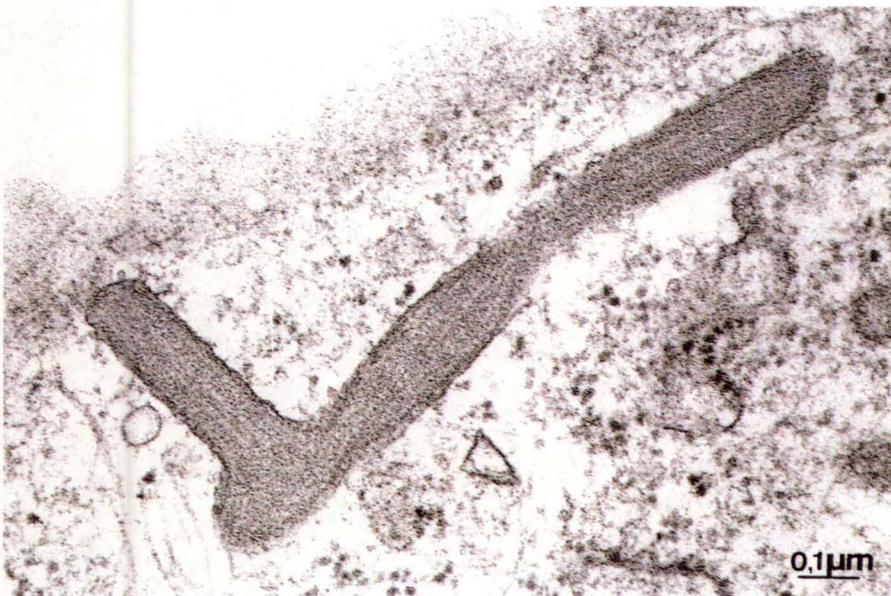


Fig. 2 Micrographie électronique d'un corps de Weibel-Palade présent dans une cellule endothéliale Dans une coupe réalisée parallèlement à la surface de la boîte de culture.

Résultats et commentaires:

1. Identification des cellules endothéliales en culture:

Les cellules endothéliales ont été utilisées en fin de première sous-culture et à confluence pour toutes les expériences morphologiques et biochimiques.

Les cellules en culture observées au microscope à contraste de phase inversé, présentent l'aspect de monocouches caractéristiques de ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Jaffé, 1984) et dans notre laboratoire (Poumay 1988).

Une première identification des cellules endothéliales se base sur l'aspect des monocouches formant une sorte de "pavement" de cellules plus ou moins polyédriques, collées les unes contre les autres mais ne se recouvrant pas. A confluence, on n'observe plus d'espace entre les cellules et celles-ci adhèrent fortement au fond de la boîte.(fig.1)

L'observation en microscopie électronique à transmission nous a permis une identification plus spécifique des cellules endothéliales par l'observation des corps de Weibel-Palade (fig. 2). Ils sont caractéristiques des cellules endothéliales et ont l'aspect de corps oblongs de 0,1 μm de large et 2 à 3 μm de long et leur matrice contient de fins tubules disposés parallèlement au grand axe de l'organite.

2. Etude morphologique de l'interaction entre les cellules endothéliales et les HDL:

2.1 Isolement des HDL

Pour ces expériences, nous avons utilisé des HDL isolées par la technique de Chung et al. (1980) modifiée (Poumay and Ronveaux-Dupal, 1985).

Cette technique a l'avantage de fournir, en moins de 24 heures, des VLDL, des LDL, des HDL et du LPDS.

Nous avons caractérisé la fraction HDL par une coloration négative. (fig 3a) On peut observer des particules de taille légèrement différente qui correspondent à des HDL2 et HDL3. Nous avons

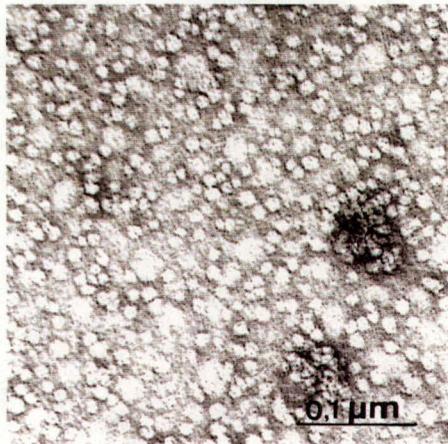


Fig. 3a Micrographie électronique en coloration négative de la fraction HDL obtenue après ultracentrifugation du gradient discontinu, dans un rotor VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 180 minutes. Les lipoprotéines sont diluées 100 fois dans l'EDTA 0,05M.

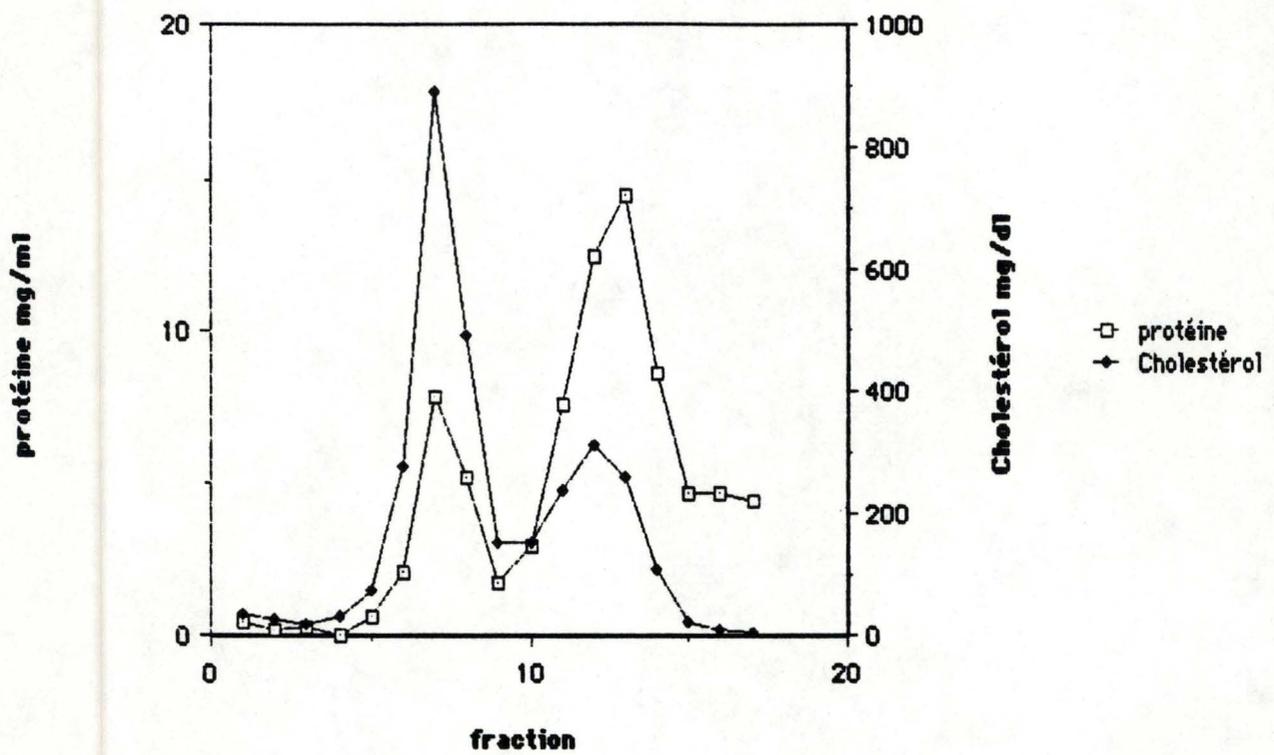


Fig. 3b Distribution du cholestérol total et des protéines dans les fractions du gradient discontinu après ultracentrifugation dans un rotor vertical VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 180 minutes.

egalement dose le cholesterol et les proteines de toutes les fractions (fig. 3b)

Il est bien clair que cette technique nous fournit une fraction totale de HDL.

2.2 Mise au point du marquage des HDL à l'or colloïdal:

La technique du marquage à l'or colloïdal présente un certain nombre d'avantages dont voici les principaux :

- la liaison entre la particule d'or et la molécule biologique est une adsorption non covalente qui n'altère pas les propriétés physiologiques du matériel étudié;

- la preparation des particules d'or est tres facile et elle permet d'obtenir des particules de taille très variée;

- les particules d'or sont très denses aux électrons et ont une apparence caractéristique qui permet de les distinguer des structures biologiques.

Pour visualiser les HDL en microscopie électronique a transmission, nous avons choisi de les coupler à des particules d'or de 17 nm de diamètre.

2.2.1 Observation des particules d'or:

L'observation en coloration négative des particules d'or, nous permet d'estimer le diamètre moyen de celles-ci à $16,8 \pm 2,4$ nm ($n=100$), la plus petite ayant un diamètre de 12,8 et la plus grande de 22,4 nm.

Les particules sont concentriques et leur forme assez homogène (fig. 4)

Commentaires

La methode de Frens (1973) donne des particules d'or dont la taille est fonction du volume de citrate ajouté. Avec l'augmentation de la taille, l'hétérogénéité des particules d'or augmente également aussi bien pour le diamètre que pour l'excentricité (Goodman et al., 1981).

2.2.2 Le conjugué HDL- or colloïdal:

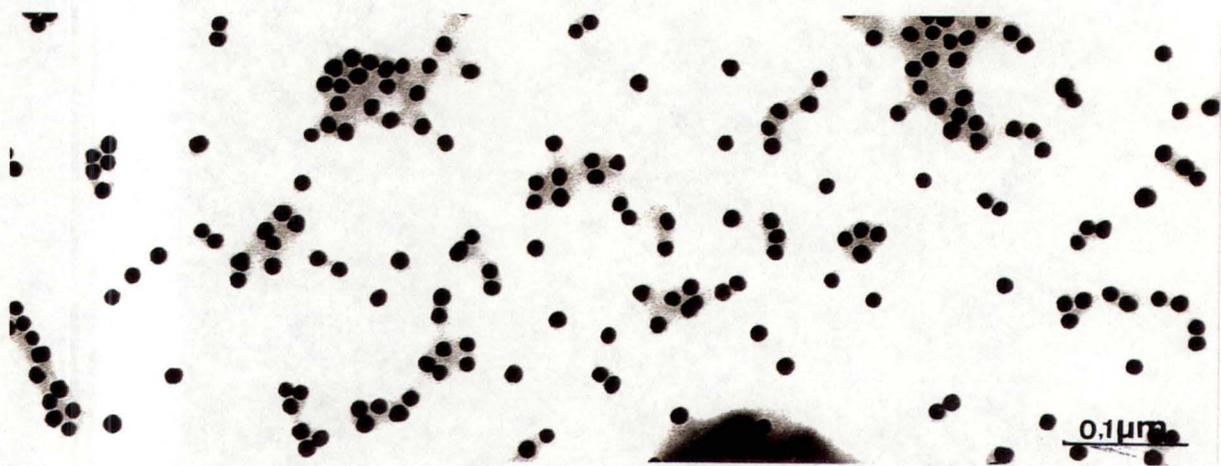


Fig. 4 Micrographie électronique en coloration négative des particules d'or de 17 nm de diamètre préparées selon la technique de Frens (1973).

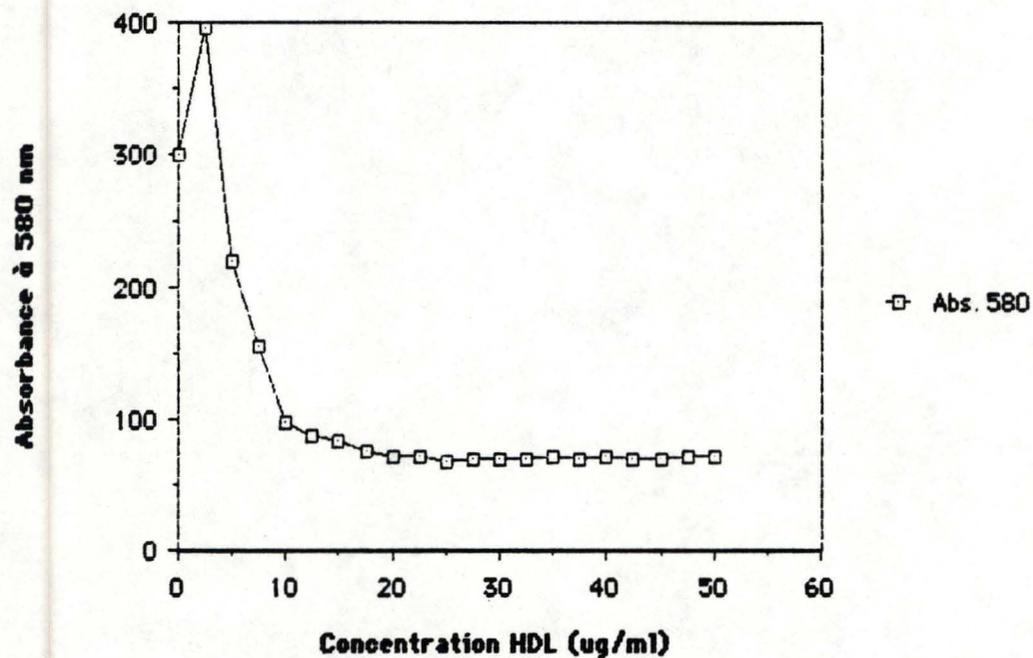


Fig. 5 Courbe isotherme à concentration variable en HDL.
(Construite selon de Mey, 1986).

Deux méthodes ont été employées : d'une part, nous nous sommes basés sur la technique habituellement utilisée dans notre laboratoire pour la préparation du conjugué LDL-or et d'autre part, nous avons utilisé la technique décrite par Toth(1986) pour la préparation du conjugué HDL-or.

Résultats:

Méthode n° 1

Dans cette méthode, toutes les dilutions sont réalisées dans de l'eau distillée.

Dans un premier temps, nous avons réalisé la courbe isotherme nous permettant de déterminer la quantité minimale de HDL nécessaire à la stabilité des particules d'or (fig 5) Cette valeur est estimée à 25 µg de protéines de HDL par ml de solution d'or colloïdal. Nous avons choisi une concentration de 30 µg de protéines par ml afin de nous trouver au-delà du minimum. Les HDL en excès étant éliminées sur la couche de saccharose lors de la centrifugation.

L'observation en coloration négative de ce conjugué ne révèle que très peu de conjugué. Les particules d'or forment des agrégats et dans le cas où des HDL sont couplées, elles sont au maximum au nombre de 2 par particule d'or (fig 6).

Cette technique ne semble donc pas convenir pour la préparation du conjugué HDL-or.

Méthode n° 2

Sur base de l'article de Tóth, nous allons introduire de l'EDTA 0,05M dans la préparation de notre conjugué.

Résultats:

Différentes dilutions ont été réalisées avec des quantités variables d'EDTA.(voir matériel et méthodes).

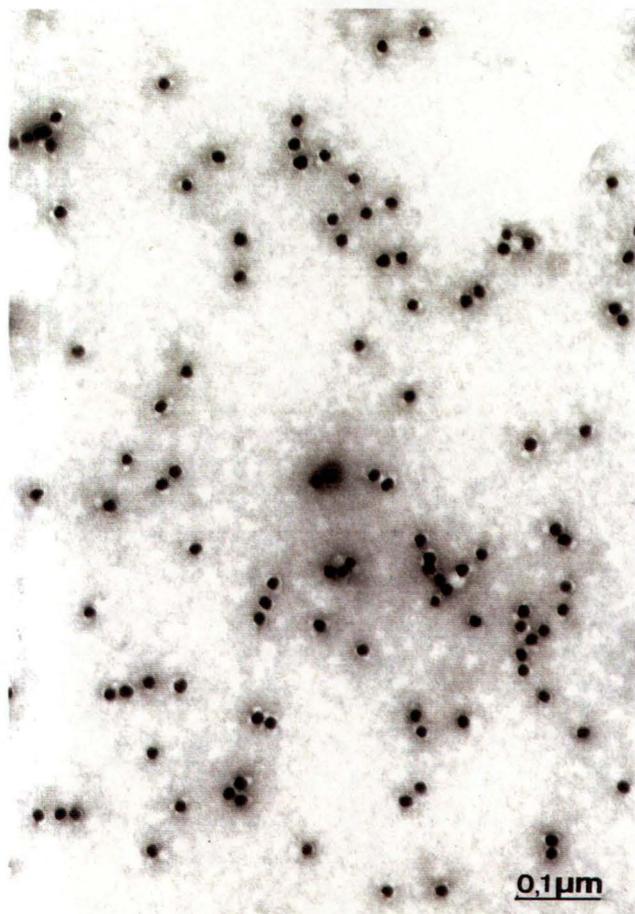


Fig. 6 Micrographie électronique en coloration négative du conjugué HDL-or préparé à partir d'une solution de HDL diluées dans de l'eau distillée selon la méthode n°1.

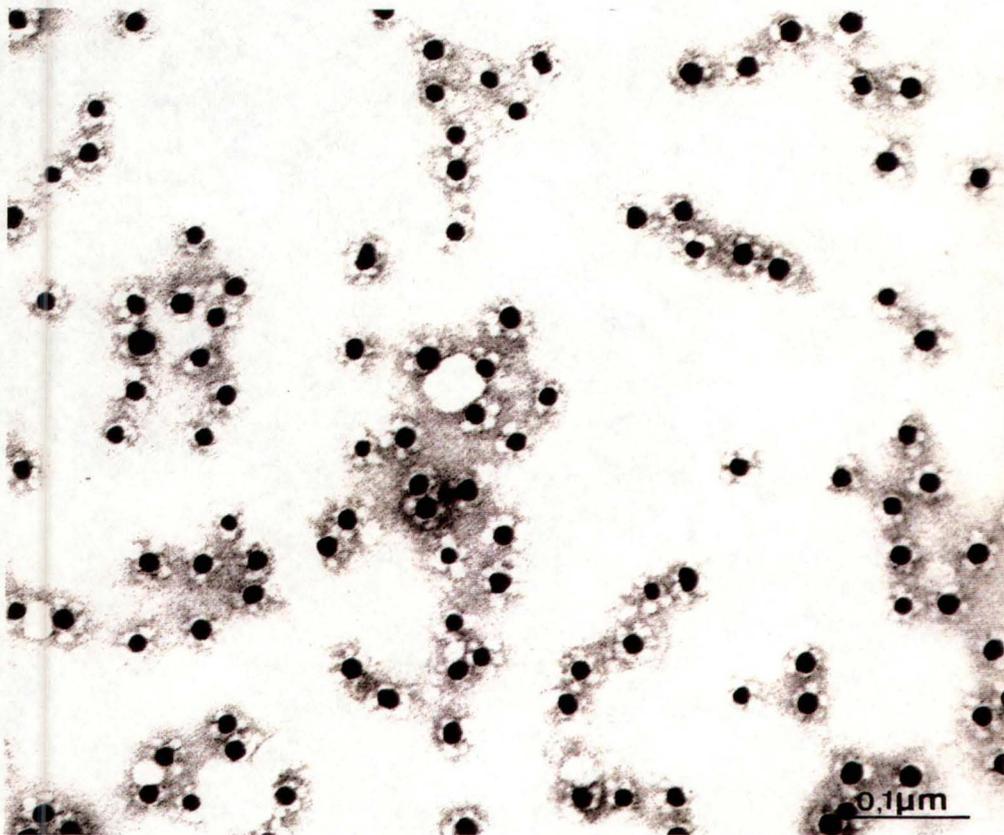
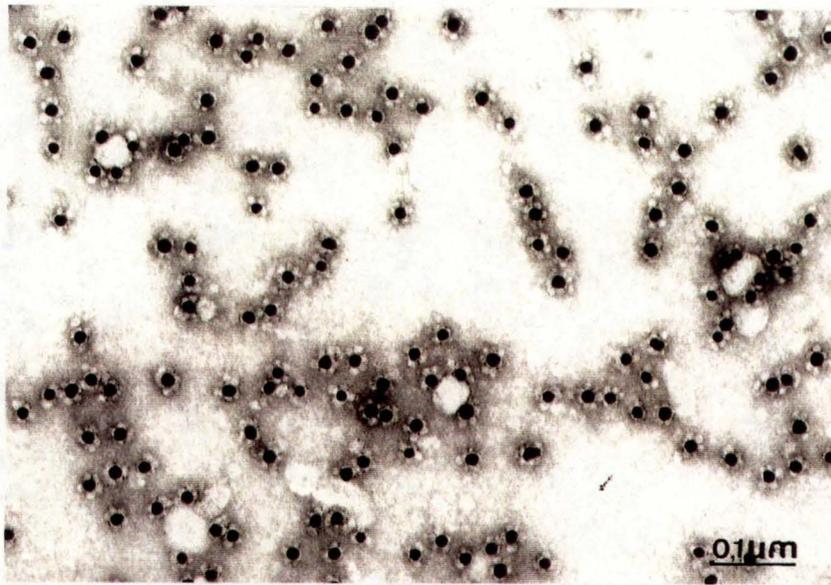


Fig. 7 Micrographies électroniques en coloration négative du conjugué HDL-or préparé à partir d'une solution de HDL diluées dans de l'EDTA 0,05 M selon la méthode n°2.

