

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Contribution à l'étude de l'athérogenèse. 10: Effet du TNF sur la liaison des lipoprotéines de faible densité aux cellules endothéliales en culture

Nibes, Daniel

*Award date:*  
1991

*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.

Unité de cytologie

Promoteur : Prof. M-F Ronveaux-Dupal

**Contribution à l'étude de l'athérogenèse. X.  
Effet du TNF sur la liaison des lipoprotéines  
de faible densité aux cellules endothéliales  
en culture.**

Daniel Nibes

1990-1991

**Contribution à l'étude de l'athérogenèse.X.**  
**Effet du TNF sur la liaison spécifique des**  
**lipoprotéines de faible densité aux cellules**  
**endothéliales en culture**

NIBES Daniel

Résumé

Au cours de la formation d'une plaque d'athérosclérose, il y a accumulation de LDL au niveau de l'intima artérielle. Ces LDL subissent des modifications qui augmentent leur capture par les macrophages. Ceux-ci se remplissent alors d'esters de cholestérol et deviennent des cellules spumeuses, caractéristiques des lésions athéroscléreuses. La liaison et l'endocytose des LDL au niveau des cellules endothéliales se réalise de manière spécifique et non spécifique. On a mis en évidence du TNF notamment à la surface des cellules endothéliales et musculaires lisses de ces lésions. Le but de ce travail est d'étudier un effet éventuel du TNF sur la liaison spécifique des LDL aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture. Grâce au test d'incorporation de thymidine tritiée et au test de prolifération nous avons pu mettre en évidence que le TNF inhibe la croissance des cellules endothéliales en culture. L'étude de la liaison spécifique des <sup>125</sup>I-LDL aux cellules endothéliales en culture nous indique qu'il semble y avoir un effet stimulateur du TNF sur cette liaison. Le TNF stimule probablement la production des récepteurs de LDL et/ou leur expression à la surface des cellules endothéliales. L'effet stimulateur du TNF sur la liaison spécifique des LDL aux cellules endothéliales en culture, pourrait s'avérer intéressant dans le cadre de l'étude de l'athérogenèse.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 1991

Promoteur : M.-F. Ronveaux-Dupal

*Au terme de ce mémoire, je voudrais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail. Je remercie plus particulièrement:*

*Madame M.F. Ronveaux-Dupal, promoteur de ce mémoire, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir orienté tout au long de cette année;*

*Rose, Françoise, Michel et Francis pour leur sympathie et tous les conseils théoriques et pratiques qu'ils m'ont enseignés;*

*Noëlle, Jackie, Joseph, Ariane et Nicole pour leur précieuse collaboration, leur disponibilité ainsi que leurs encouragements;*

*Anne H., pour sa complicité, sa sympathie et son sourire,*

*Xavier, pour son amitié, ses conseils et ses encouragements.*

*Je remercie très chaleureusement, Anne T., Xavier, Olivier, Nathalie, Isabelle, Rose, Françoise, Michel et Francis qui se sont investis avec ferveur et beaucoup de gentillesse dans la lecture, la dactylographie et les mises au point de ce mémoire.*

*Enfin, je remercie ma famille, tout particulièrement mes parents, de m'avoir donné la possibilité d'entamer ces études, et pour les encouragements et la confiance qu'ils ont toujours manifestés à mon égard.*

## Liste des abréviations

BSA: albumine bovine sérique

EGF: epidermal growth factor

IFN: interféron

IL-1: interleukine 1

<sup>125</sup>I-LDL: LDL marquée à l'isotope 125 de l'iode

LDL: low density lipoprotein

LPDS: lipoprotein deficient serum

LT: lymphotsin = tumor necrosis facteur- $\beta$

TNF: tumor necrosis factor- $\alpha$

PDGF: platelet derived growth factor

PLA2: phospholipase A2

PBS: tampon phosphate de potassium 10mM à pH7,4 contenant 0,9% de NaCl

M-CSF: macrophage colony stimulating factor

NBS: new born serum (sérum de veau nouveau né)

M199+NBSx%: milieu de culture (type M199) contenant x% de new born serum (v/v)

M199+LPDSx%: milieu de culture (type M199) contenant x% de lipoprotein deprived serum (v/v)

## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION GENERALE

1. L'ATHEROSCLEROSE	1
1.1. Définition	1
1.2. Les lésions de l'athérosclérose	1
1.3. Les hypothèses de l'athérogenèse	3
1.3.1. Les hypothèses anciennes	3
1.3.2. Les hypothèses récentes	4
A. Hypothèse de la réponse à la lésion de l'endothélium	4
B. Hypothèse de l'infiltration liquide	5
C. L'hypothèse du stress oxydant	5
2. LA REGULATION DU CHOLESTEROL CELLULAIRE	7
3. ENDOTHELIUM ET CELLULES ENDOTHELIALES	8
3.1. L'endothélium	8
3.2. Les cellules endothéliales	9
3.2.1. Description	9
3.2.2. Fonctions	11
A. La perméabilité sélective	11
B. L'hémostase : fonctions procoagulantes et anticoagulantes	12
C. La réponse immunitaire	13
D. Synthèse du tissu conjonctif et de la membrane basale	13
E. Régulation du tonus vasculaire	14
3.2.3. Croissance des cellules endothéliales	15
4. LES CYTOKINES	16
4.1. Introduction	16
4.2. Les propriétés générales des cytokines	16
5. LE TUMOR NECROSIS FACTOR	18
5.1. Propriétés générales	18

5.2. Effets biologiques du TNF- $\alpha$	20
5.2.1. Cytotoxicité du TNF- $\alpha$	20
5.2.2. TNF, cachectine et métabolisme des lipides	22
5.2.3. Effet du TNF sur les cellules endothéliales	22
A. Coagulation	23
B. Inflammation	23
C. Immunité	24
5.2.4. Autres actions du TNF.	24
5.2.5. Effets pathologiques du TNF.	25
<b>BUT DU TRAVAIL</b>	<b>26</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
1. CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES PROVENANT DE LA VEINE OMBILICALE HUMAINE	27
1.1. Origine et mise en culture des cellules endothéliales	27
1.2. Changement de milieu et repiquage	28
1.3. Examen des cellules en culture	28
2. ISOLEMENT DES LDL	28
Dosage protéique des lipoprotéines	29
Dosage du cholestérol	29
Le sérum déficient en lipoprotéines (LPDS)	30
3. LE TUMOR NECROSIS FACTOR	30
4. TEST DE CYTOTOXICITE: ESTIMATION DE LA LYSE DES CELLULES PAR LA MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE LIBEREE DANS LE MILIEU	30
4.1. Dosage de la LDH	30
4.2. Observation morphologique des cellules en microscopie photonique	31
5. TESTS DE PROLIFERATION CELLULAIRE	31
5.1. Test d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN	31
5.1.1. Repiquage des cellules endothéliales	31
5.1.2. Incubation des cellules endothéliales avec le TNF et la thymidine tritiée	31

5.1.3. Estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN	32
5.2. Courbe de croissance par quantification de cellules	32
5.2.1. Méthode par comptage des cellules sur chambres de Bürcker	32
5.2.2. Méthode au cristal violet	33

## 6. MARQUAGE DES LDL AVEC L'IODE RADIOACTIF (IODINATION) 34

7. MESURES DE LA LIAISON DES <sup>125</sup> I-LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES	35
7.1. Mesure de la liaison totale des <sup>125</sup> I-LDL	35
7.2. Mesure de la liaison non spécifique et spécifique	35

## RESULTATS

1. IDENTIFICATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE	36
2. TEST DE CYTOTOXICITE DU TNF SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES	36
2.1. Mesure de l'activité LDH dans le milieu additionné de sérum (NBS) en concentration croissante.	36
2.2. Essai de mesure du pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales incubées avec différentes concentrations de TNF37	
2.3. Mesure du pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales pendant différentes durées d'incubation avec le TNF	37
2.3.1. Incubation d'une durée de 2 heures	37
2.3.2. Incubation d'une durée de 24 heures	39
2.2.3. Incubation d'une durée de 48 heures	39
3. EFFET DU TNF SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE	40
3.1. Effet du TNF sur l'incorporation de [ <sup>3</sup> H]-thymidine par les cellules endothéliales	40
3.2. Estimation de l'effet du TNF sur la prolifération des cellules endothéliales par quantification de cellules.	42
3.2.1. Méthode par comptage de cellules sur chambres de Bürcker.	42
3.2.2. Méthode au cristal violet.	42

4. EFFET DU TNF SUR LA LIAISON DES <sup>125</sup> I-LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE	43
4.1. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL en fonction de leur concentration dans le milieu de culture	43
4.2. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL en fonction du temps d'incubation avec les <sup>125</sup> I-LDL	44
4.3. Effet du TNF sur la liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales	44
4.3.1. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales endothéliales en fonction de la concentration en TNF dans le milieu de culture	44
4.3.2. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales en fonction de la durée de préincubation avec le TNF	46

## **DISCUSSION**

1. TEST DE CYTOTOXICITE DU TNF	47
1.1. Mesure de l'activité de la LDH dans le milieu additionné de sérum (NBS) en concentration croissante	47
1.2. Essai de mesure du pourcentage et de l'activité LDH libérée dans le milieu par les cellules endothéliales incubées avec différentes concentrations de TNF	47
1.3. Mesure du pourcentage d'activité de LDH libérée dans le milieu par les cellules endothéliales sous l'action du TNF	48
1.3.1. Durée d'incubation : 2 heures	48
1.3.2. Durée d'incubation : 24 heures	50
1.3.3. Durée d'incubation : 48 heures	50
1.4. Conclusion des tests de cytotoxicité	51
2. EFFET DU TNF SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE	52
2.1. Effet du TNF sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules endothéliales	52
2.2. Estimation de l'effet du TNF sur la prolifération de cellules endothéliales par quantification de cellules	53
2.2.1. Méthode par comptage de cellules sur chambres de Bürcker	53
2.2.2. Méthode au cristal violet	53
2.3. Conclusions des tests de prolifération	54

<b>3. EFFET DU TNF SUR LA LIAISON DES LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE A 4°C</b>	<b>55</b>
3.1. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales en fonction de leur concentration dans le milieu de culture	55
3.2. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales en fonction du temps d'incubation avec les <sup>125</sup> I-LDL	55
3.3. Effet du TNF sur la liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales	56
3.3.1. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en TNF dans le milieu	56
3.3.2. Liaison des <sup>125</sup> I-LDL aux cellules endothéliales en fonction de la durée de préincubation avec le TNF	57
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	
A. CONCLUSION GENERALE DU TRAVAIL ET PERSPECTIVES	60
B. IMPLICATIONS DU TNF ET D'AUTRES CYTOKINES DANS LA FORMATION DES LESIONS ATHEROSCLEREUSES: DONNEES RECENTES	62

# INTRODUCTION GENERALE

## 1. L'ATHEROSCLEROSE

Près de la moitié de la population des pays industrialisés meurt des conséquences de l'athérosclérose. Cette maladie des artères se développe lentement et insidieusement dès le plus jeune âge et chez la plupart des gens, elle débouche sur de dangereuses complications souvent à partir de quarante ans et plus. L'athérosclérose est la principale cause d'infarctus du myocarde et d'infarctus cérébraux. De plus, elle perturbe l'activité normale d'un individu et entraîne des dommages socio-économiques importants.

### 1.1. Définition (Capron, 1983)

En 1958, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une définition purement descriptive de l'athérosclérose et qui, en cela, demeure la seule acceptable: "l'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre. Elle consiste en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modifications de la média".

### 1.2. Les lésions de l'athérosclérose (Capron, 1983; Ross, 1986)

Les **stries lipidiques** sont les lésions les plus précoces de l'athérosclérose; on les trouve dès l'enfance dans l'aorte et les artères carotides. Ce sont des taches jaunâtres qui font légèrement saillie dans la lumière artérielle. Ces lésions sont strictement localisées à l'intima. Elles sont constituées de lipophages (macrophages chargés de lipides) et de cellules musculaires lisses sous-jacentes également remplies de lipides. Ces cellules riches en lipides sont regroupées sous le terme général de "**cellules spumeuses**" (foam cells). L'espace extracellulaire contient également des amas graisseux.

La strie lipidique évoluera en **plaque athéroscléreuse non compliquée ou plaque fibreuse**. Avec cette lésion commence l'athérosclérose proprement dite. En effet, contrairement à la strie lipidique qui n'est pas en elle-même susceptible d'entraîner des complications cliniques, la plaque fibreuse peut se compliquer c'est-à-dire provoquer des accidents cliniques principalement à caractère ischémique. La plaque fibreuse est un épaississement de l'intima qui est constitué d'une enveloppe fibreuse entourant un centre graisseux. Ces deux composantes sont toujours présentes mais leur importance relative est très variable d'une plaque à l'autre. Le terme "**athérosclérose**" décrit bien ce double aspect; il regroupe les deux caractères fondamentaux des lésions: l'**athérome**, d'une part, qui désigne la bouillie graisseuse formant le centre de la lésion et la **sclérose**, d'autre part, qui rend compte de l'armature fibreuse qui délimite la lésion et la sépare de la média.

Le tissu fibreux est composé de collagène, de GAGs, d'élastine et de fibrine. On y trouve des cellules musculaires lisses dont la morphologie est altérée.

Le centre athéromateux est constitué de lipides (esters de cholestérol, cholestérol libre, phospholipides) contenus dans les cellules spumeuses et dans l'espace extracellulaire. La présence de nombreux débris cellulaires indique qu'une bonne proportion des lipides extracellulaires proviennent de la dégénérescence des cellules spumeuses.

Suite à une ulcération de la plaque, la bouillie athéromateuse peut être libérée dans la lumière du vaisseau et provoquer une embolie.

La couverture endothéliale de la plaque peut être interrompue par une ulcération provoquant ainsi une diminution de la thromborésistance de la paroi artérielle menant à la formation d'un thrombus par aggrégation plaquettaire et l'édification d'un réseau de fibrine (thrombose). Ce réseau peut aussi grossir jusqu'à obstruer l'artère: c'est l'occlusion thrombotique.

### 1.3. Les hypothèses de l'athérogenèse

#### 1.3.1. Les hypothèses anciennes (Capron 1983)

En 1852, Karl von Rokitansky propose la théorie de l'incrustation selon laquelle l'athérosclérose résulte d'un dépôt sur l'intima de substances dérivées du sang (protéines plasmatiques) en particulier, la fibrine. La dégénérescence de ces dépôts aboutit à la formation de plaques.

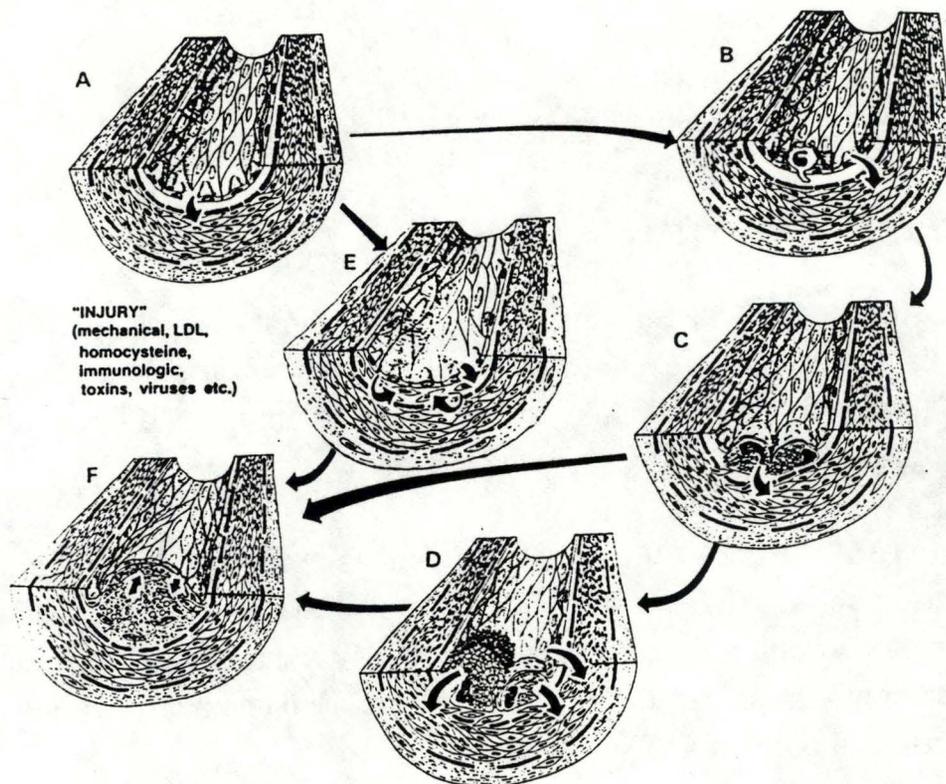
En 1856, Rudolf Virchow propose la théorie de l'inflammation. L'athérosclérose résulte d'une inflammation de l'intima artérielle. Il fait appel à 2 mécanismes: l'initiation mécanique due à l'ondée sanguine et l'infiltration dans l'intima de composants sanguins. Pour Virchow, l'inflammation est une réponse réparatrice de la paroi artérielle irritée.

En 1913, Anitschow établit un premier modèle expérimental de l'athérosclérose: en administrant à des lapins du cholestérol dissous dans de l'huile de tournesol, il provoque des lésions artérielles ressemblant à l'athérosclérose. Cette observation établit un lien entre l'athérosclérose et les anomalies lipidiques et désigne le cholestérol comme un des agents possibles de la séquence infiltration-irritation-inflammation de Virchow.