Dans le cas où les HDL ont été diluées dans l'eau pour obtenir une concentration de 18,2 µg/ml, nous observons les mêmes résultats que dans la méthode précédente.

Pour les dilutions intermédiaires en EDTA, le conjugué apparaît beau mais le nombre de HDL par particule d'or est très variable. Certaines particules n'étant pas conjuguées.

Dans le cas où les HDL sont diluées dans l'EDTA 0,05M et qu'elles sont maintenues à la concentration de 18,2 µg/ml, toutes les particules d'or sont très bien conjuguées. Le conjugué est formé d'une particule d'or centrale entourée des HDL (fig 7). En tenant compte des lipoprotéines se trouvant au-dessus et en-dessous de la particule d'or, le nombre de HDL varie de 9 à 11 par particule, ce qui semble correspondre au conjugué utilisé dans d'autres travaux. (Toth, 1986).

Commentaires:

Rôle de l'EDTA:

Au vu de ces résultats, on constate que l'EDTA joue un rôle important dans la conjugaison des HDL car en son absence, le conjugué ne se forme pas.

L'EDTA étant un chélateur, il pourrait peut-être diminuer la quantité d'électrolytes présents dans la préparation des HDL et favoriser ainsi le couplage. En effet, ceux-ci déstabilisent l'or colloïdal et entraînent sa floculation. (De Mey, 1986).

Après l'isolement des HDL, il est important de diluer celles-ci dans de l'EDTA car celui-ci est un chélateur des ions de métaux lourds qui catalysent la peroxydation des lipides par l'oxygène moléculaire. (Verne et al., 1986). Cette peroxydation entraîne une agrégation des lipoprotéines; or lors de la préparation du conjugué, la présence d'agrégats est à éviter. (Handley, 1989).

Rôle du pH :

Le pH est important pour les liaisons entre les protéines et l'or. L'adsorption est plus forte à un pH correspondant plus ou moins au point isoélectrique des protéines. A ce pH, la forme zwitterion des protéines est dominante et la tension interfaciale est maximale. Ceci résulte en une adsorption plus stable et plus forte à la surface des particules d'or (De Mey, 1986).

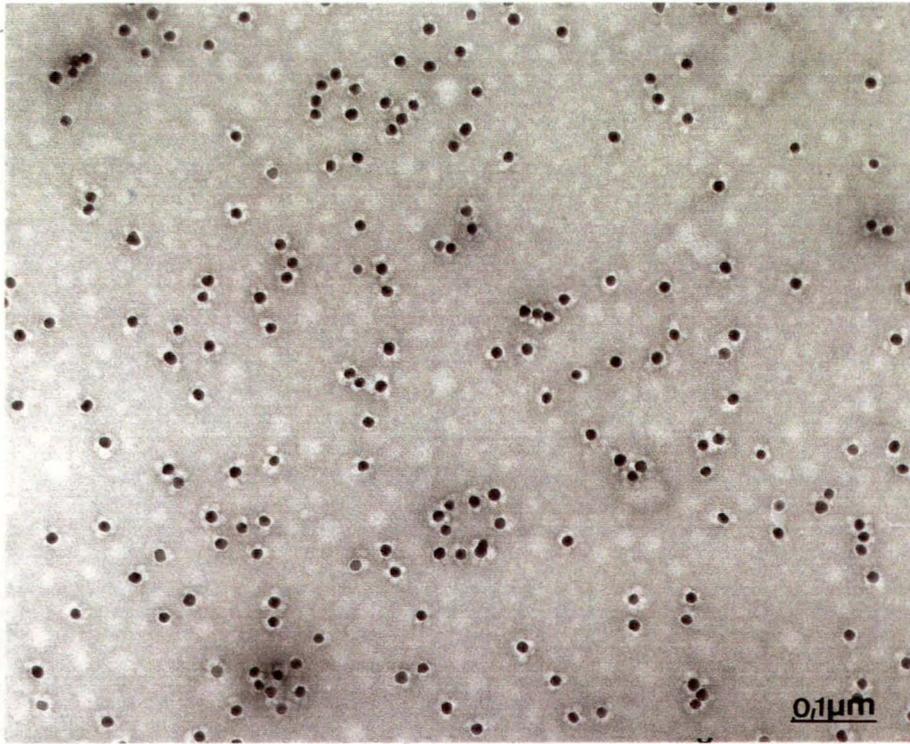


Fig. 8a Micrographie électronique en coloration négative du conjugué HDL-or soumis à une dialyse.

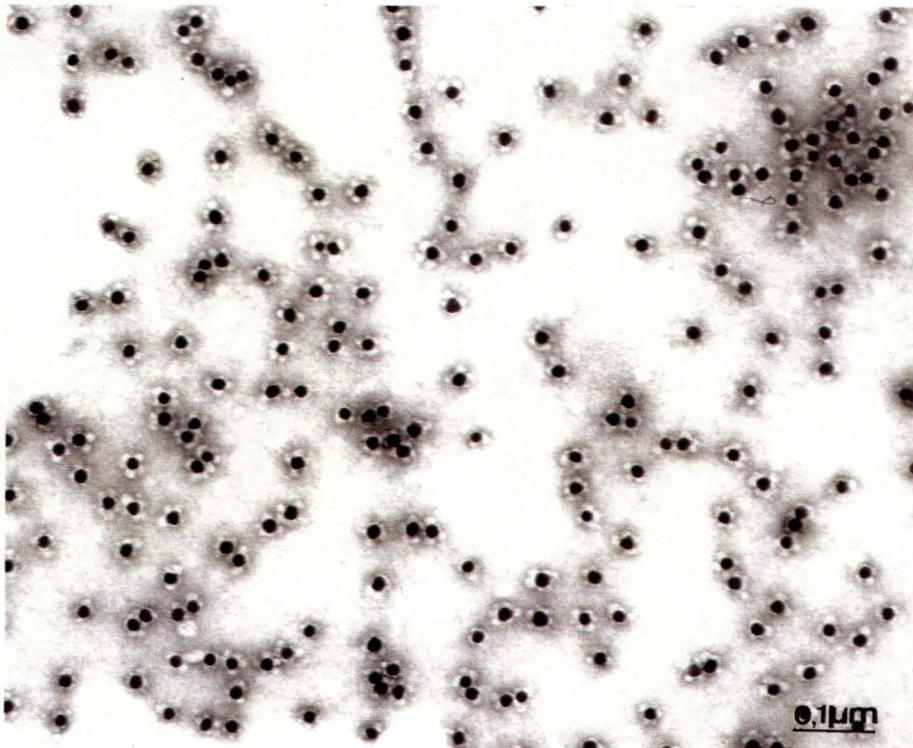


Fig. 8b Micrographie électronique en coloration négative du conjugué HDL-or soumis à six dialyses.

Le point isoelectrique des lipoproteines est de 5,5. Au-dessus de ce point, elles sont chargées négativement (Mills et al, 1984). Nous avons vérifié le pH des HDL diluées dans l'eau distillée et dans l'EDTA. Il est respectivement de 6,49 et de 4,67.

Importance de la dialyse

Nous avons ensuite voulu tester l'effet de la dialyse sur le conjugué. Cette dialyse a pour but d'éliminer le saccharose et l'EDTA afin d'obtenir un conjugué purifié (Handley, 1981).

Six dialyses et une dialyse ont ainsi été réalisées sur un même conjugué. A priori, on n'observe pas de différences énormes entre les deux conjuges (fig. 8a et 8b). Le nombre de HDL par particule d'or étant plus ou moins semblable dans les deux cas, nous avons choisi de ne réaliser qu'une seule dialyse.

Durée de conservation de l'or colloïdal

Nous avons voulu par la suite tester la durée de conservation de l'or colloïdal. Dans la littérature, sa durée est estimée à plusieurs mois à 4°C.

Du conjugué a été réalisé à partir de trois solutions d'or colloïdal d'âge différent : or récent, or de 3 mois et or de 4 mois.

Observations

Nous observons une variation dans la couleur des solutions en fonction de l'âge. La solution d'or de 4 mois est nettement plus claire que les 2 autres. De plus, après la dialyse, le tampon a pris une coloration légèrement rosâtre.

L'observation du conjugué en coloration négative au TEM montre que toutes les particules d'or sont conjuguées mais leur nombre a nettement diminué par rapport aux deux autres préparations.(Fig. 9)

Le conjugué préparé avec de l'or de 3 mois présente quelques amas d'or agrégés.

Le conjugué préparé avec l'or récent a les mêmes caractéristiques que ce qui a été décrit plus haut (cfr méthode n°2).



Fig. 9 Micrographie électronique en coloration négative du conjugué HDL-or préparé à partir d'une solution d'or colloïdal âgée de 4 mois.

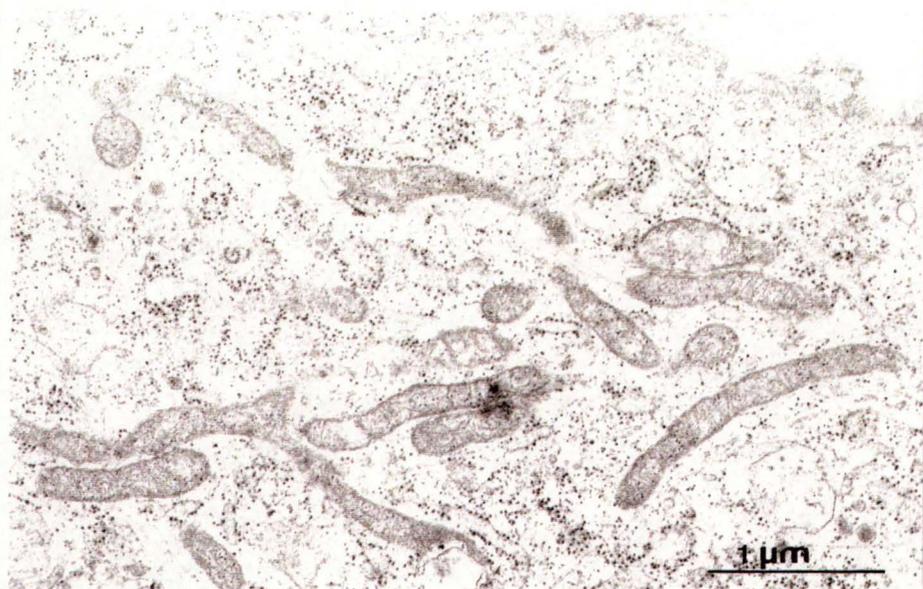


Fig. 10 Micrographie électronique de cellules endothéliales en culture, incubées avec le conjugué HDL-or, pendant 60 minutes à 4°C, dans du milieu additionné de LPDS 10%.

Commentaires

On peut conclure que l'or colloïdal aurait une conservation de 3 mois maximum.

2.3 Etude morphologique de la liaison des HDL aux cellules endothéliales humaines:

2.3.1 Etude de la liaison des HDL aux cellules endothéliales:

Les cellules endothéliales incubées avec le conjugué HDL-or pendant 60 minutes à 4°C, dans du milieu additionné de LPDS (Fig.10), ne présentent que quelques rares particules d'or en surface de leur membrane plasmique; ces particules se trouvent éloignées de la membrane.

2.3.2 Etude de la liaison des HDL aux cellules endothéliales chargées de cholestérol:

Dans l'expérience précédente, la liaison des HDL aux cellules endothéliales était faible voire même nulle. Nous avons alors choisi de surcharger les cellules avec du cholestérol afin de voir si celui-ci pouvait favoriser la liaison des HDL comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Oram, 1986; Tauber et al., 1981).

Dans un premier temps, les cellules ont été incubées durant 24 et 48 heures en présence de milieu additionné de LPDS 10%, de cholestérol (50 µg/ml) et d'albumine "fatty acid free" 0,2%. Différentes dilutions en HDL-or ont été utilisées de façon à étudier l'importance de la concentration sur la liaison.

Resultats:

Après 24 heures d'incubation avec le cholestérol, quelle que soit la concentration en HDL-or choisie, on n'observe qu'exceptionnellement des particules d'or sur la membrane cellulaire. Il en est de même pour les cellules incubées pendant 48 heures avec le cholestérol.



Fig. 11 Micrographie électronique de cellules endothéliales cultivées pendant 24 heures dans du milieu additionné de cholestérol (50 µg/ml), d'albumine 0,2% et de sérum de veau nouveau-né(20%) et incubées avec le conjugué HDL-or, pendant 60 minutes, à 4°C. Les coupes sont réalisées perpendiculairement à la surface de la boîte de culture.

On observe des particules d'or présentes sous la couche de cellules, dans la matrice extracellulaire.

Suite à l'observation des coupes perpendiculaires à la surface de la culture, nous remarquons la présence de particules d'or sous la couche de cellules endothéliales, dans la matrice extracellulaire (fig. 11).

Nous observons également que le contenu cellulaire est très altéré. On observe de nombreuses mitochondries claires, des VMI en quantité anormale; les lipides sont très abondants et le cytoplasme a un aspect hydrique (Fig. 12 a).

Ces phénomènes sont encore amplifiés après 48 heures d'incubation et de plus, on observe un réticulum endoplasmique rugueux anormalement dilaté (Fig. 12 b).

Suite à ces résultats, nous avons remplacé le LPDS dans le milieu par du sérum de veau nouveau-né 20%. Les expériences ont été réalisées dans des conditions similaires.

Les résultats sont identiques à ceux de l'expérience précédente, que ce soit en ce qui concerne l'état des cellules ou en ce qui concerne le nombre de particules d'or (Fig. 13).

Commentaires:

Pour ces expériences, nous avons utilisé du cholestérol non lipoprotéique provenant d'une solution stock (10 mg/ml dans de l'éthanol 97°), bien qu'il existe un désavantage à employer un tel cholestérol car celui-ci peut, dans des conditions prolongées d'incubation, devenir toxique pour les cellules. Dans la littérature, certains chercheurs utilisent ce type de cholestérol sans mentionner des effets cytotoxiques sur les cellules (Tauber, 1981; Nizard-Martin et al., 1989) à des concentrations parfois supérieures aux nôtres.

Nous avons choisi une concentration de 50 µg/ml en cholestérol car cette concentration a été utilisée sur des fibroblastes sans cytotoxicité appréciable même après 48 heures d'incubation (Oram, 1986). De plus, Tauber (1981) qui travaille sur les cellules endothéliales bovines vasculaires, utilise des concentrations de cholestérol allant de 50 à 100 µg/ml et il observe une augmentation de 5 à 10 fois le nombre de sites de liaisons sur les cellules.

La présence d'albumine "fatty acid free" est importante dans de telles expériences. Elle constitue une source de protéine pour les

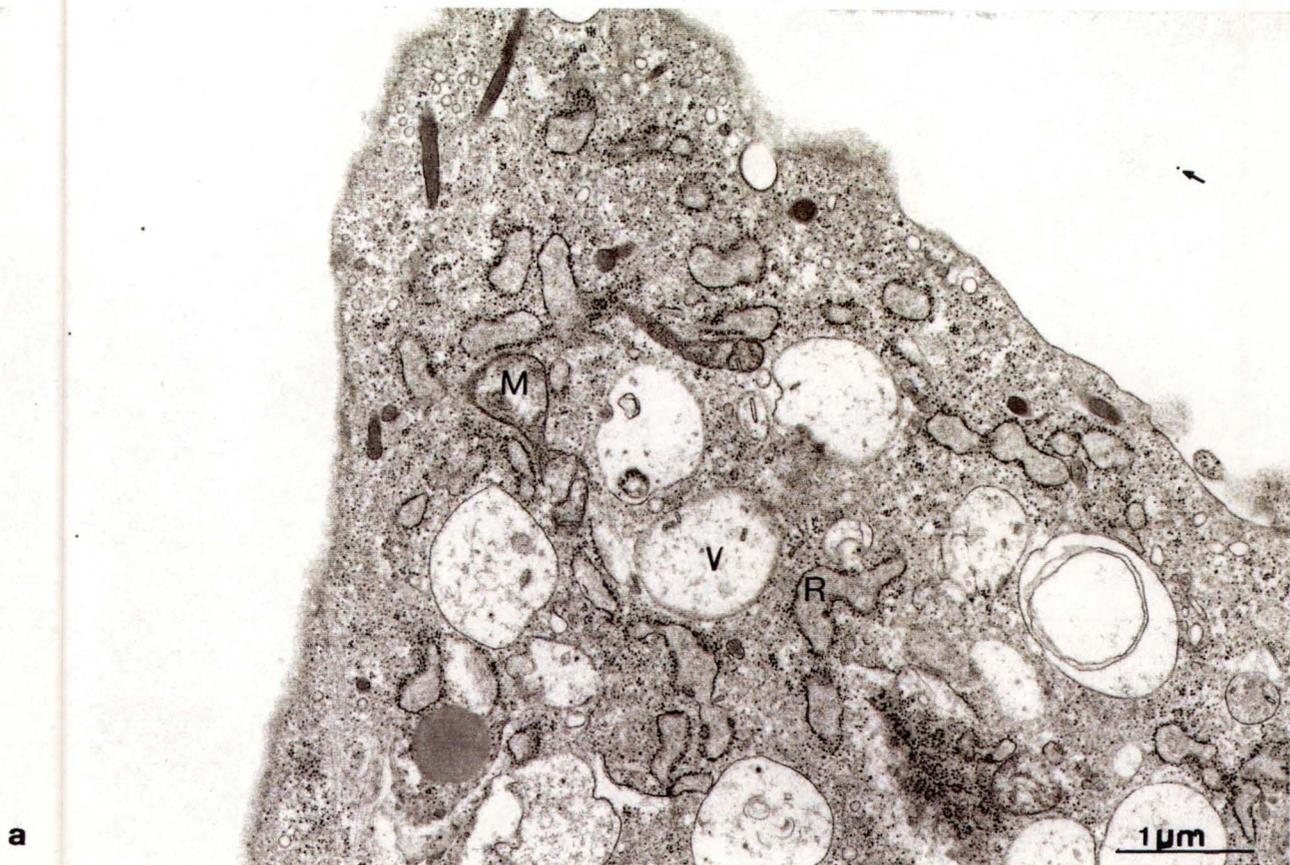


Fig. 12 Micrographies électroniques de cellules endothéliales cultivées pendant 24 et 48 heures dans du milieu additionné de cholestérol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), d'albumine 0,2% et de LPDS 10% et incubées avec le conjugué HDL-or, pendant 60 minutes, à 4°C (respectivement figures a et b).

On peut observer des mitochondries claires (M), du réticulum endoplasmique rugueux dilaté (R), de nombreuses vacuoles (V) ainsi que quelques particules d'or éloignées de la membrane plasmique (MP).