En 1946, John Bright Duguid propose que la thrombose joue un rôle de premier plan dans l'athérogenèse. Il est fidèle à la théorie de Rokitansky.

Benditt et Benditt en 1973 suggèrent que la lésion athéroscléreuse constitue une tumeur bénigne issue d'une cellule musculaire lisse unique provenant de la média, cette cellule ayant subi l'influence de facteurs tels que des virus ou des agents chimiques. Il s'agit de l'hypothèse monoclonale.

De Duve et ses collaborateurs (1974) ont proposé l'hypothèse lysosomale selon laquelle une incapacité des lysosomes par insuffisance enzymatique à hydrolyser les esters de cholestérol pourrait aboutir à une accumulation de cholestérol estérifié dans les lysosomes et aussi, par réduction de l'autophagie dans le cytoplasme.



**Fig. 1:** Hypothèse de la réponse à la lésion de l'endothélium (Ross, 1986)

N.B. les lettres (A à F) renvoient aux explications qui se trouvent dans le paragraphe. 1.3.2. A.de l'introduction.

### 1.3.2. Les hypothèses récentes

#### A. Hypothèse de la réponse à la lésion de l'endothélium

Cette hypothèse émise par Ross et Glomset en 1976 a fait l'objet d'une mise à jour en 1986 (Ross, 1986). D'après cette hypothèse une lésion de l'endothélium (mécanique, par hypercholestérolémie, par des toxines, par des virus, immunologique..) est à la base du processus athérogénique.

Au moins deux voies peuvent mener à la formation des lésions athéroscléreuses avancées (voir figure 1).

La première a été observée expérimentalement en cas d'hypercholestérolémie induite. L'hypercholestérolémie provoque une lésion de l'endothélium (A) qui induit la production de facteurs de croissance par les cellules endothéliales. Des monocytes adhèrent (B) alors à l'endothélium et migrent (C) dans l'espace sous endothélial où ils participent à la formation de la strie lipidique (le macrophage est le type cellulaire prédominant de cette lésion précoce).

Ces macrophages libèrent des facteurs de croissance tels que le PDGF. La strie lipidique peut évoluer directement en plaque athéroscléreuse (flèche de C à F) grâce aux facteurs de croissance libérés par les macrophages et/ou les cellules endothéliales. Ces facteurs de croissance provoquent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses depuis la média vers l'intima. Les macrophages peuvent aussi stimuler et léser l'endothélium. Ainsi dans certains cas les macrophages et le tissu conjonctif sous endothélial peuvent être mis à nu par détachement de l'endothélium. Les plaquettes adhèrent directement au tissu sous endothélial et s'aggrègent. Les plaquettes activées constituent, outre les macrophages et les cellules endothéliales, une troisième source de facteurs de croissance (PDGF, EGF..) pour les cellules musculaires lisses. Certaines parmi celles-ci peuvent stimuler leur croissance par voie autocrine (F).

La seconde voie de développement des lésions athéroscléreuses avancées débute par une lésion non morphologique de l'endothélium, c'est-à-dire que celui-ci reste intact (flèches de A à F en passant par E).

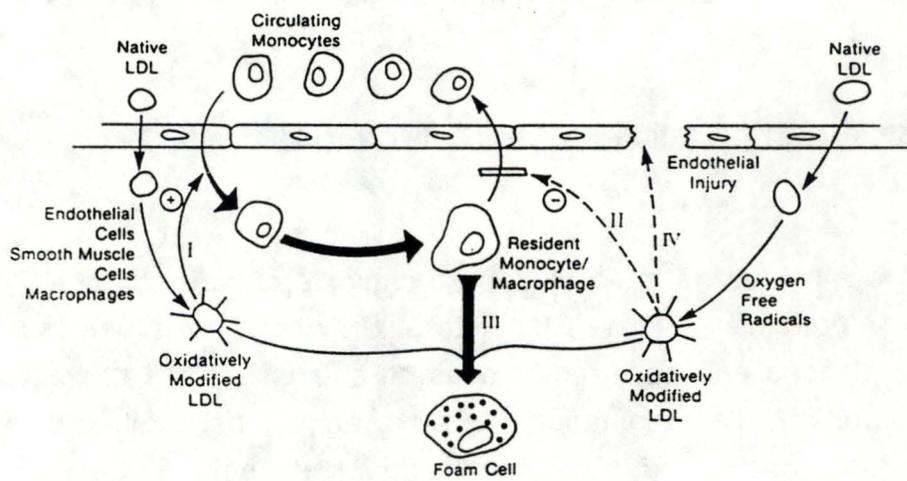
Par contre, les cellules endothéliales sont perturbées physiologiquement. Une production importante (E) de facteurs de croissance résulte d'un turnover exacerbé. Cela peut stimuler la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Une production endogène de PGDF par les cellules musculaires accompagne ce phénomène. Les interactions peuvent mener à la formation d'une plaque fibreuse (et à la progression de la lésion).

#### B. Hypothèse de l'infiltration liquide (Brown et Goldstein, 1977; Kovanen, 1985)

Grâce à l'étude de la régulation du cholestérol (voir chapitre 2) et de l'hypercholestérolémie familiale Goldstein et Brown ont émis une hypothèse quant aux relations entre des taux élevés de cholestérol et l'athérosclérose. Ils ont montré que l'augmentation du taux sanguin des LDL (et donc de cholestérol) pouvait être due à une diminution du nombre de récepteurs sanguins pour ces LDL. Brown et Goldstein ont montré que les macrophages possédaient des récepteurs reconnaissant des LDL ayant subi des modifications chimiques (acétylation notamment) au niveau de leur apoprotéine. Ces récepteurs "scavenger" ne possèdent pas de contrôle en retour contrairement aux récepteurs pour LDL des autres cellules. Si la concentration en LDL est élevée, cette absence de contrôle peut provoquer une accumulation de cholestérol importante dans les macrophages, transformant ces derniers en cellules pumeuses.

#### C. L'hypothèse du stress oxydant (Steinberg, 1987a; Steinberg, 1987b)

Steinberg et ses collaborateurs ont émis une hypothèse qui, dans la lignée des travaux de Goldstein et Brown, relie l'élévation du taux de LDL plasmatique à l'athérosclérose.



**Fig. 2:** Hypothèse du stress oxydant (Steinberg, 1987b).

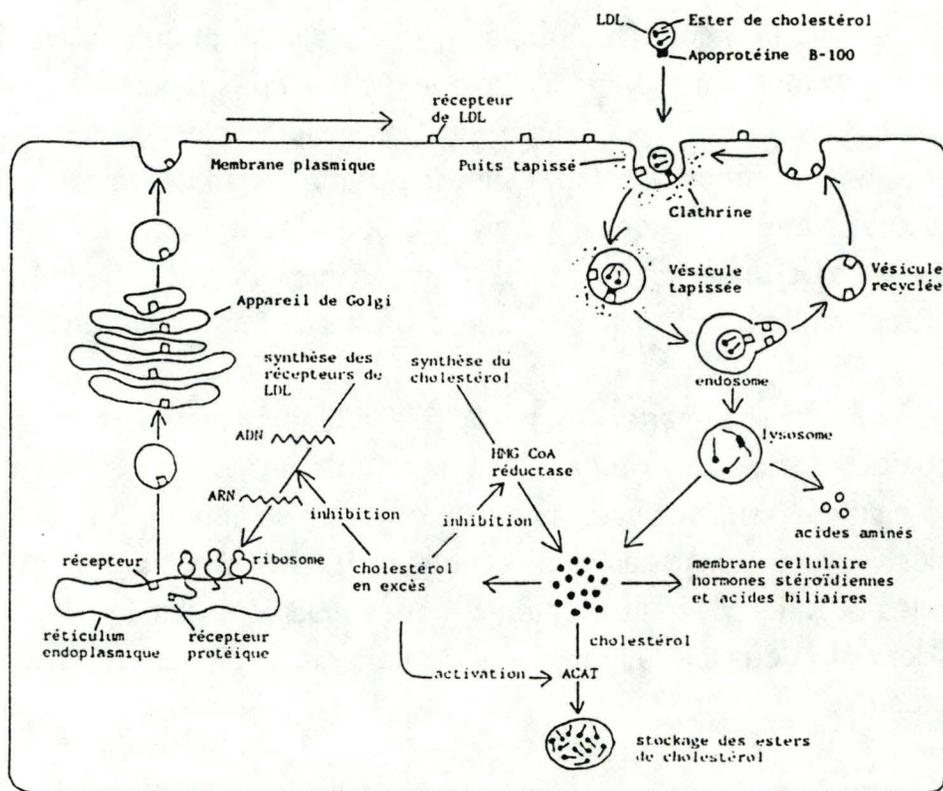
N.B. les chiffres romains renvoient aux explications du paragraphe 1.3.2.C. de l'introduction.

Henriksen *et al.* (1981), du laboratoire de Steinberg, ont montré que des cellules endothéliales en culture, incubées avec des LDL, modifient ces dernières de manière importante tant au niveau de leurs propriétés physiques qu'au niveau de leur composition biologique. Des études ultérieures, menées par l'équipe de Steinberg, ont montré que les cellules musculaires lisses et les macrophages modifient les LDL de la même manière et que les transformations des LDL sont oxydatives. Sous l'action de radicaux libres oxygénés, les LDL subissent des peroxydations lipidiques, des hydrolyses en position 2 de la phosphatidylcholine, une dégradation importante de l'apo B.

Au niveau du comportement biologique, le changement le plus frappant est le taux de capture élevé de ces LDL modifiées par les macrophages, par rapport à celui des LDL natives. Les LDL oxydées se lient en majorité (mais pas exclusivement) au niveau des récepteurs "scavengers" comme c'est le cas pour les LDL acétylées et les autres formes modifiées chimiquement. Les LDL oxydées sont dès lors athérogènes contrairement aux LDL natives qui le sont très peu.

Les LDL modifiées oxydativement peuvent favoriser l'athérogenèse selon deux mécanismes. Les LDL oxydées sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales et d'autres cellules en culture; Palinsky *et al* (1989) ont montré que les LDL subissaient des modifications oxydatives *in vivo* ; il est possible qu'*in vivo* elles induisent des lésions endothéliales. Un second mécanisme concerne la mobilité des macrophages et des monocytes. Les LDL oxydées ont la capacité d'inhiber la mobilité des macrophages (Quinn *et al.*, 1985). Cependant, elles n'inhibent pas celle des monocytes. De plus, elles sont chémotactiques pour les monocytes (Quinn *et al.*, 1987).

L'hypothèse de Steinberg est la suivante (voir figure 2): un taux de LDL plasmatiques accru va promouvoir une infiltration plus importante de LDL dans l'intima. Les LDL pénétrant dans la paroi artérielle subissent des modifications par oxydation. Les LDL modifiées ont un effet chémoattractif (I) sur les monocytes qui sont dès lors attirés dans l'intima et s'y accumulent. Ils deviennent des macrophages. Les LDL oxydées inhibent (II) les déplacements de ces macrophages et constituent ce que l'on pourrait appeler un "piège attractif" pour les monocytes/macrophages. De plus,



**Fig. 3:** Régulation du cholestérol cellulaire (Fruchart, 1988).

comme les LDL modifiées sont capturées avec avidité par les macrophages ceux-ci se chargent d'esters de cholestérol et deviennent des cellules spumeuses. Une strie lipidique apparaît. Cette hypothèse ne requiert pas la présence d'une lésion endothéliale.

## 2. LA REGULATION DU CHOLESTEROL CELLULAIRE

(Capron, 1983; Goldstein et Brown, 1985; Goldstein et Brown, 1987)

Le cholestérol est un composant structural important de la membrane plasmique. Il est absolument essentiel pour la survie et la croissance cellulaire. Cependant, des quantités excessives de cholestérol peuvent être létales lorsqu'elles se déposent dans la paroi artérielle, contribuant ainsi à l'athérosclérose. Un mécanisme très fin s'est donc établi au niveau cellulaire pour réguler le métabolisme du cholestérol. Goldstein et Brown ont décrit ce mécanisme qui fait appel à l'endocytose médiée par récepteur.

### Mécanisme de régulation (voir figure 3)

Le cholestérol plasmatique est transporté à raison de 60 à 70% par les LDL. Les cellules mammaliennes possèdent des récepteurs glycoprotéiques pour les LDL. Les LDL se lient à leur récepteur au niveau d'un puits recouvert de clathrine (coated pit). Le puits s'invagine pour former une vésicule recouverte. L'enveloppe de clathrine se dissocie laissant une vésicule à surface lisse. Plusieurs vésicules de ce type fusionnent pour former un endosome dont le pH est plus bas que celui du cytoplasme. Sous l'influence de ce pH acide, les LDL se dissocient de leur récepteur. Les récepteurs sont alors recyclés en se regroupant dans une région de l'endosome formant une vésicule qui va fusionner avec la membrane plasmique.

L'autre partie de l'endosome contenant les LDL fusionne avec un lysosome. Les LDL sont dégradées. L'apoprotéine B (partie protéique des LDL) est digérée par protéolyse en acides aminés. Les esters de cholestérol en excès sont hydrolysés en cholestérol et acide gras par la cholestérylestérase acide (CEA).

Le cholestérol libre passe dans le cytoplasme où il peut suivre trois voies métaboliques. La voie principale (1) d'utilisation du cholestérol est la fabrication des membranes. Le cholestérol en excès peut être (2) soit exporté de la cellule en étant intégré à une molécule de HDL (high density lipoprotein) après réestérification par une enzyme membranaire, la lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT), soit (3) emmagasiné dans le cytoplasme sous forme d'esters de cholestérol après réesterification par une enzyme cytoplasmique, l'acyl coenzyme A cholestérol acyl transférase (ACAT). Ces esters de cholestérol mis en réserve peuvent être utilisés par la cellule après une hydrolyse qui relibère le cholestérol.

En temps normal, ce système est équilibré. La liaison des LDL à leur récepteur :

1) supprime la synthèse endogène du cholestérol en inhibant l'enzyme régulatrice, la 3-hydroxyl-3-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase (HMG CoA réductase).

2) stimule l'ACAT

3) inhibe la synthèse des récepteurs pour le LDL.

De cette manière, les cellules reçoivent le cholestérol dont elles ont besoin et le cholestérol ne s'accumule pas dans les lysosomes ni dans le cytoplasme.

### **3. ENDOTHELIUM ET CELLULES ENDOTHELIALES**

#### **3.1. L'endothélium**

L'endothélium est constitué d'une monocouche de cellules pavimenteuses, les cellules endothéliales. Il tapisse la surface luminale des tissus circulatoires à l'interface entre le sang et les tissus vasculaires. La surface totale des cellules endothéliales humaines couvre plus de 1000 m<sup>2</sup> (Jaffe, 1985). Chez un homme adulte, le volume total des cellules endothéliales est comparable à celui du foie et pèse 1,5 à 2 kg (Hammersen et Hammersen, 1985).

La structure de l'endothélium peut varier suivant la localisation dans les différents organes. On distingue généralement trois types d'endothélium :

- 1) l'endothélium continu.
- 2) l'endothélium fenestré.
- 3) l'endothélium discontinu ou sinusoïde

Les cellules endothéliales des artères, des veines et des capillaires varient au point de vue de leur morphologie, de leur ultrastructure et de leur biochimie. Elles possèdent cependant des caractéristiques communes: un rapport surface/volume élevé, un métabolisme intense, une exposition continue de leur surface au sang circulant et à ses multiples constituants.

### 3.2. Les cellules endothéliales

#### 3.2.1. Description

La cellule endothéliale est allongée (25-50  $\mu\text{m}$ ) dans le sens du flux sanguin et sa largeur oscille entre 10 et 15  $\mu\text{m}$ . Dans les capillaires et les veines, leur épaisseur est de 0,1  $\mu\text{m}$ , tandis qu'au niveau de l'aorte, elle varie de 3  $\mu\text{m}$  au centre à 1  $\mu\text{m}$  à la périphérie de la cellule.

La cellule endothéliale contient un noyau ovoïde avec un ou plusieurs nucléoles entouré d'un cytoplasme riche en organites habituels des cellules eukaryotiques: mitochondries, lysosomes, réticulum endoplasmique lisse et rugueux, appareils de Golgi, corps multivésiculaires (Haudenschild, 1984; Pittilo, 1988).

Cependant, on trouve un organite particulier, spécifique des cellules endothéliales, le corps de Weibel-Palade (Weibel et Palade, 1964). C'est un organite en forme de bâton, de 3  $\mu\text{m}$  de long sur 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre, qui contient de nombreux tubules fins d'environ 15 nm d'épaisseur arrangés parallèlement au grand axe. Ces organites se retrouvent dans l'endothélium de plusieurs organes humains, mais leur concentration varie. On n'en trouve pas dans les cellules endothéliales bovines (Jaffe, 1984a). Ces corps de Weibel-Palade contiennent le précurseur du facteur VIII de coagulation.

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

Les faces lumineuses, ablumineuses et latérales diffèrent dans leurs caractéristiques structurales.

La face luminale forme de nombreuses petites vésicules. Elle est recouverte d'un "coat" constitué de GAGs, d'oligosaccharides, de glycoprotéines, de glycolipides et de sialoconjugués. Des protéines s'adsorbent sur cette surface: l'alpha-2 macroglobuline, la lipoprotéine lipase, la fibrine, le fibrinogène et l'albumine. La membrane porte des charges négatives qui tendent à repousser les cellules sanguines dont les plaquettes, ce qui contribue au caractère thromborésistant de l'endothélium. De plus, une série d'inhibiteurs de la coagulation tels l'antithrombine II, l'héparine cofacteur II, les protéines C et S, sont adsorbées à la surface de la cellule.