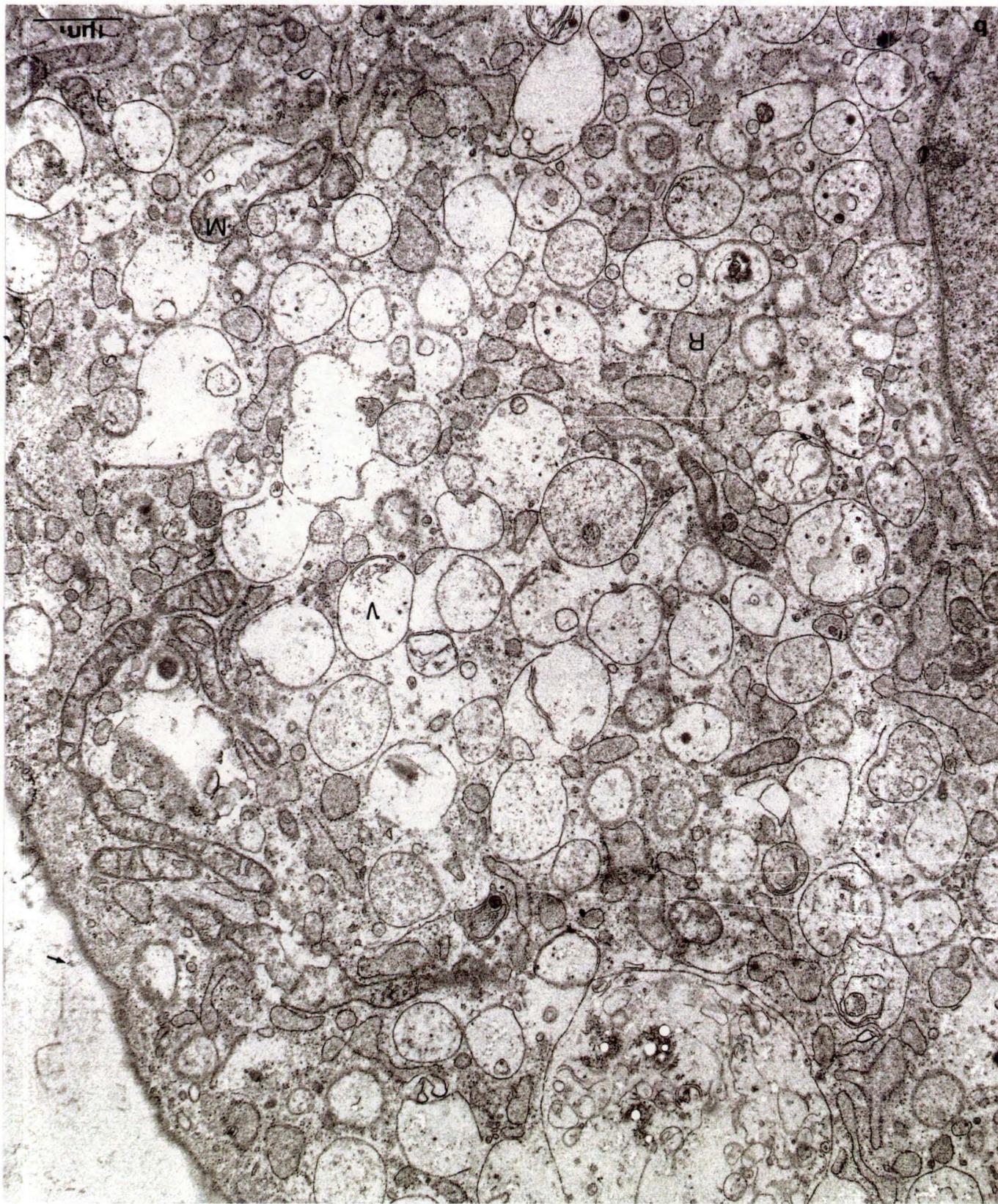




Fig. 13 Micrographie électronique de cellules endothéliales cultivées pendant 24 heures dans du milieu additionné de cholestérol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), d'albumine 0,2% et de sérum de veau nouveau-né 20% et incubées avec le conjugué HDL-or, pendant 60 minutes à 4°C.

On observe des mitochondries claires (M) et du reticulum endoplasmique rugueux dilaté (R).

cellules; elle joue le rôle de transporteur des microcristaux de cholestérol et elle constitue un piège pour les acides gras cellulaires, minimisant ainsi la formation d'esters de cholestérol dans la cellule. Cette dernière propriété a son importance : la liaison des HDL aux cellules étant directement fonction de la quantité de cholestérol non estérifié dans la cellule (Oram, 1986).

Dans la littérature, différents accepteurs pour le cholestérol non esterifié ont été proposés dont les HDL naissantes, une sous fraction des HDL, l'apo A-I, l'albumine ou un complexe composé d'apo A-I, d'apo D et de LCAT (Fielding et Fielding, 1982). D'après les expériences réalisées ci-dessus, on peut supposer que les HDL totales ne constituent pas l'accepteur du cholestérol pour les cellules endothéliales humaines.

La faible liaison que nous observons pourrait être due à la présence de l'apo E dans la fraction HDL, celle-ci n'ayant pas été éliminée par chromatographie. Brown et Goldstein ont démontré que des HDL anormales, contenant l'apo E comme les HDLc peuvent se lier avidement au récepteur des LDL.

Conclusion:

Nous avons décidé de choisir une sous-classe plus particulière des HDL pour étudier la liaison aux cellules endothéliales, mais quelle fraction choisir ?

Des expériences de liaisons réalisées avec des HDL₃ ont montré qu'elles pouvaient se lier à certains types cellulaires dont les cellules endothéliales et qu'elles permettaient un efflux de cholestérol de la cellule vers les HDL₃. Martin-Nizard (1989) montre que les HDL₃ se lient aux cellules endothéliales des capillaires cérébraux chez les bovins par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique.

Tauber (1981) montre lui, que les HDL₃ se lient plus efficacement que les HDL₂ à la surface des cellules endothéliales vasculaires bovines. De plus, pour lui, l'apo E, en quantité très faible dans les HDL₃ ne jouerait qu'un rôle minime dans la liaison des HDL₃ aux cellules.

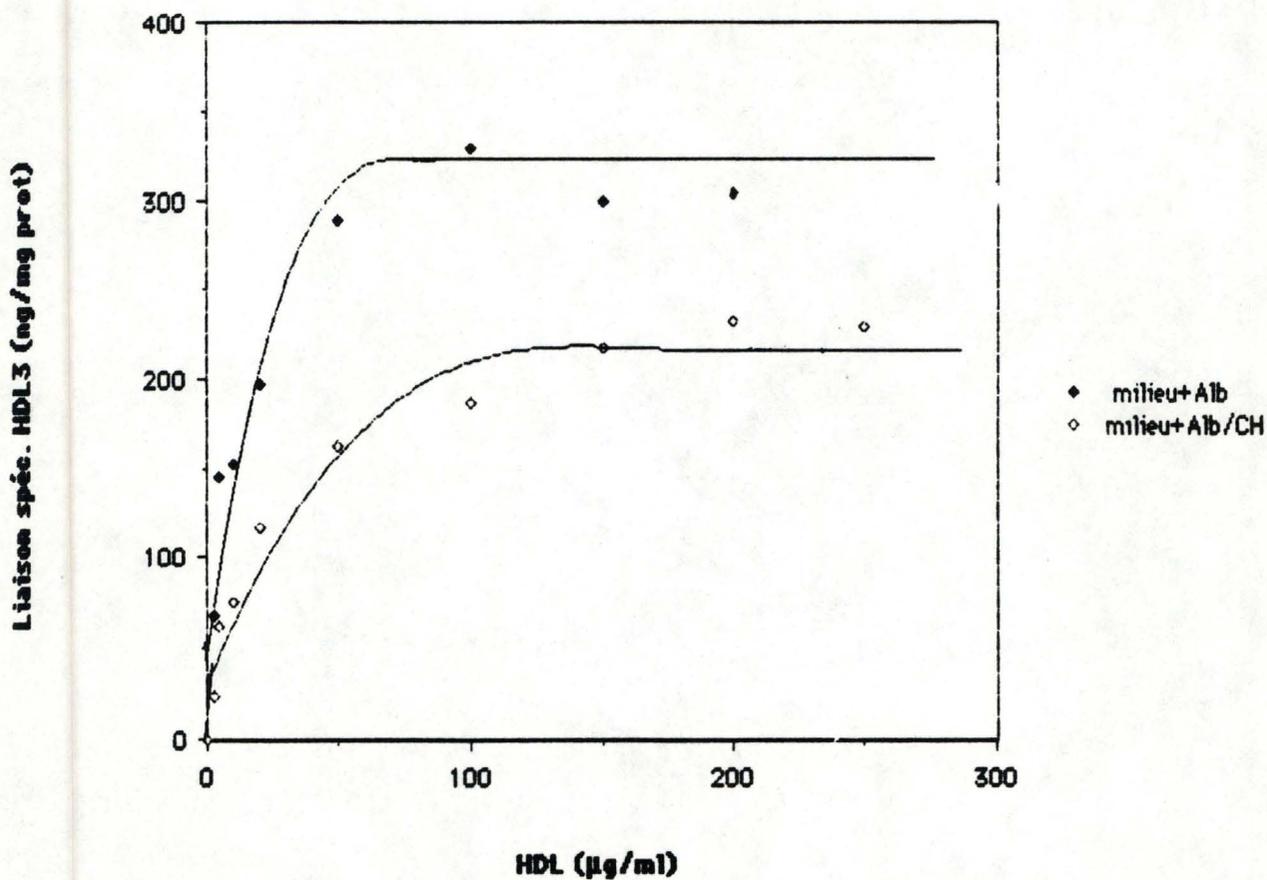


Fig. 14 Liaison spécifique des ^{125}I -HDL3 apo E-free aux cellules endothéliales en culture après une heure d'incubation à 4°C en absence et en présence de $50\ \mu\text{g/ml}$ de cholestérol dans le milieu. Ceci représente une expérience type d'expériences similaires répétées 2 fois.

Les HDL3 sembleraient constituer la sous-classe de HDL la plus adéquate à utiliser pour mettre en évidence une liaison sur des cellules endothéliales humaines. De plus, pour éviter toute interférence avec le récepteur des LDL, nous travaillerons avec des HDL3 apo E-free.

2.4 Etude biochimique de la liaison des HDL3 apo E-free aux cellules endothéliales humaine:

Les HDL3 apo E-free utilisées pour ces expériences ont été isolées par la méthode d'ultracentrifugation séquentielle à partir de serum humain et passées sur colonne de chromatographie d'affinité pour éliminer l'apo E, dans le laboratoire du Docteur Mazière à l'hôpital Saint-Antoine à Paris.

2.4.1 Iodination des HDL3 apo E-free:

La technique utilisée pour l'iodination nous a donné des activités spécifiques variant de 220 à 320 CPM par ng de protéine HDL. Le pourcentage d'iode libre, déterminé par précipitation à l'acide trichloroacétique a toujours été inférieur à 3%.

2.4.2 Résultats des expériences de liaison avec ^{125}I -HDL3 apo E-free:

La figure 14 montre la liaison spécifique des ^{125}I -HDL3 apo E-free par les cellules endothéliales en culture à 4°C en fonction de leur concentration (0 à 200 ou 250 μg de protéines HDL/ml). On observe un plateau à environ 75 μg de protéines HDL/ml pour la courbe représentant la préincubation sans le cholestérol et à environ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour la courbe de préincubation avec du cholestérol et le milieu. Les valeurs pour la liaison spécifique ont été obtenues en soustrayant des valeurs de liaison totale, les valeurs de liaison non spécifique. La liaison non spécifique représente +/- 50 % de la liaison totale qui est de 902 ng de ^{125}I -HDL3 apo E free liées/mg de protéines cellulaires.

La figure 15 illustre les résultats de la liaison des ^{125}I -HDL3 apo E-free en absence de cholestérol dans le milieu. L'analyse du graphique de la liaison totale des ^{125}I -HDL3 apo E-free aux cellules

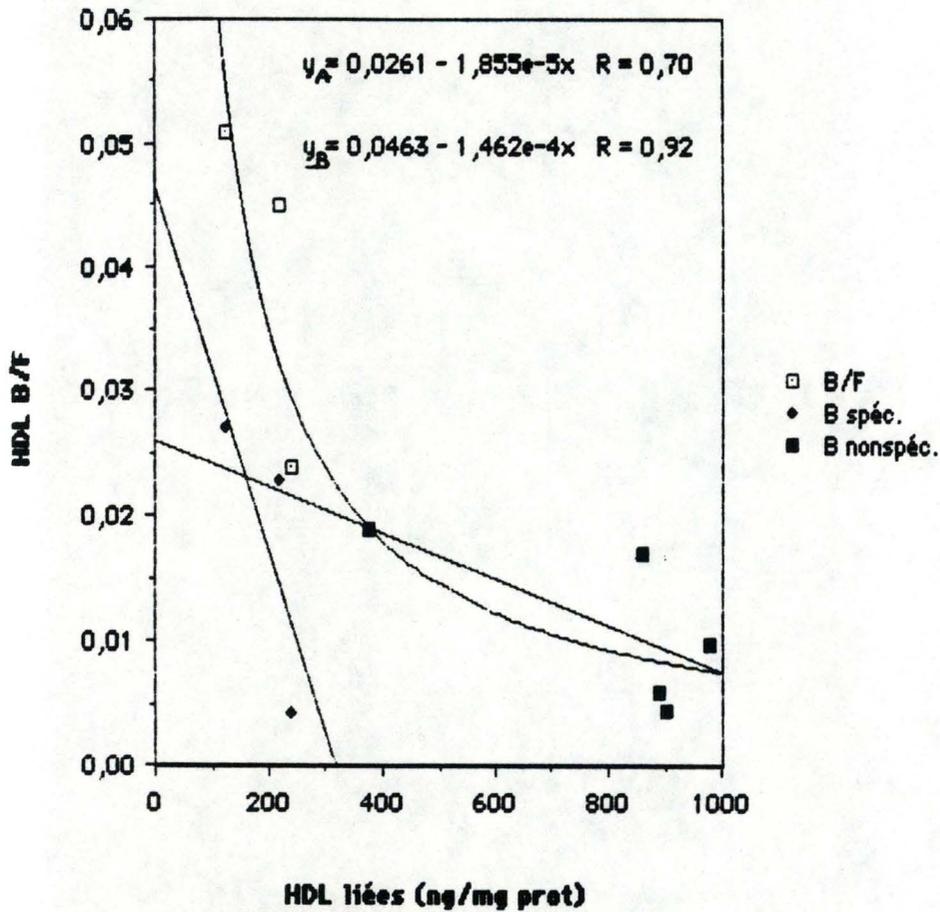


Fig. 15 Graphique selon Scatchard de la liaison des ^{125}I -HDL3 apo E-free aux cellules endotheliales en culture apres une heure d'incubation à 4°C en absence de cholestérol dans le milieu. y_A correspond à l'équation décrivant la liaison spécifique et y_B , la liaison non spécifique des HDL3 apo E-free.

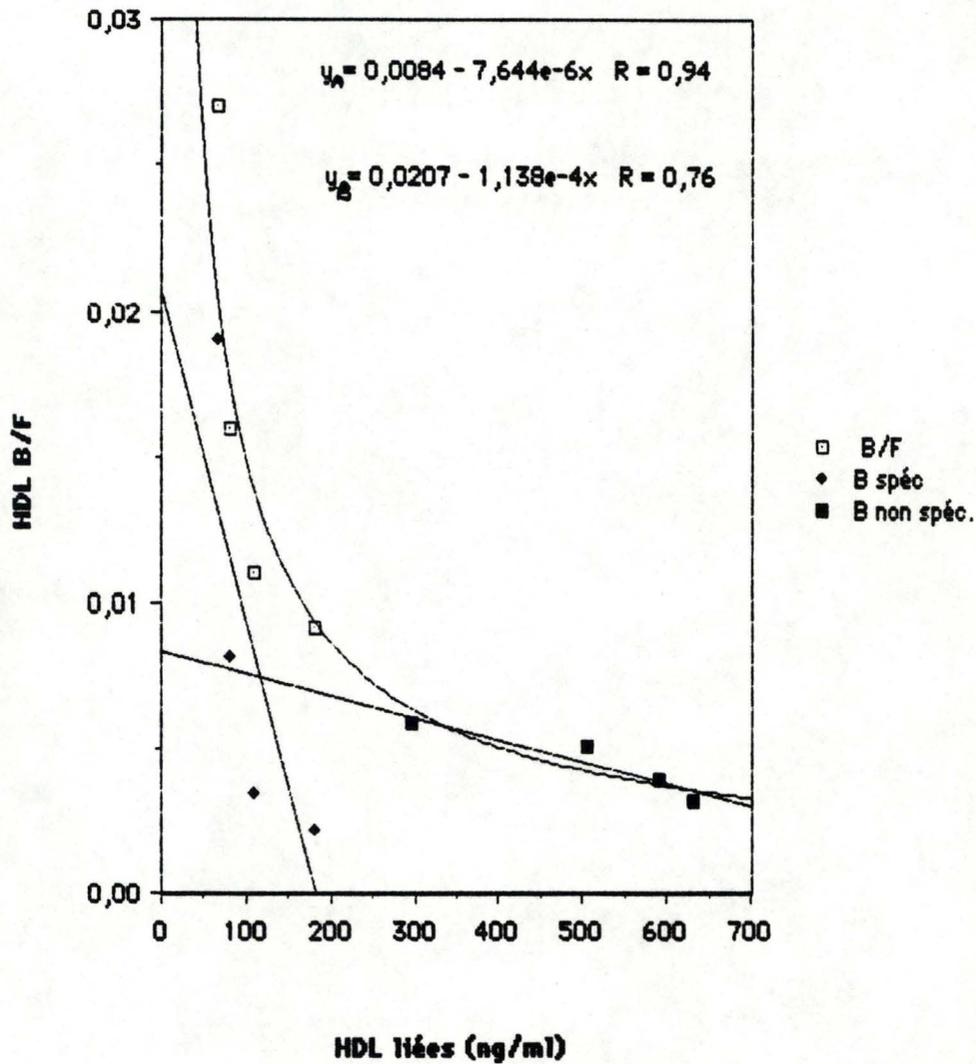


Fig. 16 Graphique selon Scatchard de la liaison des ^{125}I -HDL3 apo E-free aux cellules endothéliales en culture après une heure d'incubation à 4°C en présence de cholestérol dans le milieu ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$). Y_a correspond à l'équation décrivant la liaison spécifique et Y_b , la liaison non spécifique des HDL3.

endothéliales selon Scatchard nous montre une exponentielle indiquant la présence de deux types de sites de fixation spécifiques et non spécifiques. La liaison spécifique a été déterminée en utilisant la méthode des Résiduels (cours de Pharmacologie du Pr. De Schrijver). L'intersection des X représente la capacité de liaison maximale (Bmax) et $-1/\text{pente}$ représente la constante de dissociation (Kd) à l'équilibre. La valeur de Kd est de $4,2 \cdot 10^{-8}$ M (soit 6,8 ug/ml) et la capacité maximale de liaison est de 316,69 ng de HDL3 apo E-free/mg de protéines cellulaires.

La figure 16 illustre les résultats de la même liaison mais en présence de cholestérol dans le milieu pendant 24 heures précédant l'incubation d'une heure à 4°C . Par l'analyse des points selon Scatchard, nous retrouvons une courbe exponentielle de même allure indiquant également la présence de 2 types de sites de fixation. En ce qui concerne la liaison spécifique, les valeurs du Kd sont de $5,4 \cdot 10^{-8}$ M et de Bmax de 181,898 ng de HDL3 apo E-free/mg de protéines cellulaires. Les valeurs des coefficients de corrélation sont honorables sinon satisfaisants.

Afin de tester la spécificité de la liaison des HDL, des expériences de compétition ont été réalisées en présence de concentrations croissantes de HDL froides ou de LDL froides (Figures 17-18-19).

Ces expériences montrent une spécificité du site de liaison pour les HDL3 apo E-free sur les cellules endothéliales humaines. L'addition d'un excès de HDL3 apo E-free non marquées réduit la liaison (Fig. 17) alors qu'un excès de LDL non marquées n'a pas d'effet sur celle-ci (Fig. 18). Ces expériences ont été réalisées 4 fois.

Commentaires:

Ces expériences montrent qu'il existe des sites spécifiques de liaison des HDL3 sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. L'analyse du graphique selon Scatchard et les expériences de compétition nous permettent de le croire.