La face abluminale comprend moins de puits recouverts (coated pits) et de vésicules que la face luminale. On y trouve un nombre important de filaments qui servent à l'ancrage des cellules à la matrice de l'intima.

Au niveau des faces latérales, il existe des jonctions cellulaires de deux types: les "tight junctions" qui sont des zones d'attaches entre deux cellules endothéliales jointives et les "gap junctions" qui sont des jonctions de communication entre cellules adjacentes.

Les cellules endothéliales humaines peuvent être identifiées par la détection du "F VIII related antigen" (=Factor VIII: von Willebrand Factor) par immunofluorescence et par la recherche en microscopie électronique des corps de Weibel-Palade (Jaffe, 1984a).

Transport barrier	Material exchange regulated via several pathways Transport decreases sharply with increased molecular size Charge affects permeability. Anionic molecule transport usually restricted but not in lungs. Brain barrier differs
Synthesis of connective tissue components	Collagen, fibronectin, thrombospondin, laminin, chondroitin- dermatan- and heparan sulfates, possibly heparin. Also enzymes affecting connective tissue components, such as elastase, collagenases, Elastin Extracellular matrix
Metabolic properties	Bind lipoprotein lipase. Receptors for LDL, HDL, chyle, acetyl LDL. Modify LDL. Bind insulin. Have ACE, which converts angiotensin I to angiotensin II Inactive bradykinin, norepinephrine, adenosine Modulate effect of acetylcholine. Contain xanthine oxidase. Eicosanoid formation (both cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acids). Target for eicosanoids. In lung EC carbonhydrase increases carbon dioxide release. Inflammatory effects Histaminase—intestinal EC Superoxide dismutase on EC surface
Procoagulant properties	Synthesizes vWF. Factor V, activates Factor XII, site for prothrombinase complex Secretes tissue factor. Effects of IL-1. Binds Factors IXa, VIIa. Binds HMWK Synthesizes Factor VIII Activated Hageman Factor
Anticoagulant properties	Synthesizes heparin-like heparan sulfate, thrombomodulin, protein S, PGI <sub>2</sub> Activates protein C. With AT III inactivates thrombin. Intracellular VAC Inhibits monocyte procoagulant activity. Synthesis of AT III
Fibrinolysis	Secretes both t-PA and u-PA Secretes inhibitor of plasminogen activation
Reactions with blood cells	PMN leukocyte and monocyte adhesion. Generate inhibitor of WBC adhesion. Dual IL-1 effects. Complement action Synthesize WBC and macrophage colony-stimulating activity Bone marrow EC stimulate hematopoietic progenitor cells
Vascular tone	Secretes relaxing factor (EDRE or nitric oxide) EC contractile proteins. Thrombin may cause contraction of damaged EC PGI <sub>2</sub> ACE
Growth factors	Inhibition of SMC growth via secretion of heparan sulfate. Secrete ECGF. Angiogenesis Endothelialize vascular prostheses, transplants, repair intimal lesions Secrete PDGF
Immunologic properties	Contain HLA-A and B antigens. Ia antigens on cell surface stimulated by gamma interferon or activated T cells Platelet alloantigens (GPIIb and IIIa) synthesized Augment IL-2 Production by T Cells

LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; ACE: angiotensin-converting enzyme; vWF: von Willebrand factor; HMWK: high molecular weight kininogen; VAC: factor V activator; WBC: white blood cells; ECGF: endothelial cell growth factor.

**Tableau 1:** Fonctions des cellules endothéliales (Engelberg, 1989).

### 3.2.2. Fonctions

L'endothélium peut être considéré comme un tissu dispersé qui assume de nombreuses fonctions (voir tableau 1). Les fonctions principales sont:

#### A. La perméabilité sélective

Par sa position particulière, l'endothélium est une importante zone d'échanges moléculaires entre le sang et le liquide interstitiel des tissus sous-endothéliaux. Le transport des macromolécules plasmatiques à travers l'endothélium dépend de trois grands groupes de facteurs: (1) les forces plasmatiques comme la pression hydrostatique et la pression oncotique; (2) les propriétés physicochimiques des molécules transportées, comme la taille, le PM, la forme, la nature chimique, la concentration; (3) les propriétés et activités des cellules endothéliales.

La surface de la cellule endothéliale est différenciée en microdomaines résultant d'une répartition hétérogène des sites anioniques, des GAGs, des sialoconjugués et des résidus monosaccharidiques. Si Par exemple, il y a peu de sites anioniques aux sites d'invagination de la membrane pour la transcytose (Simionescu, 1988). Les molécules citées forment un "coat" (glycocalyx) qui joue un rôle de tamis (non seulement au niveau de la taille mais aussi de la charge) et qui possède également des sites de liaisons spécifiques pour des protéines plasmatiques (Simionescu, 1988; Engelberg, 1989).

La surface luminale présente des récepteurs pour de nombreuses molécules plasmatiques: les LDL, les LDL acétylées, les chylomicrons, l'angiotensine, l'insuline, l'acétylcholine, la sérotonine, l'histamine, des kinines et la thrombine (Engelberg, 1989).

Il y a parmi ces récepteurs, des récepteurs endocytiques qui transportent, via des vésicules, les molécules vers le compartiment lysosomal où elles sont libérées dans le liquide interstitiel. Les vésicules de transcytose peuvent former des canaux transendothéliaux de 20 à 40 nm de diamètre en fusionnant. Les deux types de mécanismes concernent par exemple, les LDL, les  $\beta$  VLDL, l'insuline et la transferrine (Simionescu, 1988). Le phénomène de transcytose est actuellement controversé.

B. L'hémostase : fonctions procoagulantes et anticoagulantes (Jaffe, 1985 ; Wehrmacher, 1988)

Les cellules endothéliales synthétisent le facteur VIII:vWF (Jaffe, 1984b). Lorsque l'endothélium est endommagé, les plaquettes adhèrent au facteur VIII:vWF associé aux cellules endothéliales, ainsi qu'au collagène et aux microfibrilles du sous-endothélium. Cette adhésion active les plaquettes qui, par la cascade de l'acide arachidonique, forment la PGG<sub>2</sub> et du TXA<sub>2</sub>. Ce dernier accélère le processus de coagulation et est un puissant vasoconstricteur.

En temps normal, les cellules endothéliales produisent de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) qui est un puissant inhibiteur de l'aggrégation plaquettaire et un vasodilatateur. La PGI<sub>2</sub> agit sur le récepteur adénylcyclase des plaquettes et induit la production d'AMPc; celle-ci inhibe, non seulement le relarguage des granules plaquettaires, mais aussi l'aggrégation qui pourrait être induite par l'ADP et le fibrinogène.

Les cellules endothéliales libèrent aussi un activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) qui convertit le plasminogène (PAI) produit par les cellules endothéliales.

L'endothélium produit (facteur V) et active (facteur XII) d'autres facteurs de coagulation.

On voit que l'endothélium remplit son rôle important dans l'hémostase en intervenant dans deux types de systèmes qui se contrebalancent: les facteurs procoagulants et les facteurs anticoagulants.

### C. La réponse immunitaire

Les cellules endothéliales humaines possèdent des antigènes HLA-A, B et du groupe ABO. Par contre, seulement un faible pourcentage des cellules endothéliales non stimulées contiennent des antigènes Ia. Cependant, lorsqu'elles sont stimulées par de l'IFN  $\gamma$  ou par des cellules T activées, il y a induction d'antigènes Ia à la surface de chacune d'elles. Cette observation, parmi d'autres, fait penser que les cellules endothéliales peuvent servir de cellules présentatrices d'antigènes (Jaffe, 1985).

Les cellules endothéliales libèrent aussi des cytokines qui interviennent dans l'immunité (GM-CSF, IL-1,...).

### D. Synthèse du tissu conjonctif et de la membrane basale

La cellule endothéliale synthétise différents types de collagène (variant selon le type de cellules) dont le collagène IV caractéristique de la membrane basale. Elle fabrique aussi de la laminine, de la fibronectine, de la thrombospondine, de l'élastine et des microfibrilles. Ces molécules interviennent dans la constitution de la membrane basale et du tissu conjonctif. Elle produit également du "fibroblast growth factor" (FGF) et stimule la synthèse de GAGs par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Jaffe, 1985 ; Engelberg, 1989).

Il existe des liens transmembranaires entre le cytosquelette de la cellule endothéliale et la matrice extracellulaire. Il y a un coalignement entre les filaments de la cellule et la fibronectine extracellulaire. On considère généralement l'adhésion des cellules endothéliales comme un processus qui implique la reconnaissance de composants de la matrice extracellulaire par des récepteurs de la surface cellulaire (des protéines intégrales) qui sont associés aux filaments du cytosquelette. Les arrangements de celui-ci permettraient l'étalement de la cellule par interaction avec la fibronectine (Wehrmacher, 1988).

### E. Régulation du tonus vasculaire (Herman, 1990)

Toute une série de substances vasodilatatrices telles que l'acétylcholine, l'ADP et l'ATP, la substance P, la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, la thrombine et la noradrénaline induisent une relaxation endothélio-dépendante en stimulant des récepteurs spécifiques présents sur les cellules endothéliales. La présence de celles-ci est indispensable pour que les substances citées entraînent une vasodilatation. En fait, sous l'influence de ces molécules, elles libèrent un vasodilatateur particulier: l'endothélium derived relaxing factor (EDRF).

L'EDRF agit en stimulant la guanylate cyclase des cellules musculaires lisses, ce qui se traduit par une augmentation de la production du GMPc. Ce dernier stimule à son tour la protéine kinase GMPc-dépendante, enzyme présente de la phosphorylation des protéines et une déphosphorylation des chaînes légères de la myosine, ce qui entraîne une relaxation. L'EDRF pourrait aussi agir en créant une hyperpolarisation de la membrane cellulaire induite par une augmentation du flux de  $K^+$ . On a pu identifier l'EDRF comme étant le monoxyde d'azote (NO).

Un dysfonctionnement ou une lésion de l'endothélium s'accompagne d'une altération des relaxations endothélio-dépendantes. L'EDRF inhibe l'aggrégation plaquettaire et potentialise l'effet de la PGI<sub>2</sub>. L'EDRF pourrait jouer un rôle dans l'athérosclérose. Une lésion de l'endothélium telle qu'on en observe en cas d'athérosclérose, pourrait favoriser la survenue de vasospasmes et/ou une occlusion du vaisseau sanguin.

### 3.2.3 Croissance des cellules endothéliales

*In vitro*, les cellules endothéliales provenant de la veine ombilicale, croissent à partir de petits agrégats qui grandissent jusqu'à se rejoindre. Arrivées à la confluence, les cellules endothéliales sont polygonales et étroitement accolées. Elles constituent une monocouche. A ce moment, les cellules ne répondent plus aux facteurs de croissance du sérum et arrêtent leur division : c'est l'inhibition de contact (Haudenschild et al., 1984).

Les cellules endothéliales en culture produisent un matériel extracellulaire, composé spécialement de collagène. Elles sont étroitement liées à cette matrice qui les entoure et sur laquelle elles migrent et prolifèrent (Sage, 1984).

*In vitro*, il a été montré que l'Epidermal Growth Factor (EGF), le Fibroblast Growth Factor (FGF), le Transforming Growth Factor (TGF), l'Endothelial Cell Growth Factor (ECGF), stimulent la croissance des cellules endothéliales (Merziag et al, 1984 ; Risau, 1990).

*In vivo*, chez l'adulte, le "turnover" des cellules endothéliales est très lent en conditions physiologiques normales. En effet dans ces conditions, l'endothélium est constitué de cellules endothéliales jointives sujettes à l'inhibition de contact comme dans le cas d'une monocouche confluyente en culture.

Cependant dans certaines situations telles que la cicatrisation d'une blessure, la croissance d'une tumeur, ou pendant le développement embryologique, les cellules endothéliales prolifèrent rapidement sous l'action de facteurs de croissance et participent au processus d'angiogenèse c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Risau W., 1990).

## 4. LES CYTOKINES

### 4.1. Introduction

Les **cytokines** sont des (glyco)protéines de nature non immunoglobulinique et non endocrinienne qui affectent souvent localement le fonctionnement d'autres cellules du même organisme. Elles agissent notamment dans les domaines de l'hématologie et de l'immunologie.

Les cytokines sont divisées en deux grands groupes selon leur source cellulaire:

- 1) les **lymphokines** qui sont produites par les lymphocytes.
- 2) les **monokines** qui sont produites par les monocytes/macrophages.

Toutefois d'autres types cellulaires synthétisent des cytokines: les cellules endothéliales, les kératinocytes, les plaquettes...

Le terme cytokine recouvre une grande variété de molécules comprenant les "colony stimulating factors", les interleukines, les interférons, les "tumor necrosis factors alpha et beta" (Stryckmans, 1991) et les "growth factors" (Nathan et Sporn, 1991).

### 4.2. Les propriétés générales des cytokines

(cours de compléments d'immunologie, seconde licence, Letesson)

a) Les cytokines sont des polypeptides généralement glycosylés de faible PM (15 à 25 kDa en moyenne).

b) Les cytokines sont actives à de faibles concentrations ( $10^{-12}$  à  $10^{-9}$  M).

c) Les cytokines sont actives généralement localement sur les cellules voisines de la source (contrairement aux hormones endocriniennes). On parle d'activité paracrine voire même autocrine. Cette action localisée, est due entre autres à la courte demi-vie de ces médiateurs. Cela permet d'éviter des effets indésirables à distance de leur lieu de synthèse.

d) Les cytokines sont synthétisées *de novo* en réponse à un stimulus adéquat. Elles ne sont pas préformées et stockées dans des granules en

attendant d'être libérées, comme dans le cas de neurotransmetteurs classiques.

e) Le nombre de récepteurs pour les cytokines exprimés par cellule est d'un ou deux ordres de grandeur moindre (quelques centaines ou milliers par cellule) que celui des hormones endocriniennes.

f) Chaque cytokine a de nombreuses activités différentes. On parle dans ce cas de **pléiotropie** des cytokines.

g) L'effet engendré par une cytokine dépend étroitement à la fois de l'état de différenciation de la cellule cible mais aussi de la concentration effective de cette cytokine dans l'environnement local.

Plusieurs points rendent l'étude des cytokines complexe:

- Le phénomène de redondance: plusieurs cytokines médient le même effet ou des effets similaires.
- Les cytokines influencent la production des autres cytokines et provoquent de véritables cascades cytokiniques.
- Un même type cellulaire peut synthétiser de nombreuses cytokines différentes.

Plusieurs progrès techniques majeurs ont permis d'y voir un peu plus clair:

- L'établissement de lignées cellulaires (normales ou cancéreuses) qui servent de sources de l'activité ou qui répondent à une seule activité.
- Les progrès dans le domaine des séparations et purifications biochimiques (ex: HPLC).
- la production d'anticorps monoclonaux spécifiques des cytokines et de leurs récepteurs.
- Le développement de la biologie moléculaire a permis l'obtention de cDNA de nombreuses cytokines et de produire celles-ci sous forme recombinante en quantité appréciable permettant de tester leurs effets tant *in vitro* que *in vivo*.

## 5. LE TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

Au siècle passé, on a rapporté plusieurs cas de patients cancéreux qui, ayant subi de graves infections, présentaient une régression de leurs tumeurs, et parfois même guérissait complètement.

Au début de ce siècle, W.B. Coley, un médecin de New York, a traité avec succès des patients cancéreux avec plusieurs extraits de culture de bactéries Gram négatives et positives .

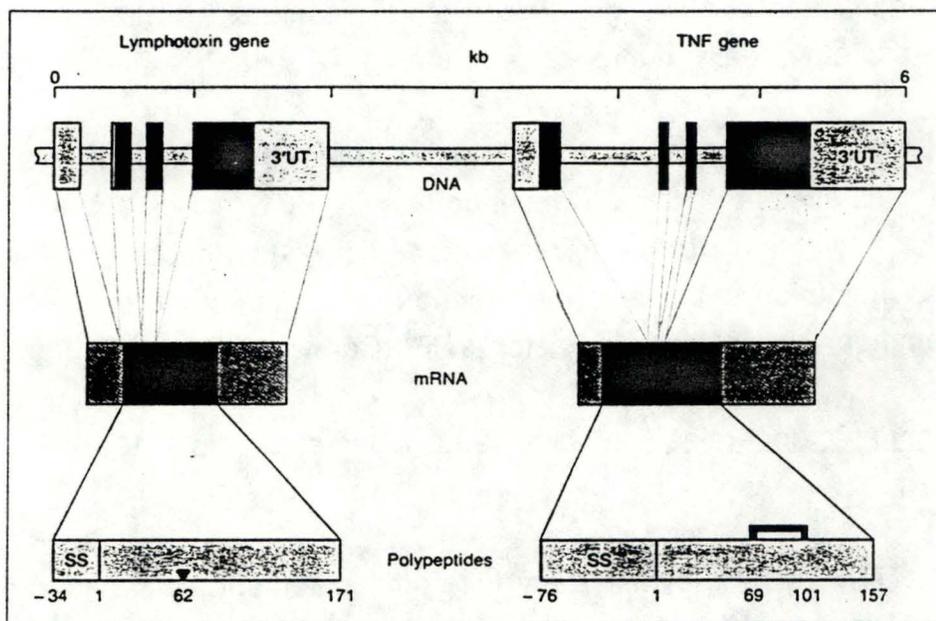
En 1975, L. Old et ses collègues montrèrent que le traitement de souris ou de lapins avec le Bacille de Calmette-Guérin (BCG) suivi 10 à 14 jours plus tard d'une injection de lipopolysaccharides (LPS), provoquait la libération dans la circulation d'une protéine contribuant à la nécrose des tumeurs: ils l'ont nommée Tumor Necrosis Factor (TNF) (Carswell et al., 1975).