Les constantes de dissociation calculées en absence et en présence de cholestérol dans le milieu 24 heures avant l'incubation sont du même ordre de grandeur. Seules les Bmax diffèrent. Ce qui signifie que l'affinité du récepteur pour les HDL3 apo E-free diminue

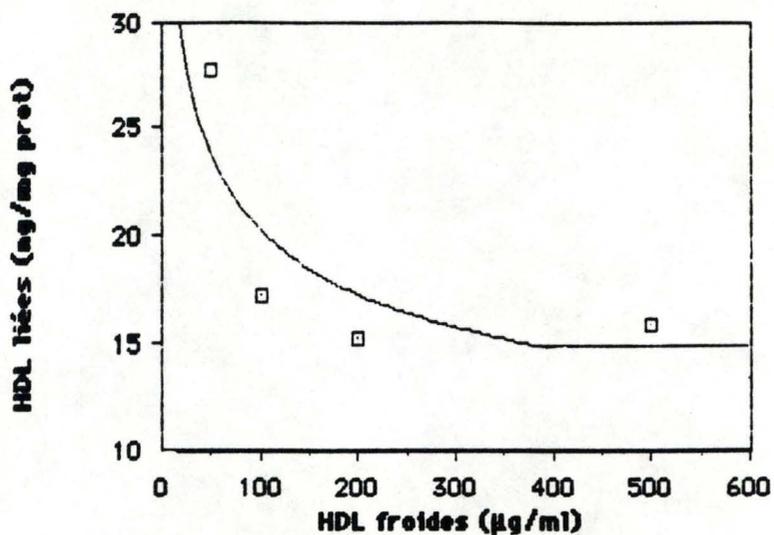


Fig. 17 Expérience de compétition. Liaison des ^{125}I -HDL3 apo E-free ($10\ \mu\text{g/ml}$) aux cellules endothéliales en culture en présence de concentrations croissantes d'HDL froides après une heure d'incubation à 4°C .

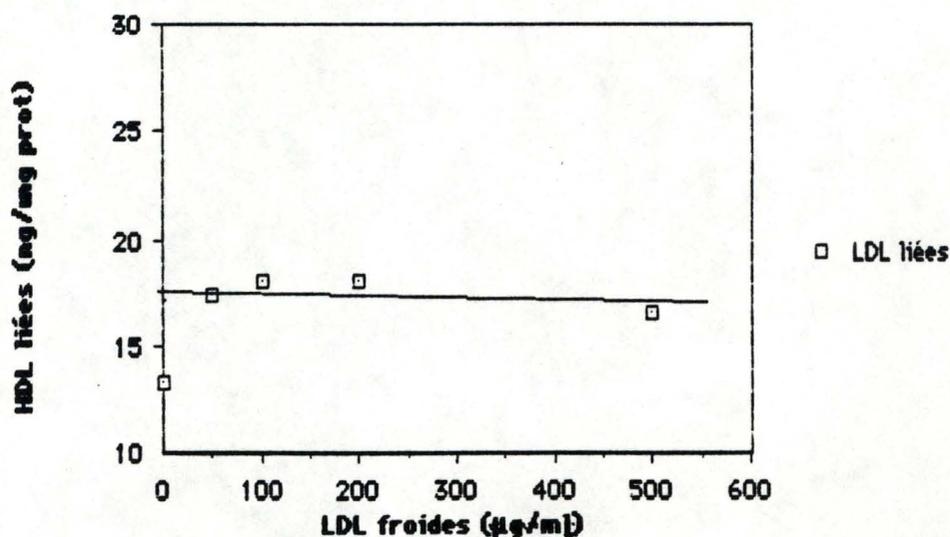


Fig. 18 Expérience de compétition. Liaison des ^{125}I -HDL3 apo E-free ($10\ \mu\text{g/ml}$) en présence de concentrations croissantes de LDL froides après une heure d'incubation à 4°C .

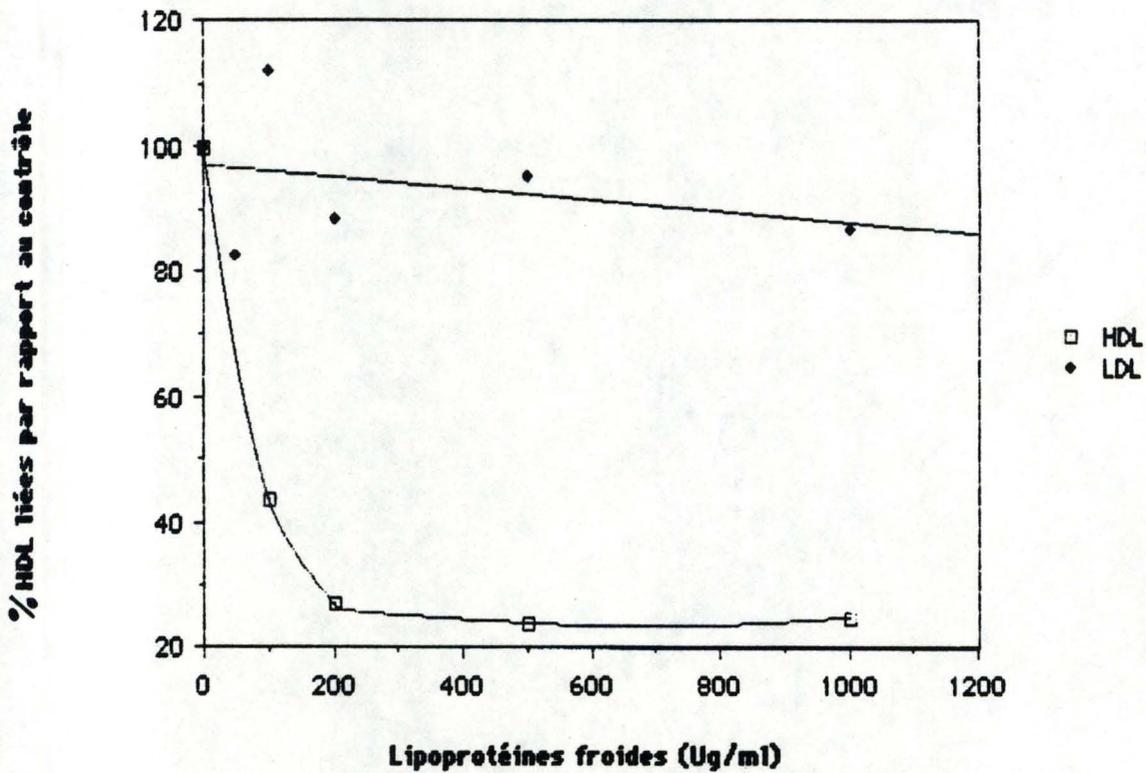


Fig. 19 Expérience de compétition. Liaison des ^{125}I -HDL3 apo E-free aux cellules endothéliales en culture en présence de concentrations croissantes d'HDL froides (\square) et de LDL froides (\blacklozenge) après une heure d'incubation à 4°C .

Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle. Ceci représente une expérience type d'expériences similaires répétées 4 fois.

en presence de cholesterol et que le nombre de sites de liaison diminue également.

Les figures 20 et 21 representent une experience realisee une seule fois et indiquant qu'en fonction du temps, la radioactivite des HDL3 associee aux cellules (Fig. 20) (liaison et internalisation) atteint un equilibre entre 15 et 20 heures, les produits de degradation (Fig. 21) s'accumulant progressivement dans le milieu.

3. Essai de mise au point d'une technique de separation des HDL3

Dans l'etude de la liaison des HDL3 aux cellules endotheliales humaines, il nous faut isoler cette sous fraction de HDL du serum humain.

Que ce soit à des fins analytiques ou préparatives, les lipoprotéines du serum ont été habituellement isolées par ultracentrifugation; cette méthode permettant une séparation des lipoprotéines en fonction de leur densité hydratée.

Pour isoler les HDL3, la technique la plus souvent utilisée dans la litterature est la methode désormais classique de flottaison séquentielle (Havel et al., 1955) où la centrifugation se réalise à des valeurs de densité de plus en plus élevées de façon à pouvoir sortir, au sommet du tube, les lipoprotéines souhaitées. Cette technique offre probablement un compromis suffisant entre le rendement et la résolution mais elle demande plusieurs jours de manipulation et d'occupation des centrifugeuses.

Dès lors, nous avons essayé de mettre au point une technique nous permettant d'isoler des HDL3 en un temps relativement court et avec un rendement suffisant.

Deux techniques ont été testées, utilisant chacune le rotor VTi 50. L'utilisation du rotor vertical permet de diminuer le temps de rotation par rapport à des techniques d'ultracentrifugation plus conventionnelles, et cela sans perte de résolution (Chung et al., 1986) pour autant que l'accélération et la décélération se déroule en douceur, ce que nous recherchons précisément.

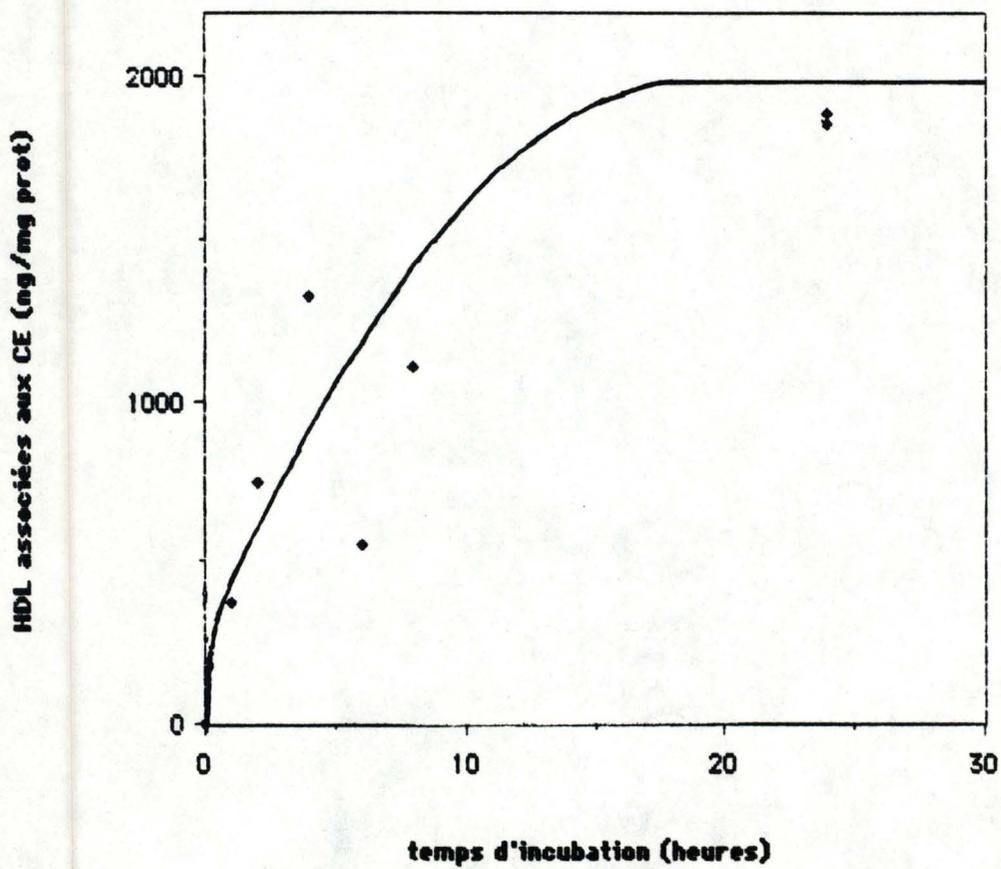


Fig. 20 Liaison et internalisation des ^{125}I -HDL3 apo E-free en fonction du temps d'incubation, à 37°C.

Figure

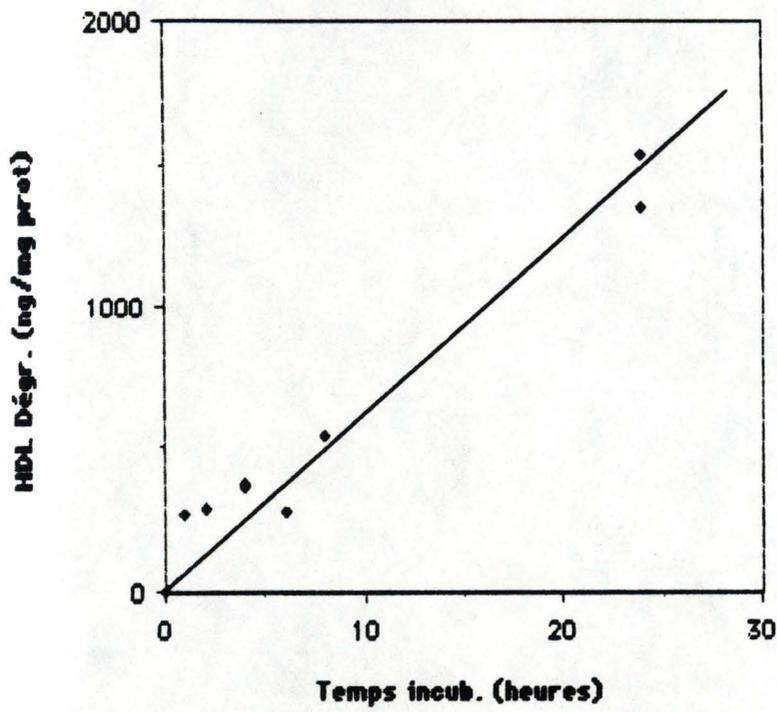


Fig. 21 Dégradation des ^{125}I -HDL3 apo E-free en fonction du temps d'incubation, a 37°C .

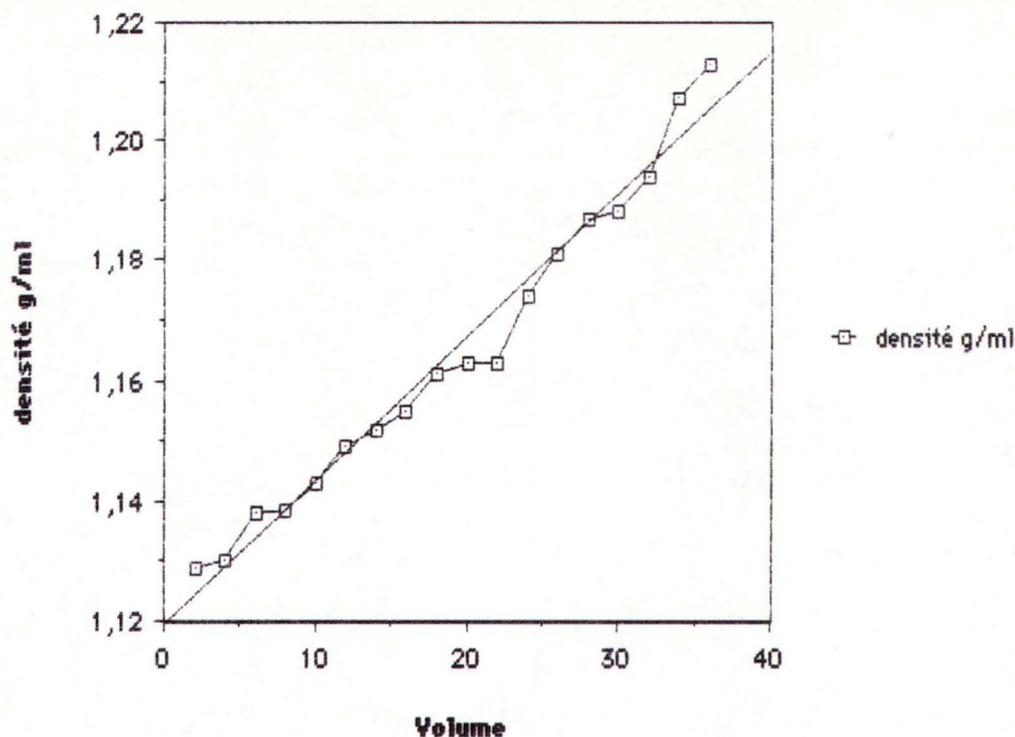


Fig. 22a Distribution de la densité des fractions de 2 ml obtenues à partir d'un gradient linéaire de KBr (densité comprise entre 1,11 et 1,21 g/ml) et de la solution de HDL après ultracentrifugation dans le rotor vertical Vti 50 à 50 000 tours/minute pendant 17 heures.

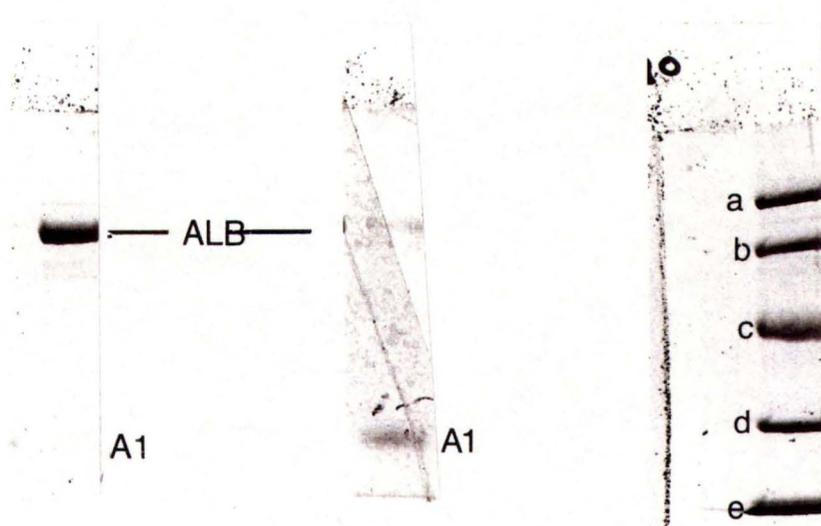


Fig. 22b SDS-PAGE sur les 2 fractions recueillies respectivement entre les densités de 1,11 à 1,13 g/ml et 1,14 à 1,21 g/ml dans le gradient linéaire de KBr après ultracentrifugation dans le rotor vertical Vti 50 à 50 000 tours/minute pendant 17 heures.; gels 12% en polyacrilamide. Les apolipoprotéines sont identifiées par la lettre correspondant à leur nom et l'albumine est désignée par ALB. La migration de quelques protéines de poids moléculaire connu est réalisée simultanément : a. phosphorylase b (94 000); b. albumine (67 000); c. ovalbumine (43 000); d. anhydrase carbonique (30 000); e. inhibiteur de trypsine (20 000); f. alpha-lactalbumine (14 400).

3.1 Technique n°1:

Par leur technique, Poumay et Ronveaux-Dupal (1985) étaient parvenus à séparer les trois fractions caractéristiques des lipoprotéines à savoir, VLDL, LDL et HDL. Nous avons tenté de séparer dans la fraction HDL qu'ils obtenaient, les sous-classes HDL2 et HDL3, en réalisant un gradient linéaire de densité (fig. 22a) constitué à partir de deux solutions de KBr, une à la densité de 1,11 g/ml et l'autre à la densité de 1,21 g/ml.

Après centrifugation, on observe une bande jaune au sommet du tube ainsi que dans le fond du tube. Après avoir coupé le gradient en fractions d'environ 2 ml, nous avons rassemblés celles dont la densité est comprise entre 1,14 et 1,21 g/ml, densités correspondantes aux HDL3. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide révèle la présence d'une faible quantité d'apo A1, apolipoprotéine caractéristique des HDL, mais également d'une contamination importante par de l'albumine. (Fig 22b).

Les fractions de densité inférieure ont également été analysées par électrophorèse et montrent la présence d'apo A1 et d'une faible contamination par l'albumine.

Selon nos résultats, nous n'obtenons donc pas une fraction de HDL3 purifiée. Ceci montre la difficulté de séparer les HDL des autres lipoprotéines du sérum et de plus la difficulté de les séparer en leurs sous-classes. Un gradient permettant une migration plus élevée des LDL dans le tube est nécessaire pour isoler les HDL et éventuellement les séparer en ses 2 sous-classes principales (Mills et al., 1984; Chung et al., 1986).