### 5.1. Propriétés générales (Hamblin, 1988; Wong et Goeddel, 1989; Fiers et al., 1991)

Le TNF est une cytokine produite principalement par les macrophages activés. D'autres cellules le synthétisent dont notamment les lymphocytes T activés et les mastocytes. Il est impliqué activement dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'inflammation.

Il a des effets cytotoxiques et cytostatiques sur certaines lignées cellulaires tumorales *in vitro* et provoque la nécrose hémorragique de certaines tumeurs *in vivo*.

Une autre cytokine, produite principalement par les lymphocytes T activés et nommée à l'origine lymphotoxine (LT), possède beaucoup de propriétés biologiques semblables (effets tumoricides par ex.) à celles du TNF. Le TNF et la LT partageant de nombreuses propriétés biologiques et structurales ont été rebaptisés respectivement TNF alpha (TNF) et TNF beta (LT). Toutefois, pour plus de facilité , nous utiliserons la première nomenclature tout au long de ce travail.



**Fig. 4:** Les gènes de la lymphotoxine (LT) et du TNF se trouvent dans la Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). La structure des deux gènes et des deux protéines se ressemblent, cependant, le TNF possède un pont disulfure et la LT a un site de N-glycosylation en position 62. Les gènes sont proches l'un de l'autre mais régulés indépendamment. (SS: séquence-signal; UT: unité de transcription). (Hamblin, 1988).

Les gènes humains du TNF (Pennica et al., 1984) et de la LT (Gray et al., 1984) ont été clonés et exprimés dans *Escherichia coli*. La molécule mature du TNF humain est une protéine non glycosylée avec un PM monomérique (157 acides aminés) de 17,3 kDa, qui contient 2 résidus cystéine formant un pont disulfure intramoléculaire (Aggarwal et al., 1985a). Sa forme naturelle est dimérique ou trimérique.

La structure du gène du TNF (voir figure 4) montre que la protéine mature est précédée par une préséquence de 76 acides aminés. Elle est plus longue que les séquences-signal classiques et l'homologie de 86 % (au niveau des acides aminés) entre les séquences de TNF humain et murin suggère que cette préséquence a un rôle important. Le TNF peut aussi se présenter sous une forme membranaire (26 kDa).

La LT humaine mature est une glycoprotéine, ne contenant pas de cystéines et qui partage 30 % d'homologie de séquences d'acides aminés avec le TNF (Pennica et al., 1984).

Les gènes du TNF et de la LT (voir figure 4) contiennent 4 exons et 4 introns. Ils sont localisés dans le complexe majeur d'histocompatibilité sur le chromosome 6 chez l'homme et le chromosome 17 chez la souris. Chez l'homme, les deux gènes sont séparés par 1200 paires de bases seulement. Ils sont régulés indépendamment et possèdent peu d'homologie au niveau de leur promoteur.

### Récepteurs du TNF

Le TNF et la LT se lient aux mêmes récepteurs de la surface cellulaire (Aggarwal et al., 1985b). Toutes les cellules possèdent des récepteurs au TNF à l'exception des érythrocytes et des lymphocytes T non stimulés. La plupart des cellules expriment 1000 à 10000 récepteurs en surface. Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de récepteurs et la sensibilité à la cytotoxicité du TNF (Sugarman et al., 1985).

Après liaison au récepteur, le TNF s'internalise dans des puits recouverts de clathrine; il y a formation d'un endosome et ensuite fusion avec

un lysosome où le TNF est dégradé. Le signal est transmis quelque part au cours de ce trajet.

Récemment, on a montré que la plupart des cellules humaines expriment simultanément deux récepteurs distincts pour le TNF. L'un d'un PM de 55 kDa et l'autre de 75 kDa. Le TNF et la LT se lient aux deux récepteurs. Leur clonage a permis de comparer leur séquence en acides aminés. Les régions extracellulaires des deux récepteurs sont très similaires entre elles et avec celle du NGF (Nerve Growth Factor). Les régions intracellulaires par contre sont très différentes entre elles et n'ont pas de similarité avec une autre séquence connue chez les mammifères (Dembic *et al.*, 1990).

## 5.2. Effets biologiques du TNF $\alpha$

### 5.2.1. Cytotoxicité du TNF $\alpha$ .

Le TNF $\alpha$  est toxique pour certaines lignées cellulaires transformées mais pas pour les cellules normales *in vitro* (Sugarman, 1985). Beaucoup de souches de cellules transformées sont tuées, soit par le TNF seul, soit par le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  en synergie (Talmadge *et al.*, 1987).

L'action cytotoxique du TNF est clairement indépendante de la synthèse protéique. De plus, le TNF provoque l'activation d'une phospholipase A2 particulière (Suffys *et al.*, 1987). L'internalisation du TNF est nécessaire à sa cytotoxicité. Une protéine G assure peut être le transfert du signal qui active la phospholipase A2, car ce signal est inhibé par la toxine de *Bordetella pertusis*. Les inhibiteurs de la phospholipase A2 tels que la quinacrine et l'acide aristolochique, protègent les cellules de la cytotoxicité du TNF. Les inhibiteurs de protéases de type sérine protègent les cellules de l'activation de la phospholipase A2 par un mécanisme non encore élucidé. Une protéase interviendrait donc dans la cytotoxicité du TNF.

Le traitement de cellules sensibles avec du TNF aboutit à l'activation de la phospholipase A2 et à une augmentation de production d'acide arachidonique et de ses dérivés (prostaglandines, thromboxane, leucotriènes) (Fiers *et al.*, 1990). Suffys et ses collaborateurs (1991) ont montré que la

libération d'acide arachidonique induite par le TNF est fortement diminuée en présence d'inhibiteurs de protéase. Ceci suggère que la modulation d'activité de la phospholipase A2 pourrait requérir l'action d'une protéase.

Bien que l'action de la PLA2 soit nécessaire, l'acide arachidonique lui-même ne semble pas jouer un rôle clé dans le mécanisme de cytotoxicité (Suffys *et al.*, 1991). Actuellement, on ne voit pas pourquoi l'activation d'une PLA2 particulière est létale, ni pourquoi cette PLA2 n'est pas active dans les cellules résistantes au TNF. Wong et Goeddel (1989) ont proposé une hypothèse selon laquelle l'action cytotoxique du TNF se ferait par l'intermédiaire d'une production intracellulaire de radicaux libres de l'oxygène. Ceux-ci pourraient activer des molécules persistantes potentiellement toxiques.

#### 5.2.2. TNF, cachectine et métabolisme des lipides

Rouzer et Cerami (1990) ont montré que des lapins infectés par des trypanosomes subissent une importante perte de poids associée à une déficience en lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme impliquée dans l'hydrolyse des triglycérides associés aux chylomicrons et aux VLDL. Par la suite, on a identifié dans le sérum de souris traitées avec des lipopolysaccharides (LPS) (Kawakami et Cerami, 1991) un facteur supprimant l'activité de la LPL des tissus adipeux. Ce facteur est produit par les macrophages et est nommé cachectine suite à son implication dans la pathophysiologie de la cachexie; syndrome clinique caractérisé par un amaigrissement portant sur les graisses et les muscles (squelettiques et cardiaques).

La **cachectine** est souvent associée à des infections chroniques. La cachectine supprime également la biosynthèse d'enzymes requises pour la synthèse de novo de triglycérides, telles que l'acétyl CoA carboxylase et l'acide gras synthétase (Pekala, 1983). Beutler et Cerami (1986) ont démontré que le TNF et la cachectine n'étaient qu'une seule et même protéine.

**Endothelial cell activation by TNF and related cytokines**

<i>Category</i>	<i>Structural/functional change</i>	<i>Other cytokines</i>
Coagulation	↑ Tissue factor/procoagulant	IL-1, ?LT
	↓ Activated protein C/procoagulant	IL-1, ?LT
	↑ Inhibition of plasminogen activator/ antifibrinolytic	IL-1, ?LT
Inflammation	↑ E-LAM 1 expression/leucocyte adhesion	IL-1, LT
	↑ IL-1 biosynthesis/proinflammatory	IL-1, LT
	↑ CSF biosynthesis/leucocyte production	IL-1, ?LT
	↑ PAF biosynthesis/leucocyte activation	IL-1, ?LT
Immunity	↑ "HEV" morphology/lymphocyte extravasation	IL-1, LT, IFN- $\gamma$
	↑ ICAM-1 expression/lymphocyte adhesion	IL-1, LT, IFN- $\gamma$
	↑ Class I MHC antigen expression/CTL recognition	LT, IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$
	↑ Membrane IL-1/lymphocyte activation	LT, ?IL-1

CSF, colony-stimulating factor; CTL, cytotoxic T lymphocyte; E-LAM 1, endothelial-leucocyte adhesion molecule 1; HEV, high endothelial venule; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; MHC, major histocompatibility complex; PAF, platelet-activating factor.