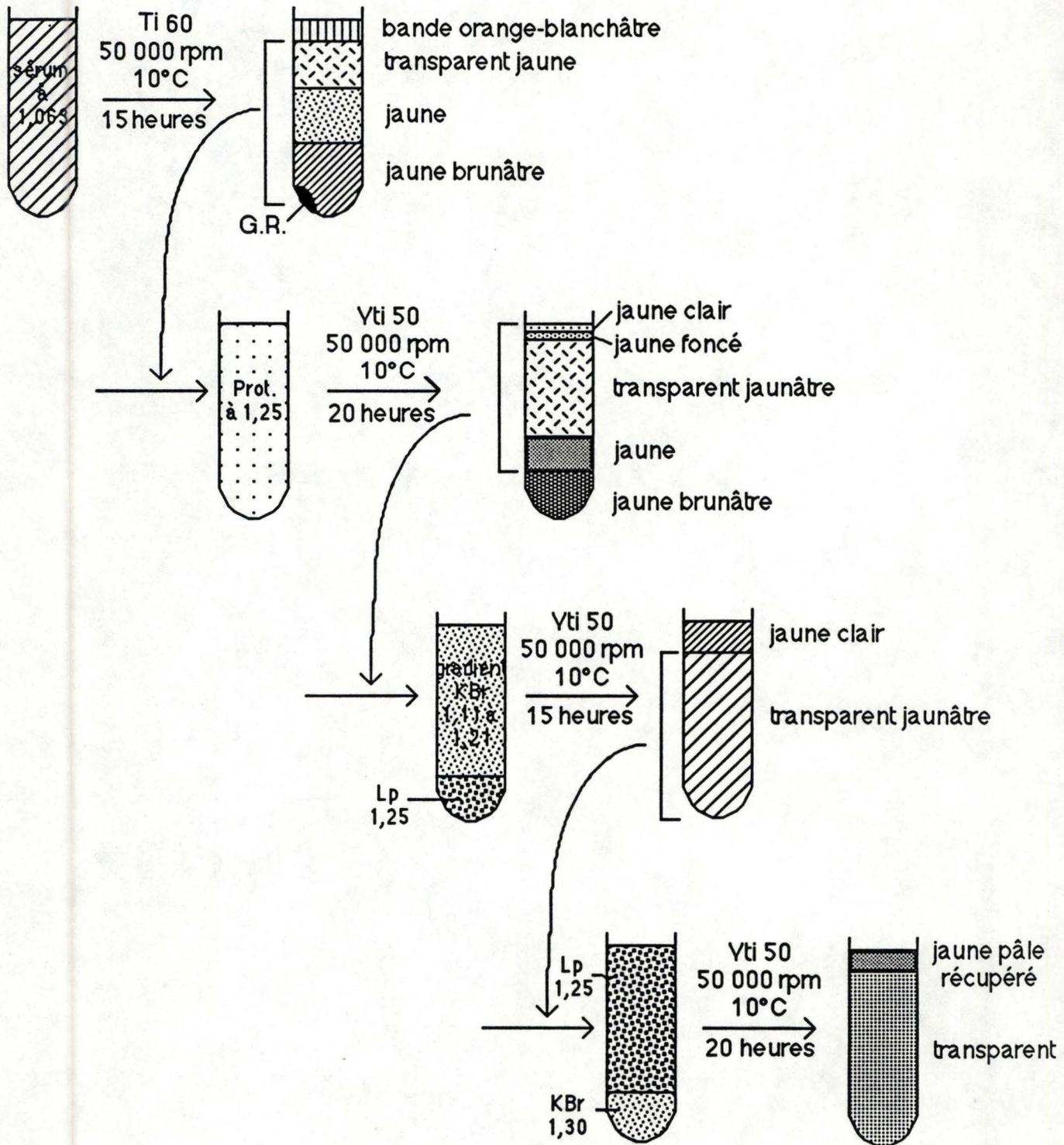
La mise au point d'un tel gradient demandant beaucoup de temps, nous avons choisi de tester la technique proposée par Coetzee et al. (1986).

3.2 Technique n°2:

Dans cette technique (Coetzee et al, 1986), la première centrifugation est réalisée dans un rotor Ti 60 et est basée sur le principe de l'ultracentrifugation séquentielle classique. Le plasma est ajusté à la densité de la limite inférieure de la fraction que l'on se

Méthode 2: Résultats

Schéma des manipulations



propose d'isoler et est centrifugé à environ 100 000 g pendant plusieurs heures. Les lipoprotéines de densité plus faible que celle à laquelle le plasma a été ajusté, flottent au sommet du tube tandis que les autres substances sédimentent dans le fond du tube. Les lipoprotéines flottantes peuvent alors être retirées. Les infranatants sont récupérés et ajustés à la densité de la limite supérieure des lipoprotéines que l'on veut isoler, et centrifugés de façon à ce qu'on les retrouve au sommet du tube (Mills et al., 1984).

L'utilisation du rotor Ti 60 permet de travailler avec de grands volumes de sérum, de centrifuger à des vitesses élevées et donc de diminuer la durée de la centrifugation (Mills et al., 1984).

Les manipulations réalisées pour cette technique sont schématisées sur le graphe ci-joint.

3.2.1 Centrifugation n°1:

Pour notre première centrifugation, nous ajustons le sérum à la densité de 1,063 g/ml avec du KBr solide. Cette densité correspond, en fait, à la limite inférieure des lipoprotéines de haute densité. Suivant le principe de la centrifugation séquentielle, nous devons, après centrifugation, retrouver au sommet du tube les lipoprotéines de densité inférieure à savoir chylomicrons, VLDL et LDL.

Après cette première centrifugation, nous observons au sommet du tube, une bande de couleur orange-blanchâtre, séparée des autres constituants par un espace transparent. L'analyse du contenu en apolipoprotéines de cette bande, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Fig. 23a) révèle la présence de l'apo AI, de l'apo E, de l'apo B et d'une contamination par l'albumine. Cette fraction devrait donc contenir des chylomicrons (apoB, E et AI), des VLDL (apo E, B) et des LDL (apoB).

La distribution du cholestérol et des protéines (Fig. 23b) sur l'ensemble des fractions du tube, nous indique une séparation entre des lipoprotéines riches en cholestérol et des lipoprotéines contenant moins de cholestérol. On remarque également que dans le fond du tube, la séparation entre lipoprotéines et protéines sériques n'est pas totale; du cholestérol étant encore présent à ce niveau alors que la concentration en protéines devient très élevée.

La bande supérieure est donc éliminée et les infranatants rassemblés et mis à la densité de 1,25 et centrifugés dans un rotor Vti

Fig. 23a SDS-PAGE de la première bande obtenue après ultracentrifugation dans le rotor Ti 60 à 50 000 tours/minute pendant 15 heures; gels 15% en polyacrilamide. Les étalons et la numérotation sont identiques à ceux de la fig. 18.

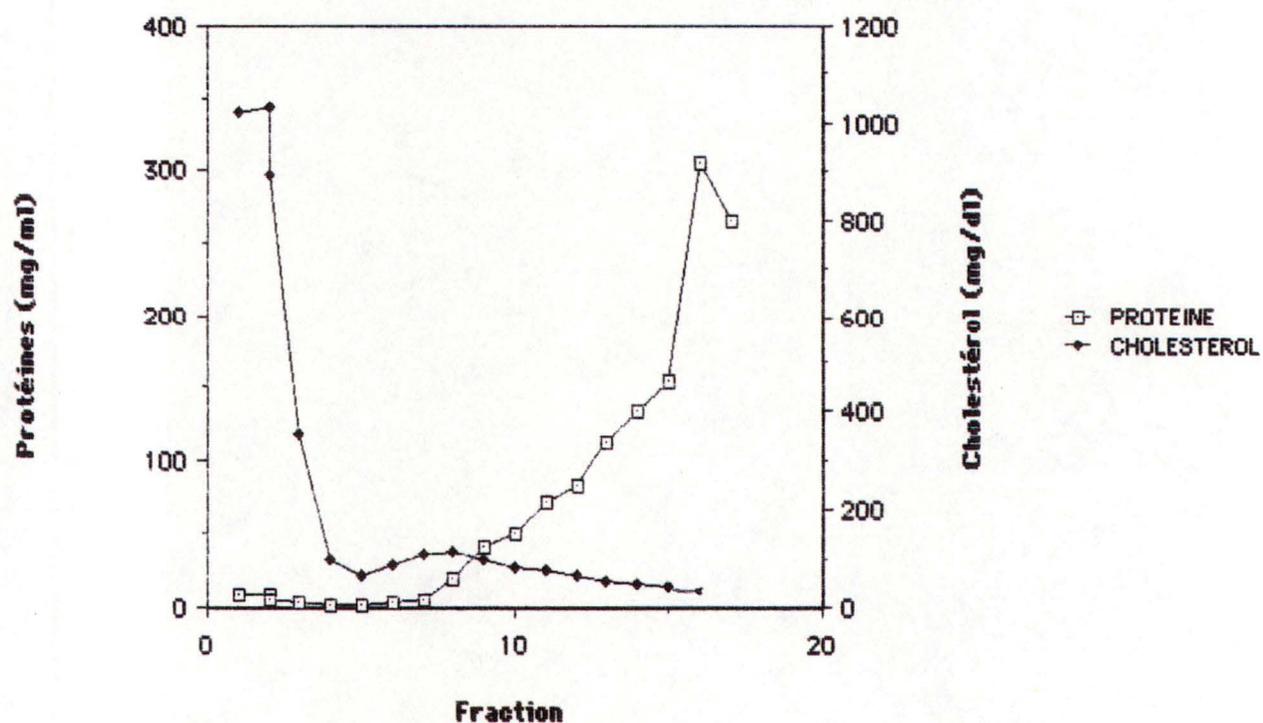
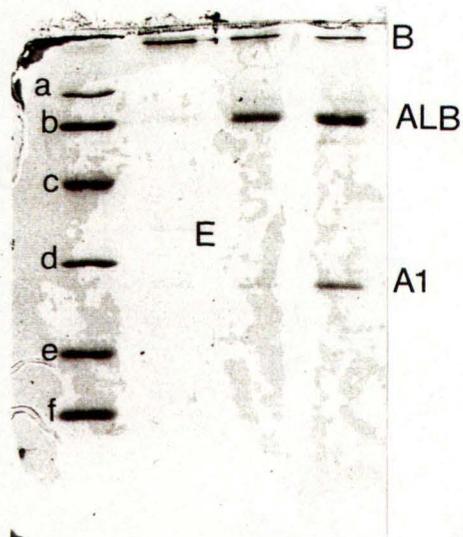


Fig. 23b Distribution du cholestérol et des protéines sur les fractions obtenues après ultracentrifugation dans le rotor Ti 60 à 50 000 tours/minute pendant 20 heures.

50. Nous ne récupérons pas le culot présent au fond du tube car celui-ci est très visqueux et contient des globules rouges.

3.2.2 Centrifugation n°2:

Nous observons, au sommet du tube, 2 bandes très minces, la première de couleur jaune clair et la seconde jaune foncé. Ces bandes sont séparées du reste du tube, par une bande transparente, légèrement jaunâtre et d'épaisseur plus importante. L'analyse du contenu en apolipoprotéines de ces 3 bandes, révèle la présence d'apo A I et A IV, caractéristiques des HDL (Fig.24a). On observe une contamination par l'albumine qui devient plus importante dans les fractions proches du fond du tube.

La distribution du cholestérol et des protéines sur l'ensemble des fractions du tube (Fig.24b) indique la présence, dans les 3 premières bandes, de lipoprotéines alors que le fond du tube ne contient que des protéines seriques dépourvues de cholestérol. Ces protéines contaminantes ne représentent probablement que les protéines plasmatiques habituellement adsorbées sur les lipoprotéines, ainsi que quelques petites apolipoprotéines détachées des lipoprotéines suite aux centrifugations (Mills et al., 1984).

3.2.3 Centrifugation n°3:

Après centrifugation des lipoprotéines sur un gradient linéaire de KBr, nous observons au sommet du tube, une bande jaune, le reste du contenu du tube présentant un aspect transparent légèrement jaunâtre.

Les distributions du cholestérol et des protéines en fonction de la densité et en fonction des fractions (Fig.25a-b) tout au long de ce gradient ne nous permet pas distinguer deux répartitions différentes des lipoprotéines qui devraient correspondre respectivement aux HDL2 et HDL3; les HDL2 contenant plus de cholestérol et moins de protéines que les HDL3.

Une électrophorèse sur SDS-PAGE a aussi été réalisée sur les différentes fractions recueillies; elle ne révèle que la présence d'Apo A1 et d'albumine. Cette apolipoprotéine étant présente dans les 2 types de HDL ne nous permet pas non plus de faire une distinction nette entre les 2 classes (Fig.25c).

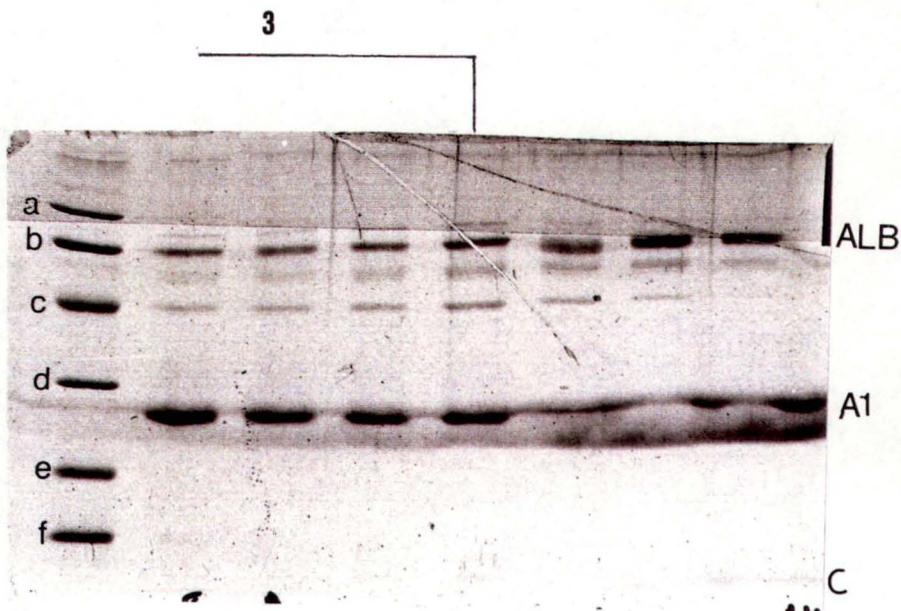
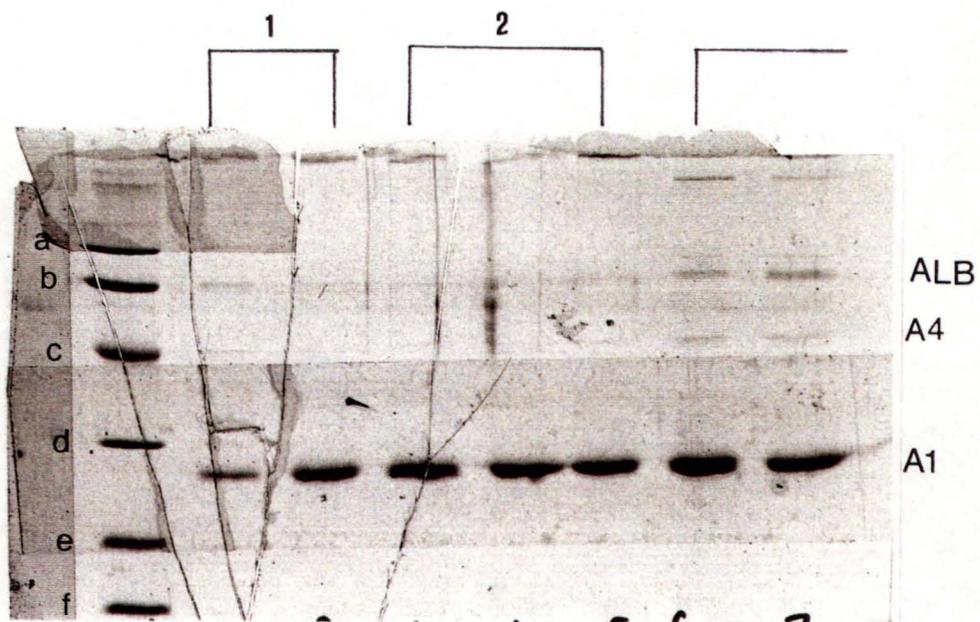


Fig. 24a SDS-PAGE des 3 bandes recueillies après la deuxième ultracentrifugation dans le rotor VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 15 heures; gels 15% en polyacrilamide. Les étalons et la numérotation sont identiques à ceux de la fig. 18.

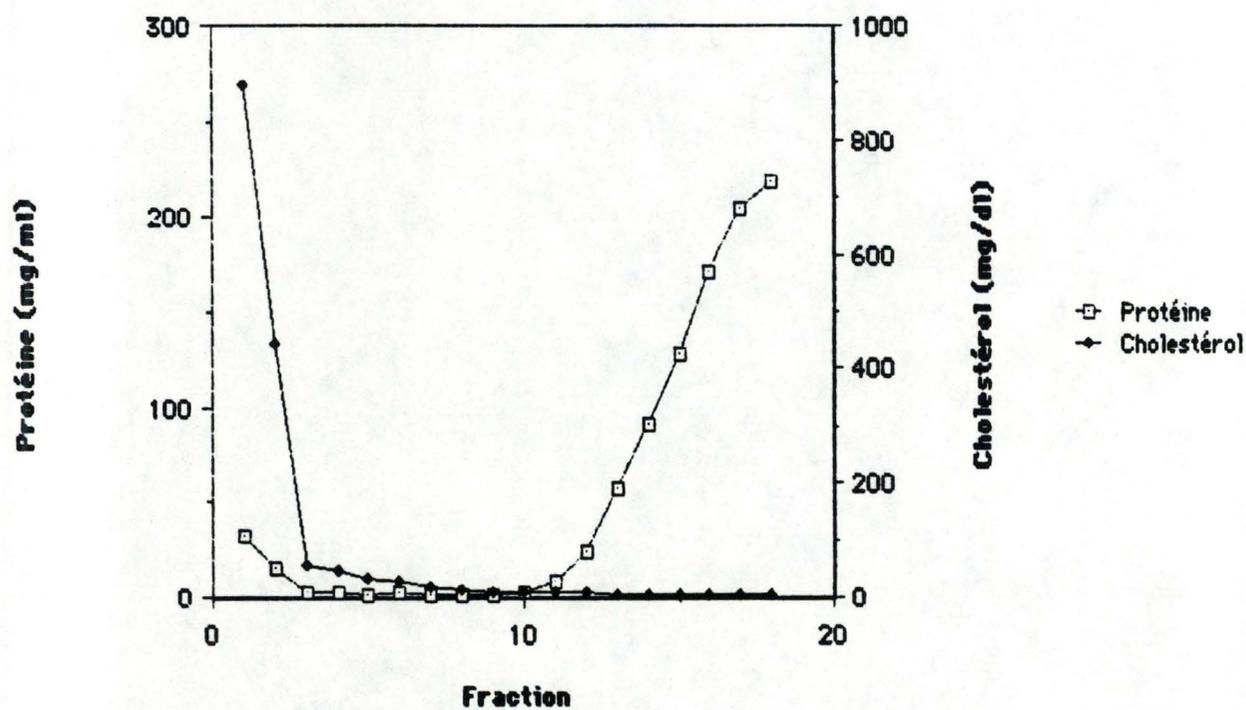
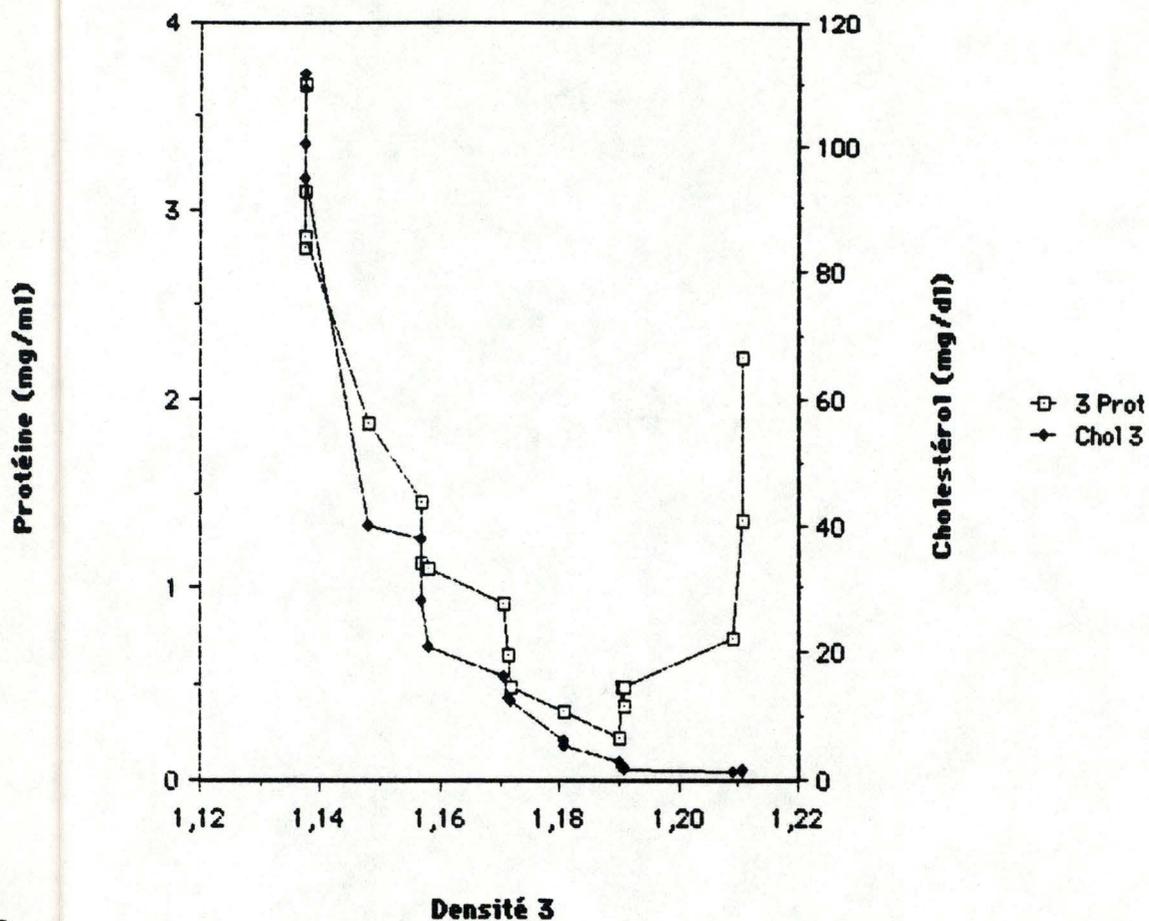


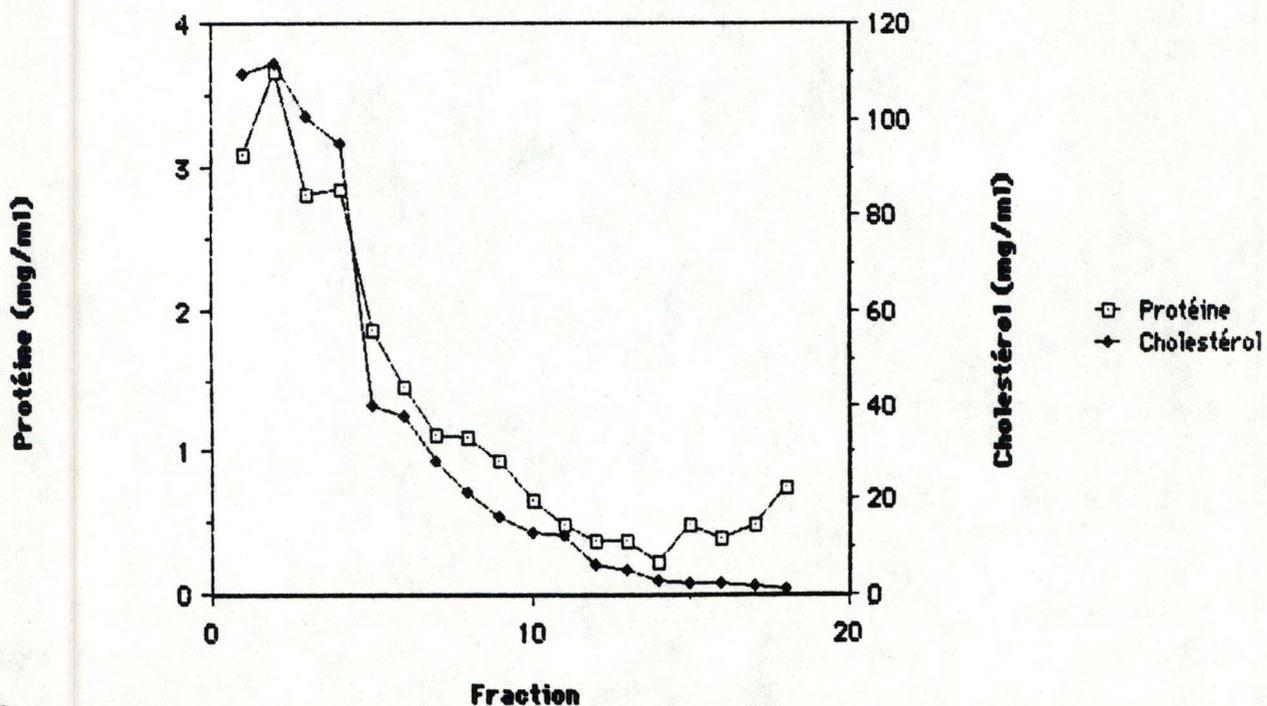
Fig. 24b Distribution du cholestérol et des protéines dans les fractions obtenues après la seconde ultracentrifugation dans le rotor VTi 50 a 50 000 tours/minute pendant 20 heures.



a

Fig. 25 Distribution du cholestérol et des protéines dans les fractions obtenues à partir du gradient linéaire de KBr après la troisième ultracentrifugation dans le rotor VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 15 heures.

- a. Distribution en fonction de la densité;
- b. Distribution en fonction des fractions.



b

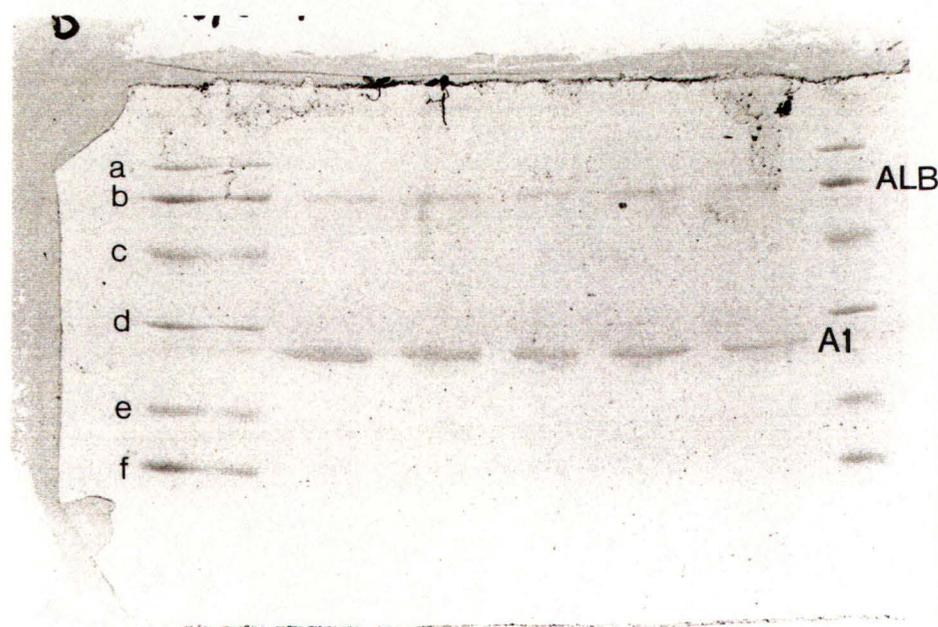
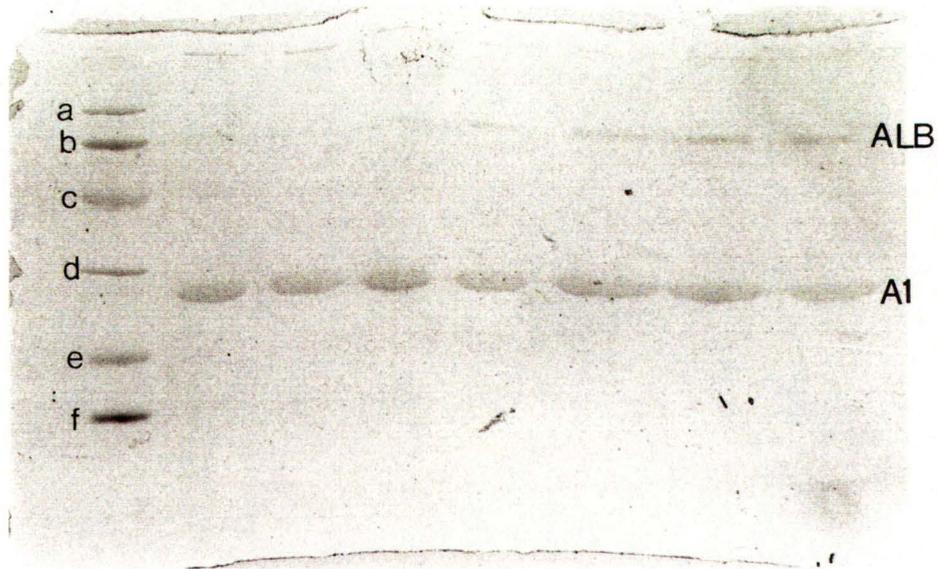


Fig. 25c SDS-PAGE sur les fractions obtenues a partir du gradient linéaire de KBr après la troisième ultracentrifugation dans le rotor VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 15 heures. Les étalons et la numérotation sont identiques à ceux de la fig. 18.

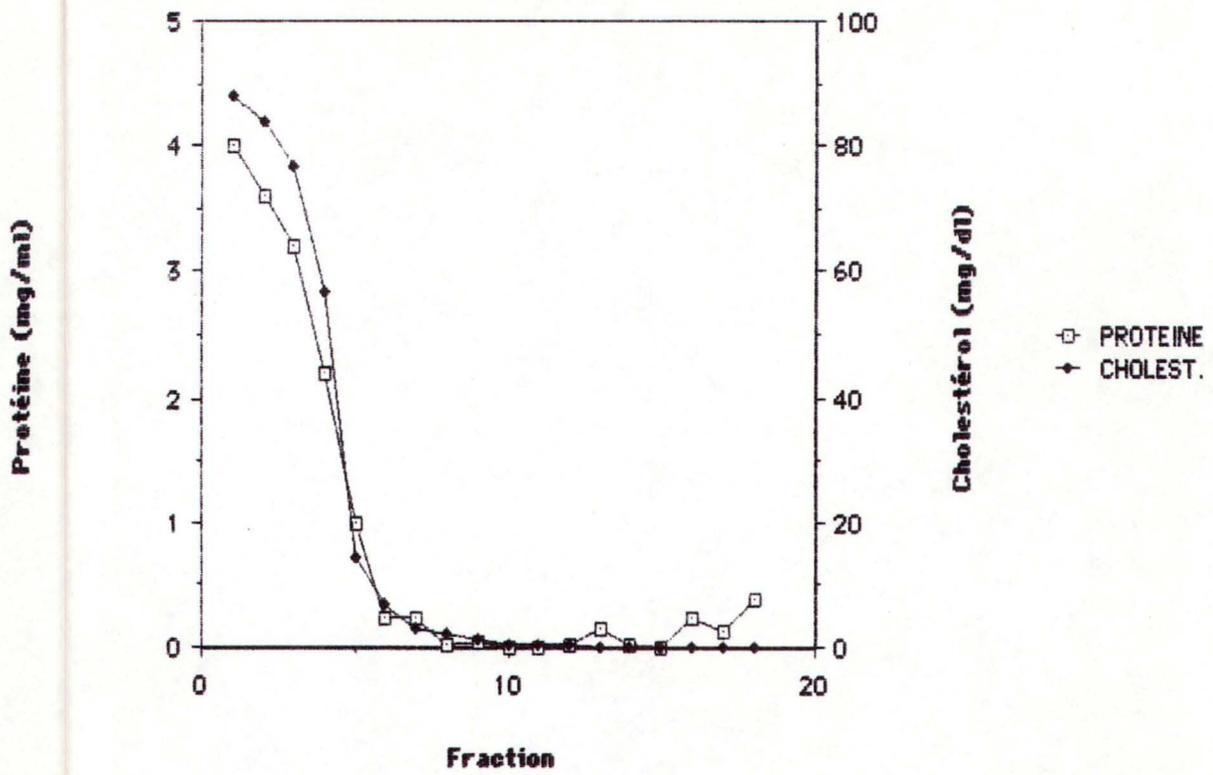


Fig. 26a Distribution du cholestérol et des protéines dans les fractions obtenues après la quatrième centrifugation dans le rotor VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 20 heures.

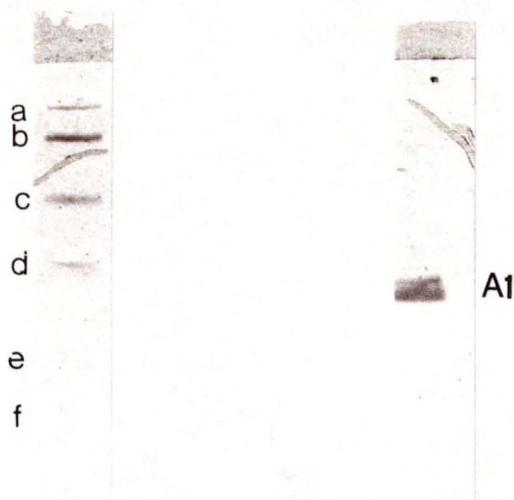


Fig. 26b SDS-PAGE de la fraction récupérée après la quatrième ultracentrifugation dans le rotor VTi 50 à 50 000 tours/minute pendant 20 heures. Les étalons et la numérotation sont identiques à ceux de la fig 18.

Nous avons dès lors rassemblé les fractions dont la densité était comprise entre 1,14 et 1,19 g/ml, densité caractéristique des HDL3. Celles-ci ont été mises à la densité de 1,25 g/ml et centrifugées dans un rotor Vti 50.

3.2.4 Centrifugation n° 4:

Cette centrifugation sert de lavage pour les lipoprotéines mais elle a surtout pour effet de les concentrer. En effet, on observe au sommet du tube, une bande jaune nettement distincte; le reste du tube étant transparent. Celle-ci est récupérée et a un volume d'environ 5 ml.

L'analyse du contenu en apolipoprotéines de cette bande, révèle la présence d'apo AI et pas de contamination par l'albumine. (Fig.26b). La distribution du cholestérol et des protéines montre que les lipoprotéines sont présentes seulement dans les premières fractions (Fig.26 a).

Ces résultats ne nous permettent, en aucun cas, d'affirmer avoir isolé des HDL3. Faute de temps, nous n'avons pu nous baser que sur la densité, la concentration en cholestérol et protéines et l'analyse du contenu en apolipoprotéines des différentes fractions pour tenter de situer les HDL3. Au vu de nos résultats, ces méthodes se révèlent tout à fait insuffisantes pour distinguer HDL2 et HDL3 d'une part mais également pour suivre, avec précision, la répartition des différentes lipoprotéines et protéines sériques au cours des différentes centrifugations.

Une analyse des fractions avec des lipoprotéines authentiques nous permettrait de suivre la répartition de ces lipoprotéines au cours des centrifugations. L'introduction dans le sérum utilisé, de lipoprotéines isolées par ultracentrifugation séquentielle et marquées avec de l'iode 125 (Chung et al., 1980) nous permettrait de caractériser leur distribution réelle dans les différentes fractions, après chaque centrifugation.

Une observation en coloration négative des différentes bandes permettrait d'évaluer la taille des particules observées et permettrait également de mettre en évidence toute contamination d'une classe de lipoprotéine par une autre (Chapman et al., 1981).

Pour distinguer HDL2 et HDL3, un dosage du cholestérol libre, des esters de cholestérol, des phospholipides et des triglycérides serait très intéressant car elles se caractérisent par leur contenu respectif en ces différents constituants.

Discussion et perspectives:

4.1 Liaison des HDL aux membranes cellulaires:

Ainsi donc la liaison des HDL3 à 4°C par nos cellules endothéliales humaines semble correspondre à un processus saturable par rapport à la concentration en HDL et médié par un site de liaison (récepteur?) différent du récepteur des apolipoprotéines B, E. Sommes-nous en accord avec les données de la littérature?

4.1.1 Liaison des HDL aux membranes cellulaires en général:

Si l'on parcourt la littérature, on retrouve le plus souvent la liaison des HDL3 sans apo E sous la forme d'une courbe de saturation typique.

C'est Kovanen et al.(1979) qui pour la première fois ont étudié la liaison des HDL aux membranes plasmiques hépatiques de rat. Tout d'abord, notons qu'on peut observer des variations quantitatives de cette liaison des HDL3 selon les espèces. Ainsi, Fernandez et al.(1990) ont obtenu sur des membranes hépatiques de cobaye incubées à 4°C et à 37°C une courbe de saturation. La liaison non spécifique est linéaire de 10 à 70 µg/ml et la liaison spécifique montre que la saturation est atteinte à une concentration de 30 µg d' HDL3/ml. En comparant les Kd des préparations d' HDL provenant des cobayes et de HDL humaines, ils ont observé, à 4°C, un Kd supérieur pour les HDL de cobaye. La température peut aussi avoir une influence significative sur les constantes d'équilibre des HDL et modifier à la fois le Bmax et le Kd des HDL. Ainsi Hoeg et al.(1985) rapportent une liaison des HDL deux fois plus importante sur des membranes hépatiques humaines à 37°C comparé à la situation à 0°C.

Chacko (1982) montre que les HDL3 se lient aux membranes purifiées de foie de rat avec un Kd de 10,5 µg de protéines HDL/ml et avec un Bmax de 3,45 µg de protéines HDL/mg de protéines membranaires. De plus, ils observent que les sites de fixation sont principalement localisés sur la fraction de membranes plasmiques.

L'activité de liaison des HDL n'est pas sensible à la pronase (Wu et al., 1979) ni à la phospholipase A2 (Chacko, 1982); cependant le

pretraitement des membranes à la phospholipase A2 suivi de la digestion à la pronase entraîne la perte de la liaison.

Pour Schouten et al. (1988), sur cellules isolées du foie de rat, la liaison des HDL3 sur les trois types cellulaires hépatiques (cellules parenchymateuses, cellules de Kupffer et cellules endothéliales) est un processus saturable mettant en évidence un site de liaison de haute affinité avec un Kd de 10-20 μg d'HDL/ml et un Bmax de 25-50 ng d'HDL par mg de protéine cellulaire.

Bisbroek et al. (1983) ont montré que les fibroblastes humains et que les cellules musculaires artérielles humaines possèdent des sites de liaison de haute affinité distincts du récepteur des apolipoprotéines B, E (apo B, E). Dans les 2 cas, la saturation fut obtenue à une concentration en protéines HDL de 20 μg /ml.

Schmitz et al. (1987) ont étudié la liaison des HDL aux macrophages péritonéaux lors d'expériences biochimiques et morphologiques, tandis que Jurgens et al. (1989) ont signalé la stimulation des lymphocytes sous l'influence des HDL qui se lient à ces cellules.

Bien que les sites de liaison pour les HDL aient été décrits dans de nombreux types cellulaires, leur nature et leur importance physiologique restent inconnues.

En 1987, Graham et Oram, en utilisant le "ligand blotting", ont mis en évidence une protéine de 110 Kd sur la membrane de différentes cellules (fibroblastes humains et de souris, cellules musculaires lisses de l'artère humaine, cellules endothéliales de l'aorte bovine). Cette protéine lie les HDL3 apo E-free et son activité de liaison augmente en chargeant les cellules en cholestérol.

En 1989, Kambouris a également mis en évidence sur la membrane des cellules de l'hépatome Hep G2 une protéine de 80 Kd en utilisant la technique du couplage des HDL3 à l'or colloïdal et non plus la mise en évidence de HDL iodées. De plus, il a montré que cette liaison est indépendante du Ca^{++} et régulée par le cholestérol.

4.1.2 Liaison des HDL aux cellules endothéliales:

En 1984, Tabas et al. étudient la liaison des HDL3 aux cellules endothéliales aortiques bovines et montrent qu'à 37°C, la liaison des ^{125}I -HDL3 n'est pas saturable. Par des expériences de compétition, ils mettent en évidence que des vésicules synthétiques contenant du cholestérol, des phospholipides et des apolipoprotéines (soit apo A-I, soit apo A-II), de même que des vésicules ne contenant que du cholestérol et des phospholipides déplacent les ^{125}I -HDL3 des cellules endothéliales. Ils en concluent que la liaison des HDL3 aux cellules n'est pas médiée par un récepteur protéique mais plutôt par une interaction entre les lipides présents à la surface cellulaire et ceux présents à la surface des HDL3.

Havekes et al. (1984) ont étudié la liaison des HDL aux cellules endothéliales humaines, non pas à 4°C mais à 37°C.

Brinton et al. (1985) montrent que les cellules endothéliales aortiques bovines possèdent des récepteurs spécifiques pour les HDL dont la fonction serait de faciliter le retrait d'un excès de cholestérol internalisé dans la cellule par le récepteur "scavenger" présent sur ces cellules.

Martin-Nizard et al (1989) montrent que les cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins fixent de façon spécifique les ^{125}I -HDL3 et que cette liaison augmente quand les cellules sont chargées en cholestérol.

4.2. Interaction des HDL3 avec leurs récepteurs:

4.2.1. Caractéristiques de la protéine de liaison des HDL3:

La protéine de liaison des HDL semble avoir des caractéristiques uniques différentes du récepteur des LDL:

- 1) des études de compétition ont montré que des HDL3 non marquées entraînent en compétition avec les ^{125}I -HDL3 pour les sites de liaison. Ce qui n'est pas le cas pour des expériences avec LDL et LDL acétylées où il n'y a pas inhibition de la liaison.
- 2) Des études réalisées avec des protéoliposomes riches en apo A-I et apo A-II montrent qu'ils se lient au même récepteur que les HDL3., ce qui n'est pas le cas s'ils contiennent de l'apo E.
- 3) L'activité de liaison augmente quand les cellules sont traitées au cholestérol. Il y a donc une régulation positive des récepteurs de HDL quand les cellules sont riches en cholestérol.

4) Le récepteur des HDL est très abondant sur les cellules endothéliales de l'aorte bovine alors qu'elles ne présentent que très peu de récepteurs à LDL.

4.2.2. Comment se réalise l'interaction entre HDL3 apo-E free et le "récepteur":

Les HDL3 humaines préparées chez le docteur Mazière ne contiennent pas d'apolipoprotéine E si on les analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide. De plus comme nous l'avons montré, les LDL n'entrent pas en compétition pour la liaison des HDL3. D'autres études ont montré que la liaison des HDL3 est indépendante des résidus lysine et arginine (Kagami et al, 1984) ainsi que des ions calcium (Chen et al, 1980).

Tout cela nous permet de croire que nous n'avons pas affaire au récepteur pour les lipoprotéines B/E.

Fidge and Nestel (1985) ont identifié les apolipoprotéines A_I et A_{II} comme intervenant directement dans la liaison de la lipoprotéine à des récepteurs sur les cellules surrénaliennes ou sur les fibroblastes de rat.

Cette détermination n'est pas aussi évidente qu'il n'y paraît.

En effet, ces sous-classes des HDL varient dans leur composition d'apolipoprotéines et ces particules existent dans un état continu de flux puisqu'il y a transfert et échange de lipides et de protéines entre les lipoprotéines et transformation des formes immatures en formes matures de HDL.

L'état dynamique des HDL contraste avec la composition plus statique des LDL, ce qui facilite la connaissance de l'interaction entre cette dernière particule et son récepteur.

4.3. Rôle du cholestérol:

Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'influence du cholestérol sur la liaison des HDL3 aux cellules endothéliales humaines. Ces résultats sont en contradiction avec la littérature (Schwitz, 1985, Grabam, 1987, Kambouris 1988) qui montre que la liaison est régulée de manière positive sur les cellules étudiées. Tauber (1981) a étudié l'effet du 25-hydroxycholestérol sur l'interaction des HDL avec les

cellules endothéliales vasculaires bovines à 4°C; ils n'observent pas de stimulation de la liaison pourtant bien accrue à 37°C.

Dans notre cas, les expériences de liaison avec ou sans cholestérol ont été réalisées deux fois, mais avec la même concentration de cholestérol à savoir 50 µg/ml de milieu. On sait que le cholestérol peut spontanément subir une oxydation à l'air. Cependant, ce sont surtout les dérivés de l'oxydation du cholestérol qui sont toxiques alors que le cholestérol purifié est non toxique (Peng et al, 1976). On sait que les dérivés du cholestérol inhibent l'enzyme HMG-COA reductase beaucoup plus que le cholestérol lui-même.

Un autre effet possible des dérivés de l'oxydation du cholestérol est le remplacement du cholestérol membranaire car la structure moléculaire de ces dérivés, est fort semblable à celle du cholestérol. Il peut en résulter une altération de la perméabilité membranaire menant à la mort cellulaire.

En principe, notre cholestérol ne contient pas ces dérivés toxiques mais les conditions de sa conservation n'ont pas été drastiques (par exemple, il n'y a pas eu de réfrigération à -80°C) et il est possible que la solution contienne des contaminants oxydés. Ce qui explique les altérations cellulaires surtout membranaires observées en microscope électronique. De plus, il est connu que ceux-ci peuvent être 100 fois plus toxiques que le cholestérol pur aux mêmes doses (Peng, 1985).

4.4 Efflux de cholestérol cellulaire médié par le récepteur HDL et sa régulation:

Les particules HDL3 peuvent enlever le cholestérol de la membrane plasmique de manière non spécifique mais c'est l'interaction spécifique et de haute affinité entre des particules contenant de l'apo A-I intacte avec un récepteur HDL (protéine de 110 kDa) à la surface cellulaire qui régit la translocation du cholestérol des compartiments intracellulaires vers la surface cellulaire.

Dès qu'il atteint la surface cellulaire, le cholestérol est éliminé des cellules à l'aide de particules acceptrices adéquates, dont des HDL (mais pas uniquement)(Willingham, 1989).

Ainsi, les cellules sécrètent le cholestérol intracellulaire par une voie qui implique deux étapes principales: la translocation du cholestérol aux membranes et sa fixation sur un accepteur.

Les opinions divergent quant aux mécanismes qui entraînent l'efflux de cholestérol des cellules par les HDL.

Oram et al.(1987) pensent que les HDL se lient aux cellules mais ne sont pas internalisées.

Schmitz et al.(1985) sont en faveur d'une endocytose suivie d'une rétroendocytose des HDL par association de vésicules d'endocytose aux gouttelettes lipidiques ,suivie de leur exocytose. Cette étude a été réalisée avec des HDL3 conjuguées à l'or.

On a emis des hypothèses pour tenter d'expliquer ces différences

1) les macrophages n'utilisent pas les HDL iodinées et les HDL conjugués à l'or de la même façon;

2) les recepteurs se recyclent rapidement (en allant de la surface vers l'intérieur de la cellule , puis retour à la surface. Ce recyclage serait retardé par la présence de l'or colloïdal qui permettrait une accumulation de ce dernier dans les endosomes.

Fchuda a lui utilisé une approche morphologique pour etudier les évènements suivants: la liaison des HDL au récepteur sur les macrophages de cellules péritonéales de rat, en utilisant un conjugué monovalent d'HDL et de la peroxydase. Il a montré que les HDL se lient a des "coated pits" à la surface des membranes. Elles sont ensuite internalisées pour former des vésicules et délivrées via les endosomes à des éléments transvésiculaires de l'appareil de Golgi, suivi d'une rétroendocytose vers le milieu extracellulaire.

Les deux hypotheses restent envisageables.

5. Expériences de morphologie:

5.1. Or colloïdal et conjugué HDL-or:

L'utilisation de l'or colloïdal comme marqueur cytochimique est basée sur ses caractéristiques physiques et sur le fait que les macromolécules, en s'adsorbant de façon non covalente sur les particules, les protègent de la floculation. (de Mey, 1986)

La technique de Frens (1973) est la plus utilisée pour la préparation de l'or colloïdal car elle permet la synthèse de particules de diamètre uniforme et contrôlé, par une simple modification de la

quantité d'agent réducteur ajouté au cours de la préparation.(Handley, 1989).

Cependant, avec l'augmentation de la taille, l'hétérogénéité des particules augmente au niveau du diamètre et des altérations de la forme géométrique peuvent se produire. Celles-ci ne peuvent pas être évitées et elles reflètent la nature cristalline de l'or(Goodman et al., 1981).

Dans nos expériences, nous avons constaté que l'or colloïdal se conserve au maximum 3 mois à 4°C et à l'obscurité. Dans la littérature, la durée de conservation de l'or est de plusieurs mois à 4°C également mais celle-ci est réalisée dans des conditions de stérilité bien plus rigoureuses que les nôtres.(Horisberger, 1981; Handley, 1989).

Selon certains auteurs, les particules d'or sont chargées négativement en surface par la présence d'ions et adsorbent, de ce fait, les macromolécules dont les protéines.(Handley, 1981; Horisberger, 1981). Cependant, pour Handley (1989) la préparation de conjugué à partir des lipoprotéines se différencie de celle d'autres protéines car les lipoprotéines sont des colloïdes biologiques et dès lors le marquage est représenté par une interaction colloïde-colloïde. De plus, contrairement aux autres protéines, les lipoprotéines ne constituent pas autour de la particule d'or une monocouche mais elles forment des groupes de particules laissant des espaces vides sur l'or qui peuvent altérer sa stabilité. Il préconise donc d'utiliser, lors de la préparation du conjugué, de l'albumine (BSA 1 %) qui aurait pour effet de stabiliser le conjugué en remplissant les espaces vides.

Suite aux résultats obtenus dans nos expériences de morphologie, on peut supposer une instabilité de notre conjugué dans le milieu d'incubation et il s'avère dès lors intéressant de recommencer ces expériences en utilisant l'albumine lors de sa préparation.

DeLamatre et al. (1990) ont réussi à mettre en évidence la rétroendocytose des HDL3 apo E-free dans les hépatomes de rat en utilisant un conjugué HDL-or stabilisé par l'addition, lors de la préparation, de polyéthylène glycol (PEG, PM 20 000). Cependant, Handley (1989) déconseille l'emploi d'un tel stabilisant car il a tendance à induire l'agrégation des complexes HDL-or.

5.2. Expériences de morphologie:

Le conjugué HDL-or constitue un bon outil pour l'étude de la liaison et de l'endocytose des HDL dans les cellules en culture (Handley, 1989).

Dans nos expériences, réalisées sur des cellules endothéliales humaines enrichies ou non en cholestérol, nous n'avons pu observer que quelques rares particules d'or sur la membrane des cellules, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature pour d'autres types cellulaires (Tóth, 1986; Schmitz et Robenek, 1985).

Aussi en utilisant des HDL couplées à des particules d'or de 16 et 40 nm, Schmitz et al. (1985) ont montré la présence de récepteurs à HDL sur des macrophages péritonéaux de souris ainsi que tout le chemin suivi par celles-ci dans ce type de cellule.

Tóth et al. (1986) en utilisant des HDL isolées dans un rotor VTi 50 selon la méthode de Chung (1980) et en utilisant la même technique de préparation du conjugué que nous, ont mis en évidence la liaison et l'internalisation des HDL dans des cellules adrenocorticales de rat.

Comme déjà signalé ci-dessus, la stabilité de notre conjugué peut être remise en question et l'utilisation d'albumine pourrait s'avérer nécessaire dans les expériences ultérieures.

Les concentrations en HDL-or que nous avons utilisées sont peut-être trop faibles pour permettre une saturation des récepteurs. La durée d'incubation des cellules avec le conjugué pourrait également être trop courte. Aussi, nous pourrions essayer deux heures d'incubation à 4°C.

De plus, n'ayant pas trouvé dans la littérature d'articles utilisant des études morphologiques pour l'étude du récepteur des HDL sur les cellules endothéliales, nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales que celles employées dans l'étude du récepteur des LDL. Ces conditions ne s'avèrent peut-être pas favorables dans le cas des HDL. Robenek et Severs (1984) ont montré l'existence de sites de liaison pour les HDL couplées à des particules d'or de 16 nm, sur des fibroblastes humains en les incubant pendant une heure à 4°C et dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude du récepteur à LDL.

Dans nos expériences, nous avons pu remarquer la présence de particules d'or sous les cellules endothéliales, dans la matrice extracellulaire. Ces particules témoignent ainsi de l'incubation des cellules avec le conjugué. En principe, en travaillant à 4°C (Klausner et

al., 1985), les étapes suivant la liaison sont évitées; dès lors une endocytose ou une transcytose sont à exclure; de plus, si tel était le cas, nous aurions pu observer des particules d'or dans les cellules ce qui n'est pas le cas. Nous pouvons supposer que les particules passent par les espaces intercellulaires; les particules se trouvant souvent proches de ceux-ci.

6. Isolement des HDL3:

Nous avons voulu mettre au point une technique nous permettant d'isoler la sous-fraction HDL3 des HDL en un temps relativement court. A cette fin, deux types de rotor ont été employés présentant des caractéristiques différentes.

D'une part, nous avons employé un rotor vertical VTi 50 qui a l'avantage de produire une séparation complète des différentes classes de lipoprotéines en un temps relativement court. Il permet ainsi de minimiser la dissociation de certaines apolipoprotéines et d'éviter une peroxydation lipidique des lipoprotéines qui constituent les problèmes majeurs de l'ultracentrifugation séquentielle. (Chung et al., 1980; Verne et al., 1986). Cependant, avec ce type de rotor, il se produit une perte de la résolution qui est principalement due au mélange lors de la réorientation des particules dans le gradient en début et fin de centrifugation. (Chung et al., 1980).

D'autre part, nous avons employé un rotor Ti 60 qui correspond au type de rotor utilisé dans la centrifugation séquentielle. Le désavantage de cette technique est qu'elle demande de longues durées de centrifugation car pour obtenir une séparation nette des lipoprotéines il faut que les protéines les plus denses atteignent le fond du tube et que celles que l'on veut isoler remontent au sommet de celui-ci. Le rotor Ti 60 a cependant l'avantage de permettre d'utiliser des volumes importants de plasma et de travailler à des vitesses élevées, diminuant ainsi le temps de centrifugation. (Verne et al., 1986; Mills, 1984). Dès lors en utilisant un tel type de rotor en première centrifugation, nous avons pu travailler sur un plus grand volume de sérum. L'élimination des lipoprotéines de densité inférieure aux HDL, permettent une réduction du volume et l'utilisation du rotor vertical de façon à diminuer le temps de centrifugation.

Après la centrifugation dans le rotor Ti 60, nous obtenions, dans le fond du tube, un culot très visqueux qui n'a pas été récupéré

pour les centrifugations ultérieures. Or, selon Verne et al; (1986) ce culot contient des protéines du plasma mais également des lipoprotéines plus denses et il doit donc être resuspendu entre les centrifugations de façon à éviter une perte des lipoprotéines. Ceci pourrait dès lors être une explication du faible rendement obtenu.

Dans la littérature, certains auteurs utilisent des rotors zonaux qui ont des capacités de 600 ml et plus et qui ont l'avantage d'isoler de façon complète et plus rapide des lipoprotéines que dans les rotors conventionnels. (Mills, 1984).

L'utilisation de gradient discontinu permet la separation des 3 classes de lipoprotéines en bandes distinctes séparées par des espaces de plus faible concentration en materiel. Cependant, pour une séparation adéquate, il est préférable de travailler sur un tube suffisamment long de façon à permettre une bonne séparation des constituants, ce qui limite l'emploi de certains rotors. (Mills, 1984).

Les lipoprotéines présentant une distribution de densites plus ou moins continue, il est difficile, dans un gradient linéaire de les séparer quand elles ont atteint leur équilibre isopycniue.

Dans la littérature, la contamination des fractions est principalement le fait de la présence d'albumine et d'autres protéines de plasma. Un désavantage de l'utilisation du rotor vertical est que suite aux conditions de centrifugation, l'albumine adhère à la paroi des tubes et de ce fait est difficile à éliminer des différentes fractions de lipoprotéines.(Chung, 1986).

En théorie, dans la technique d'ultracentrifugation séquentielle, une contamination par l'albumine peut être évitée mais en pratique il n'en est rien et il est conseillé de réaliser des centrifugations supplémentaires de façon à éliminer les contaminants des différentes fractions. (Mills, 1984). Selon nos résultats, la dernière centrifugation réalisée serait un lavage car on ne détecte plus d'albumine dans la solution de HDL finale.

Cette technique de séparation devrait être à nouveau testée en récupérant après chaque centrifugation dans le rotor Ti 60 le culot visqueux présent au fond du tube; il s'avérerait intéressant de mettre au point un type de gradient permettant de séparer d'une façon plus nette HDL2 et HDL3. La centrifugation finale servant de lavage pourrait être réalisée en mettant les lipoprotéines à la densité de 1,21

g/ml, densité typique des HDL3 et qui n'est pas trop proche de celle de l'albumine.

De plus, il serait très intéressant d'utiliser des lipoprotéines isolées par ultracentrifugation séquentielle et marquées à l'iode radioactif lors de nos centrifugations car elles permettraient de suivre la distribution exacte de celles-ci au cours des centrifugations et dès lors faciliterait la mise au point d'une telle technique.

Des techniques immunologiques pourraient également être utilisées afin de mettre en évidence les différentes apolipoprotéines et ainsi caractériser d'une façon plus spécifique, les lipoprotéines présentes dans les fractions après centrifugation.

CONCLUSION:

Il serait intéressant de pouvoir répondre à toute une série de questions telles que :

- 1) Quel est le destin des HDL3 après leur fixation sur les cellules endothéliales; sont-elles dégradées dans les lysosomes, subissent-elles une rétroendocytose?
- 2) Quelle proportion d'apolipoprotéines des HDL3 associée à la cellule après une incubation préalable, pourrait se retrouver à l'intérieur?
- 3) Dans le cas d'une rétroendocytose, les protéines resécrétées sont-elles identiques à celles endocytées?
- 4) Les HDL2 ne peuvent-elles pas se fixer également sur les cellules endothéliales?
- 5) Des concentrations plus faibles en cholestérol ne favoriseraient-elles pas la liaison des HDL3 aux cellules endothéliales?
- 6) La liaison des HDL3 est-elle modifiée quand les cellules endothéliales sont soumises à un stress oxydant?

Toutes les techniques que nous avons utilisées (isolement, iodination, liaison, électrophorèse, morphologie) nous permettraient de tenter de répondre à ces questions si seulement les facilités techniques et le temps nous étaient alloués en plus.

Bibliographie

1. Allain, C.A., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W. & Fu, P.C. (1974).
Enzymatic determination of total serum cholesterol.
Clin. Chem 20, 470-475.
2. Anitschkov N. (1913).
Über die Veränderungen der Kaninchen aorta bei
experimenteller chollerinesteatose.
Beit. Path. Anat. 56, 379.
3. Aulinskas, T.H., van der Westuyzen, D.R., Bierman, E.L.,
Gevers, W. & Coetzee, G.A. (1981).
Retro-endocytosis of low density lipoprotein by
cultured bovine aortic smooth muscle cells.
Biochem. Biophys. Acta 664, 255-265.
4. Badimon, J.J., Badimon, L., Galvez, A., Dische, R., &
Fuster, V. (1989).
High Density Lipoprotein Plasma Fractions Inhibit
Aortic Fatty Streaks in Cholesterol-Fed Rabbits.
Lab. Invest. 60, 455-461.
5. Benditt, E.P. & Benditt, J.M. (1973).
Evidence for a monoclonal origin of human
atherosclerosis plaques.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1753-1756.
6. Biesbroeck, R., Oram, J.F., Albers, J.J. & Bierman, E.L.
(1983).
Specific high-affinity binding of high density
lipoproteins to cultured human skin fibroblasts and
arterial smooth muscle cells.
J. Clin. Invest. 71, 525-539.
7. Bilheimer, D.W., Eisenberg, S. & Levy, R.I. (1972).
The metabolism of very low density lipoprotein
proteins. I. Preliminary in vitro and in vivo
observations.
Biochim. Biophys. Acta 260, 212-221.

8. Bloch, K., Berg, B.N. & Rittenberg, D. (1943).
The biological conversion of cholesterol to cholic acid.
J. Biol. Chem. 149, 511-517.
9. Breslow, J.L. (1987).
Lipoprotein genetics and molecular biology.
in Plasma Lipoproteins (Gotto, Jr.A.M., ed.), Elsevier Science Publishers 14, 359-397.
10. Brinton, E.A., Kenagy, R.D., Oram, J.F. & Bierman, E.L. (1985).
Regulation of high density lipoprotein binding activity of aortic endothelial cells by treatment with acetylated low density lipoprotein.
Arteriosclerosis 5, 329-335.
11. Brown, M.S., Kovanen, P.T. & Goldstein, J.L. (1979).
Receptor mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for sterol synthesis in the adrenal cortex.
Recent Prog. Horm. Res. 35, 215-257.
12. Bruckert, E., Giral, P., Dairou, F. & De Gennes, J.L. (1988).
Lipoprotéines de haute densité-cholestérol : métabolisme et rôle dans l'athérosclérose.
La Presse Médicale 17, 862-866.
13. Brunzell, J.D., Sniderman, A.D., Albers, J.J. & Kwiterovich, P.O., Jr. (1984).
Arteriosclerosis 4, 79-83.
14. Capron, L. (1983).
Athérosclérose.
Rev. Neurol. 139, 167-176.
15. Carey, M.C. & Small, D.M. (1978).
The physical chemistry of cholesterol solubility in bile: Relation to gallstone formation and dissolution in man.
J. Clin. Invest. 61, 998-1026.

16. Catapano, A.L. (1987).
Binding Sites for HDL and HDL Catabolism.
Atheroscl. Rev. 16, 109-123.
17. Chacko, G.K., Mahlberg, F.H., & Johnson, W.J. (1988).
Cross-linking of apoproteins in high density
lipoprotein by dimethylsuberimidate inhibits specific
lipoprotein binding to membranes.
J. Lipid. Res. 29, 319-324.
18. Chajek-Shaul, T., Friedman, G., Stein, O., Etienne, J. &
Stein, Y. (1985).
Endogenous plasma lipoprotein lipase activity in fed
and fasting rats may reflect the functional pool of
endothelial lipoprotein lipase.
Biochim. Biophys. Acta 837, 271-278.
19. Chung, B.H., Wilkinson, T., Geer, J.C. & Segrest, J.P.
(1980).
Preparative and quantitative isolation of plasma
lipoproteins: rapid, single discontinuous density
gradient ultracentrifugation in a vertical rotor.
J. Lipid Res. 21, 284-291.
20. Chung, B.H., Segrest, J.P., Ray, M.J., Brunzell, J.D.,
Hokanson, J.E., Krauss, R.M., Beaudrie, K. & Cone, T.J.
(1986).
Single vertical spin density gradient
ultracentrifugation.
Methods Enzymol. 128, 181-209.
21. Coetzee, G.A., Strachan, A.F., van der Westheuzen, D.R.,
Hoppe, H.C., Jeena, M.S. & de-Ber, F.C. (1986).
Serum amyloid A-containing human high density
lipoprotein 3.
J. Biol. Chem. 261, 9644.
22. Collet, X., Perret, B., Chollet, F., Hullin, F., Chap,
H. & Douste-Blazy, L. (1988).
Uptake of HDL unesterified and esterified cholesterol
by human endothelial cells. Modulation by HDL
phospholipolysis and cell cholesterol content.
Biochem. Biophys. Acta 958, 81-92.

23. Davies, P.F. & Ross, R. (1980).
Growth-mediated density dependant inhibition of endocytosis in cultured arterial smooth muscle cells.
Exp. Cell Res. 129, 329-336.
24. de Duve C. (1974).
The participation of lysosomes in the transformation of smooth muscle cells to foamy cells in the aorta of cholesterol-fed rabbits.
Acat Cardiol.(suppl.) 20, 9-25.
25. De Mey (1986).
The Preparation and Use of Gold Probes.
in Immunocytochemistry (Polack, J.M. // Van Noorden, S., eds.) 2d édition, 115-145.
26. DeLamatre, J.G., Sarphie, T.G., Archibold, R.C.& Hornick, C.A. (1990).
Metabolism of apo E-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells: evidence for retroendocytic pathway 31, 191-202.
27. Ducobu, J.,& Dupont, P. (1981).
Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et le développement de l'athéromatose.
Rév. Méd. Brux. 2, 811-815.
28. Fernandez, M.L.& McNamara, D.J. (1990).
High-density lipoprotein binding to guinea-pig hepatic membranes. Comparaison of guinea-pig and human ligands.
Biochim. Biophys. Acta 1042, 142-145.
29. Fidge, N.H.& Nestel, P.J. (1985).
Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein3 with receptors on cultured cells.
J. Biol. Chem. 260, 3570-3575.
30. Fielding, C.J. & Fielding, P.E. (1982).
Cholesterol transport between cells and body fluids. Roles of plasma lipoproteins and the plasma cholesterol esterification system.
Med. Clin. of North Am. 66, 363-373.

31. Fogelman, A.M., Schechter, J.S., Hokom, M., Child, J.S., & Edwards, P.A. (1980).
Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesterol accumulation in human monocyte-macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2214-2218.
32. Frens, G. (1973).
Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodispersed gold solutions.
Nature Phys. Sci. 241, 20-22.
33. Garfinkel, A.S. & Schotz, M.C. (1987).
Lipoprotein lipase.
in Plasma Lipoproteins (Gotto, Jr.A.M.), Elsevier Science Publishers, New York 335-357.
34. Ghiselli, G.C., Angelucci, R., Regazzoni, A. & Sirtori, C.R. (1981).
Metabolism of HDL, HDLc by monolayers of rat hepatocytes.
FEBS Letters 125, 60-64.
35. Gianturco, S.H. & Bradley, W.A. (1987).
Lipoprotein receptors.
in Plasma Lipoproteins (Gotto, Jr.A.M.), Elsevier Science Publishers, New York 183-220.
36. Goldstein J.L. & Brown M.S. (1977).
The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis.
Ann. Rev. Biochem. 46, 897-930.
37. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1974).
Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.
J. Biol. Chem. 249, 5153-5162.
38. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1987).
Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of

hypercholesterolemia and atherosclerosis.
Circulation 76 , 504-507.

39. Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L.K., & Livingston, D.C. (1981).
Colloidal gold markers and probes for routine application in microscopy.
J. Microsc. 128, 201-213.
40. Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L.K. & Livingston, D.C. (1981).
Colloidal gold markers and probes for routine application in microscopy.
J. Microsc. 123, 201.
41. Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, Mc Kannel, W.B. & Dawber, T.R. (1977).
High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study.
AM. J. Med. 62, 707-714.
42. Gotto, A.M., Jr. (1988).
Structural and Functional Aspects of HDL and LDL: Influences of Apolipoproteins.
Atheroscl. Rev. 17, 39-50.
43. Graham, D.L. & Oram, J.F. (1987).
Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting.
J. Biol. Chem. 262, 7439-7442.
44. Grundy, S.M. (1990).
Cholesterol and coronary heart disease.
Scand. J. Clin. Lab. Invest 50 , 17-24.
45. Grundy, S.M. (1986).
Liver, Lipoproteins, and Atherosclerosis: An Overview.
Atheroscl. Rev. 15, 1-12.
46. Gwynne, J.T. & Mahaffee, D.D. (1989).
Rat Adrenal Uptake and Metabolism of High Density Lipoprotein Cholesteryl Ester.
J. Biol. Chem. 264 n°4, 8141-8150.

47. 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, No. 1, 368-371.
48. Handley, D.A. & Arbeeny, C.M. (1989).
Preparation and Application of Lipoprotein-Gold Complex.
in Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Hayat, M.A., ed), Academic Press, New York 2, 149-174.
49. Havekes, L., Schouten, D., Van Hinsbergh, V. & de Wit, E. (1984).
Characterisation of the binding of apolipoprotein E-free high density lipoprotein to cultured human endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 785-790.
50. Havel, R.J., Eder, H.A. & Bragdon, J.H. (1955).
The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.
J. Clin. Invest. 34, 1345-1353.
51. Henriksen, T., Mahoney, E.M. & Steinberg, D. (1983).
Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein.
Arteriosclerosis 3, 149-159.
52. Hoeg, J.M., Demosky, S.J., Lackner, K.J., Osborne, J.C., Oliver, C. & Brewer, H.B. (1986).
The expressed human hepatic receptor for low-density lipoproteins differs from the fibroblast low-density lipoprotein receptor.
Biochim. Biophys. Acta 876, 13-21.
53. Hoeg, J.M., Demosky, S.J., Edge, S.B., Gregg, R.E., Osborne, J.C. & Brewer, H.B. (1985).
Characterization of a Human Hepatic Receptors for High Density Lipoproteins.
Arteriosclerosis 5, 228-237.

54. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. & Minick, C.R. (1973).
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.
J. Clin. Invest. 52, 2745-2756.
55. Jonas, A. (1987).
Lecithin cholesterol acyltransferase.
in *Plasma Lipoproteins* (Gotto, Jr. A.M., ed.),
Elsevier Science Publishers, New York 14, 299-333.
56. Kambouris, A.M., Roach, P.D. & Nestel, P.J. (1988).
Demonstration of a high density lipoprotein (HDL)-binding protein in Hep G2 cells using colloidal gold-HDL conjugates.
FEBS Lett. 230, 176-180.
57. Karlin, J.B., Johnson, W.J., Benedict, C.R., Chacko, G.K., Phillips, M.C. & Rothblat, G.H. (1987).
Cholesterol Flux between Cells and High Density Lipoprotein.
J. Biol. Chem. 262, 12557-12564.
58. Kibe, A., Breuer, A.C. & Holzbach, R.T. (1984).
Cholesterol nucleation in human bile by video-enhanced contrast-differential interference microscopy (VEM):
The role of vesicles in metastable supersaturation.
Gastroenterology 86, 1326.
59. Klausner, R., Van Renswoude, J., Harford, J., Wofsy, C. & Goldstein, B. (1985).
Mathematical modeling of receptor-mediated endocytosis.
in *Endocytosis* (Pastan, I. and Willingham, M.C., ed.),
Plenum Publishing Corporation New York 259-279.

60. Klimov, A.N. (1988).
In Vivo Formation of Modified Lipoproteins with
Increased Affinity for Macrophages.
Atheroscl. Rev. 17, 75-86.
61. Kovanen, P.T., Basu, S.K., Goldstein, J.L. & Brown,
M.S. (1979).
Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal
cortex.II. Low density lipoprotein binding to membranes
prepared from fresh tissue.
Endocrinology 104, 610-616.
62. Lipid Research Clinics Program (1984).
The lipid research clinics coronary primary prevention

trial results. I. Reduction in incidence of coronary
heart disease.
JAMA 251, 351-364.
63. Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall,
R.J. (1951).
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
64. Mackinnon, M., Savage, J., Wishart, R. & Barter, P. -
(1986).
Metabolism of High Density Lipoproteins by the Perfused
Rabbit Liver.
J. Biol. Chem.

261,
2548-2552.
65. Mahley, R.W. & Innerarity, T.L. (1983).
Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis.
Biochem. Biophys. Acta 737, 197-222.
66. Martin-Nizard, F., Meresse, S., Cecchelli, R., Fruchart,
J. C. & Delbart, C. (1989).
Interactions of high-density lipoprotein 3 with brain

capillary endothelial cells.
Biochem. Biophys. Acta 1005, 201-208.

67. Mathé, D. & Lutton, C. (1984).
Le cholestérol. Aspects dynamiques et métaboliques.
J. Physiol. 79, 41-97.
68. McFarlane, A.S. (1958).
Efficient trace-labeling of proteins with iodine.
Nature 182, 53.
69. McCall, M.R., Forte, T.M., & Shore, V.G. (1988).
Heterogeneity of nascent high density lipoproteins
secreted by the hepatoma-derived cell-line Hep G2.

J. Lipid. Res. 29, 1127-1137.

70. Mendel, C.M. & Kunikate, S.T. (1988).
Cell-surface binding sites for high density
lipoproteins do not mediate efflux of cholesterol from
human fibroblasts in tissue culture.
J. Lipid. Res. 29, 1171-1194.

71. Mendel, C.M., Kunitake, S.T., Kane, J.P. & Kempner,
E.S. (1988).
Radiation Inactivation of Binding Sites for High
Density Lipoproteins in Human Fibroblast Membranes.
J. Biol. Chem. 263, 1314-1319.

12

72. Mills, G.L., Lane, P.A. & Weech, P.K. (1984).
A guidebook to lipoprotein technique.
Laboratory techniques in biochemistry and molecular
biology.
Elsevier, Amsterdam 14 (Burdon, R.H. & Van Knippenberg,
P.H., eds.), 512.

73. Murakami, M., Horiuchi, S., Takata, K. & Morino, Y.

(1987).
Distinction in the Mode of Receptor-Mediated
Endocytosis between High Density Lipoprotein and
Acetylated High Density Lipoprotein: Evidence for High
Density Lipoprotein Receptor-Mediated Cholesterol
Transfer.
J. Biochem. 101, 729-741.

74. Nakai, T., Otta, P.S., Kennedy, D.L. & Whayne, T.F.
(1976).
Rat HDL subfraction uptake and catabolism by isolated
rat liver parenchymal cells.
J. Biol. Chem. 251, 4914-4921.

75. Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S. & Schotz, M. C.
(1980).
Lipolytic enzymes plasma lipoprotein metabolism.
Ann. Rev. Biochem. 49, 667-687.

76. Norum, K.R., Berg, T., Heigerud, P. & Drevon, C.A. (1983).
Transport of Cholesterol.
Physiol. Rev. 63 , 1343-1419.
77. Norum, R.A., Lakier, J.K., Goldstein, S. & al. (1982).
Familial deficiency of apolipoproteins A1 et C3 and precocious coronary artery disease.
New Engl. J. Med. 306, 1513-1519.

13

78. Okabe (1984).
Pulmonary macrophage: a major source of lipoprotein lipase in the Lung.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 273-278.
79. Olivecrona (1985).
Combined Lipase Deficiency (cld/cld) in Mice.
J. Biol. Chem. 260, 2552-2557.
80. Dram, J.F., Johnson, C.J., & Brown, T.A. (1987).
Interaction of High Density Lipoprotein with Its Receptor on Cultured Fibroblasts and Macrophages.
J. Biol. Chem. 262, N°5, 2405-2410.
81. Dram, J.F. (1986).
Receptor-Mediated Transport of Cholesterol between Cultured Cells and High-Density Lipoproteins.
Methods in Enzymology 129, 645-659.
82. Dram, J.F., Brinton, E.A. & Bierman E.L. (1983).
Regulation of high density lipoprotein receptors activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells .
J. Clin. Invest. 72, 1611-1621.
83. Peng, S.-K., Taylor, C.B., Hill, J.C. & Morin R.J. (1985).

endothelial damage.
Atherosclerosis 54, 121-133.

84. Peng, S. K., Tham, P., Taylor, C. B. & Mikkelsen, B.
(1979).
Cytotoxicity of oxidation derivatives of cholesterol on
cultured aortic smooth muscle cells and their effect on
cholesterol biosynthesis.
Am. J. Clin. Nutr. 32, 1033.

14

85. Poumay, Y. (1988).
Contribution à l'étude de l'athérogenèse. Effets des

dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytosee
spécifique des lipoprotéines de faible densité par les
cellules endothéliales.
Thèse de Doctorat. Facultés Universitaires N-D de la
Paix, Namur.

86. Poumay, Y. & Ronveaux-Dupai, M.F. (1985).
Rapid preparative isolation of concentrated low density
lipoproteins and of lipoprotein-deficient serum using
vertical rotor gradient ultracentrifugation.
J. Lipid. Res. 26, 1476-1480.

87. Reichl, D. & Miller, N.E.
(1989).
Pathophysiology of Reverse Cholesterol Transport.
Artériosclérosis 9, 785-797.

88. Robenek, H. & Severs, N.J. (1984).
Double Labeling of Lipoprotein Receptors in Fibroblast
Cell Surface Replicas.
J. Ultrastr. Res. 87.

89. Ross, R. & Glomset, J.A. (1976).
The pathogenesis of atherosclerosis.
N. Engl. J. Med. 295, 369-377 & 420-425.

90. Ross R., Glomset J. & Harker L. (1977).

91. Savion, N. & Kotev-Emeth, S. (1989).
Cholesterol efflux from and high-density-lipoproteins
binding to cultured bovine vascular endothelial cells
are higher than with vascular smooth muscle cells.
Eur. J. Biochem. 183, 363-370.

15

92. Scanu, A.M. (1987).
Proteolytic Enzymes in the Biogenesis and Metabolism of
Plasma HDL.
Atheroscl. Rev. 16, 9-18.

93. Schaefer, E.J., Zech, L.A., Schwartz, DE et al. (1980).
Coronary heart disease prevalence and other clinical
features of familial high density lipoprotein
deficiency (Tangier's disease).
Ann. Intern. Med. 93, 261-266.

94. Schmitz, G., Robenek, H., Lohmann, U. & Assmann, G.
(1985).
Interaction of high density lipoproteins with
cholesteryl est-laden macrophages: biochemical and
morphological characterization of cell surface receptor
binding, endocytosis and resecretion of high density
lipoproteins by macrophages.
Embo J. 4, 613-622.

95. Schmitz, G., Robenek, H., & Assmann, G. (1987).
Role of the High-Density Lipoprotein Receptor Cycle in
Macrophage Cholesterol Metabolism.
Atheroscl. Rev. 16, 95-107.

96. Schouten, D., Kleinherenbrink-Stins, M., Brouwer, A.,
Knook, D.L. & Van Berkel, T.J.C. (1988).
Interaction in vivo and in vitro of
apolipoprotein-E-free high-density lipoprotein with
parenchymal, endothelial and Kupffer cells from rat

97. Sidoli, A., Scarebottolo, L. & Catapano, A.L. (1987).
Human Apolipoprotein Genes: Organization and
Expression.
Atheroscl. Rev. 16, 39-56.

16

98. Slotte, J.P., Oram, J.F. & Bierman, E.L. (1987).
Binding of High Density Lipoproteins to Cell Receptors
Promotes Translocation of Cholesterol from
Intracellular Membranes to the Cell Surface.
J. Biol. Chem. 262, N°27, 12904-12907.
99. Small, D.M. (1987).
HDL system: a short review of structure and metabolism.
Atheroscl. Rev. 16, 1-8.
100. Sparrow, C.P. & Pittman, R.C. (1990).
Cholesterol esters selectively taken up from
high-density lipoproteins are hydrolysed
extralysosomally.
Biochim. Biophys. Acta 1043, 203-210.
101. Stam, H., Broekhoven-Schokker, S. & Hülsmann, W. C.
(1986).
Characterization of mono-, di- and triacylglycerol
lipase activities in the isolated rat heart.
Biochim. Biophys. Acta 875, 76-86.
102. Steinberg D. (1987).
Lipoprotein and atherosclerosis : some unanswered
questions.
Am. Heart J. 113, 626-632.
103. Steinberg, D. (1987).
Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis.
Circulation 76 n°3, 508-514.
104. Steinberg, D. (1988).

105. Stender, S. (1990).
Atherogenesis and the role of lipoproteins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 50, supplement 199, 14-16.
106. Tabas, I. & Tall, A.R. (1984).
Mechanism of the association of HDL3 with endothelial
cells, smooth muscle cells, and fibroblasts.
J. Biol. Chem. 259, 13897-13905.
107. Takahashi, K., Fukuda, S., Naito, M., Horiuchi, S.,
Takata, K., & Morino, Y. (1989).
Endocytic Pathway of High Density Lipoprotein Via
Trans-Golgi System in Rat Resident Peritoneal
Macrophages.
Lab. Invest. 61, N°3, 270-277.
108. Takata, K., Horiuchi, S., Rahim, A.T.M.A., & Morino, Y.
(1988).
Receptor-mediated internalization of high density
lipoprotein by rat sinusoidal liver cells :
identification of a nonlysosomal endocytic pathway by
fluorescence-labeled ligand.
J. Lipid. Res 29, 1117-1126.
109. Talavera, F., & Menon, K.M.J. (1989).
Regulation of Rat Luteal Cell High Density Lipoprotein
Receptors: Up-Regulation in Response to Changes in
Intracellular Cholesterol Concentration.
Endocrinology 125 n°4, 2015-2021.
110. Tauber, P., Goldminz, D., & Gospodarowicz, D. (1981).
Up-Regulation in Vascular Endothelial Cells of Binding
Sites of High Density Lipoprotein Induced by
25-Hydroxicholesterol

111. Toth, I.E., Szabo, D., Bacsy, E., Szalay, K.Sz., Hesz, A., & Szollar, L.G. (1986).
Morphological evidence of lysosomal uptake of high-density lipoproteins by rat adrenocortical cells in vitro.
Mol. Cell. Endocrinol. 44, 185-194.
112. Van Tol, A., van Gent, T. & van't Hooft, F.M. & Vlaspolter, F. (1978).
High density lipoprotein catabolism before and after partial hepatectomy.
Atherosclerosis 29, 101-108.
113. Van Tol, A., Van Gent, T., Van't Hooft, F.M. & Vlaspolter, F. (1978).
High density lipoprotein catabolism before and after partial hepatectomy.
Atherosclerosis 29, 439-448.
114. Virchow R. (1856).
Phlogose and thrombose im Gefabsystem.
in: *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medecin* Meidinger Sohn & co, Frankfurt.
115. Vydelingum (1983).
Insulin regulation of fat cell ribosomes, protein synthesis, and lipoprotein lipase.
Am. J. Physiol. 245, E121-E131.
116. Weisgraber, K.H. & Mahley, R.W. (1980).
Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-sepharose affinity chromatography.
J. Lipid Res. 21, 316-325.
117. Willingham M.C. (1980)