**Tableau 2:** Activation de la cellule endothéliale par le TNF et les cytokines "apparentées". (Poher, 1987).

Alors qu'il diminue l'activité de la LPL dans les tissus adipeux, le TNF augmente l'activité de la LPL dans le coeur, les poumons, le foie et le plasma (Semb *et al.*, 1987). De plus un accroissement de la synthèse de triglycérides chez l'homme et chez les animaux a été observé après administration de TNF. Saxena et ses collaborateurs (1990) ont mis en évidence que le TNF provoque un relargage de la LPL associée aux cellules endothéliales.

Sur base de toutes ces données, Saxena *et al.* (1990) proposent une hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'activité de la LPL dans le foie et la diminution de l'activité LPL associée aux cellules endothéliales causeraient un plus grand flux d'acides gras (énergie) vers le foie, répondant aux demandes métaboliques intenses de la réponse inflammatoire.

Ainsi des taux modérés de TNF pourraient conférer un avantage pour combattre l'infection bactérienne ou virale en mobilisant les réserves d'énergie pour la réponse inflammatoire. Par contre, une exposition prolongée au TNF serait néfaste en provoquant l'état de cachexie.

### 5.2.3. Effet du TNF sur les cellules endothéliales (voir tableau 2)

#### A. Coagulation

On a montré que le TNF et l'IL-1 inhibent la production du complexe protéine S - protéine C activé qui intervient dans un processus anti-coagulant (Nawroth et Stern, 1986). Ces 2 cytokines augmentent aussi la production d'inhibiteurs spécifiques des activateurs du plasminogène. Elles induisent la biosynthèse et l'expression à la surface des cellules endothéliales d'un facteur tissulaire d'activité procoagulante (Bevilacqua *et al.*, 1989; Nawroth et Stern, 1986), permettant à l'endothélium d'initier la coagulation par la voie extrinsèque. Le TNF agit clairement en favorisant la coagulation, effet qu'il partage avec l'IL-1.

## B. Inflammation

Le TNF (comme l'IL-1) augmente de façon très marquée l'adhésion des PMNs et des monocytes sanguins à l'endothélium (Gamble *et al.*, 1985). Cette apparition d'interactions adhésives est provoquée par la synthèse de molécules d'adhésion endothélium-leucocyte (E-LAMs). L'anticorps monoclonale murin H4/H18 reconnaît une glycoprotéine spécifique de la surface des cellules endothéliales dont la synthèse est induite par le TNF ainsi que par l'IL-1 et la LT (Pober *et al.*, 1986a, 1987). Cette glycoprotéine a été identifiée comme étant une molécule d'adhésion entre les cellules endothéliales et les leucocytes. Elle a été nommée E-LAM1.

L'expression de cette protéine ainsi que d'une autre molécule d'adhésion (I-LAM1) a été décelée *in vivo* à la surface des cellules endothéliales de babouins traités avec du TNF (Munro *et al.*, 1989).

Moser *et al.* (1989) ont montré que le TNF et l'IL-1 stimulaient la diapédèse des neutrophiles à travers l'endothélium. En outre, le TNF stimule la production de GM-CSF (Munker *et al.*, 1986; Broudy *et al.*, 1986), d'IL-1, de PGDF et de PAF par les cellules endothéliales (Wrong et Goedel, 1989).

En plus de son action au niveau des cellules endothéliales, le TNF peut activer les neutrophiles qui ont un rôle important dans l'inflammation aiguë. Le TNF induit chez ces neutrophiles la production de radicaux libres de l'oxygène, la dégranulation (Klebanoff *et al.*, 1986), la phagocytose et une cytotoxicité anticorps-dépendante (Shalaby *et al.*, 1985).

Ming *et al.* (1987) ont montré en culture que le TNF est chémotactique pour les monocytes et les leucocytes polymorphonucléaires. Rollins *et al.* (1990) ont mis en évidence la production d'une molécule chémoattractive pour les monocytes par les cellules endothéliales en culture activées par le TNF et l'IL-1.

### C. Immunité

Le TNF (ainsi que l'IL-1 et la LT) induit l'expression par les cellules endothéliales d'une molécule d'adhésion pour les lymphocytes (ICAM1) (Pober *et al.*, 1986). Le TNF augmente donc l'adhésion des lymphocytes aux cellules endothéliales.

Le TNF stimule aussi l'expression d'antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I) dans les cellules endothéliales et les fibroblastes de la peau (Colins *et al.*, 1986b). Ces molécules agissent au niveau de l'interaction des cellules endothéliales avec les cellules T cytotoxiques.

Après leur adhésion à la barrière endothéliale, les lymphocytes doivent la traverser. Le TNF provoque sur les cellules en culture une réorganisation de la couche monocellulaire en y formant des trous ainsi qu'une perte de fibronectine de la membrane basale (Stolpen *et al.*, 1986). Il est possible que ces altérations *in vitro* possèdent les mêmes caractéristiques que les sites d'extravasation des lymphocytes *in vivo*.

Nous avons vu plus haut que le TNF induisait la production d'IL-1 libérée par les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales en culture stimulées avec le TNF peuvent aussi exprimer une IL-1 membranaire.

#### 5.2.4. Autres actions du TNF

-Il a été montré *in vitro* que le TNF stimule la résorption osseuse et inhibe la formation des os (Bertolini *et al.*, 1986).

-Le TNF provoque aussi la dégradation de protéoglycane dans le cartilage et inhibe sa synthèse *in vitro* (Saklatava, 1986).

-Le TNF stimule la croissance des fibroblastes (Vilcek *et al.*, 1987)

-Le TNF inhibe la prolifération cellulaire et induit la production d'antigènes de classe II et de molécules d'adhésion chez les kératinocytes en culture (Detmar et Orfanos, 1990)

-Le TNF ainsi que la LT possèdent des effets anti-viraux (Mestan *et al.*, 1986; Wong et Goedel, 1986)

-Le TNF est aussi un puissant pyrogène endogène (comme l'IL-1).

### 5.2.5. Effets pathologiques du TNF

-Nous avons déjà décrit l'implication du TNF dans l'état de cachexie au point 5.2.2..

-Le TNF intervient dans le choc septique.

Il s'agit d'un état pathologique caractérisé par une hypertension systémique, une hypertension pulmonaire et périphérique, entraînant tout d'abord une tachycardie, la pâleur, le refroidissement des extrémités. A mesure que le choc évolue se développent des insuffisances rénales, cardiaques et respiratoires qui peuvent entraîner la mort. Ces symptômes sont dûs à la réponse explosive et généralisée de l'organisme à une septicémie à germes Gram négatifs.

La libération dans la circulation d'une endotoxine déclenche une réaction inflammatoire violente et généralisée. L'injection de TNF est capable de reproduire *in vivo* la plupart des effets des endotoxines. De plus, on a remarqué que des malades présentant un état de choc septique avaient des taux élevés de TNF sérique et que la gravité du syndrome était directement liée à la concentration de TNF.

-Le TNF semble également jouer un rôle dans la malaria.

## BUT DU TRAVAIL

Au cours de la formation d'une plaque d'athérosclérose, il y a accumulation de LDL au niveau de l'intima artérielle. Ces LDL subissent des modifications (Steinberg, 1987a) qui augmentent leur capture par les macrophages. Ceux-ci se remplissent alors d'esters de cholestérol et deviennent des cellules spumeuses, caractéristiques des lésions athéroscléreuses.

Constituant la frontière entre le plasma et la paroi vasculaire, l'endothélium module le passage et donc l'accumulation des LDL dans l'intima. Cette modulation dépend de la perméabilité intracellulaire et de l'endocytose des LDL. La liaison et l'endocytose des LDL au niveau des cellules endothéliales se réalise de manière spécifique et non spécifique (van Hinsberg *et al.*, 1983). Barath *et al.* (1990) ont détecté, par une méthode immunohistochimique, la présence de TNF dans les tissus athéroscléreux humains. Ils ont mis le TNF en évidence non seulement dans le cytoplasme des macrophages, mais aussi dans le cytoplasme et à la surface des cellules endothéliales et musculaires lisses de ces lésions. Aucune trace de TNF n'a pu être décelée au niveau des parois vasculaires normales.

Le but de ce travail est de tester *in vitro* l'effet éventuel du TNF sur la liaison spécifique des LDL aux cellules endothéliales. Auparavant, nous déterminerons si le TNF peut avoir une action cytotoxique sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale en culture. Nous déterminerons aussi si le TNF peut influencer la croissance de ces mêmes cellules *in vitro*.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES PROVENANT DE LA VEINE OMBILICALE HUMAINE

### 1.1. Origine et mise en culture des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont prélevées à partir de la veine ombilicale. Les cordons ombilicaux sont fournis par la Maternité Provinciale et la clinique Ste Elisabeth de Namur.

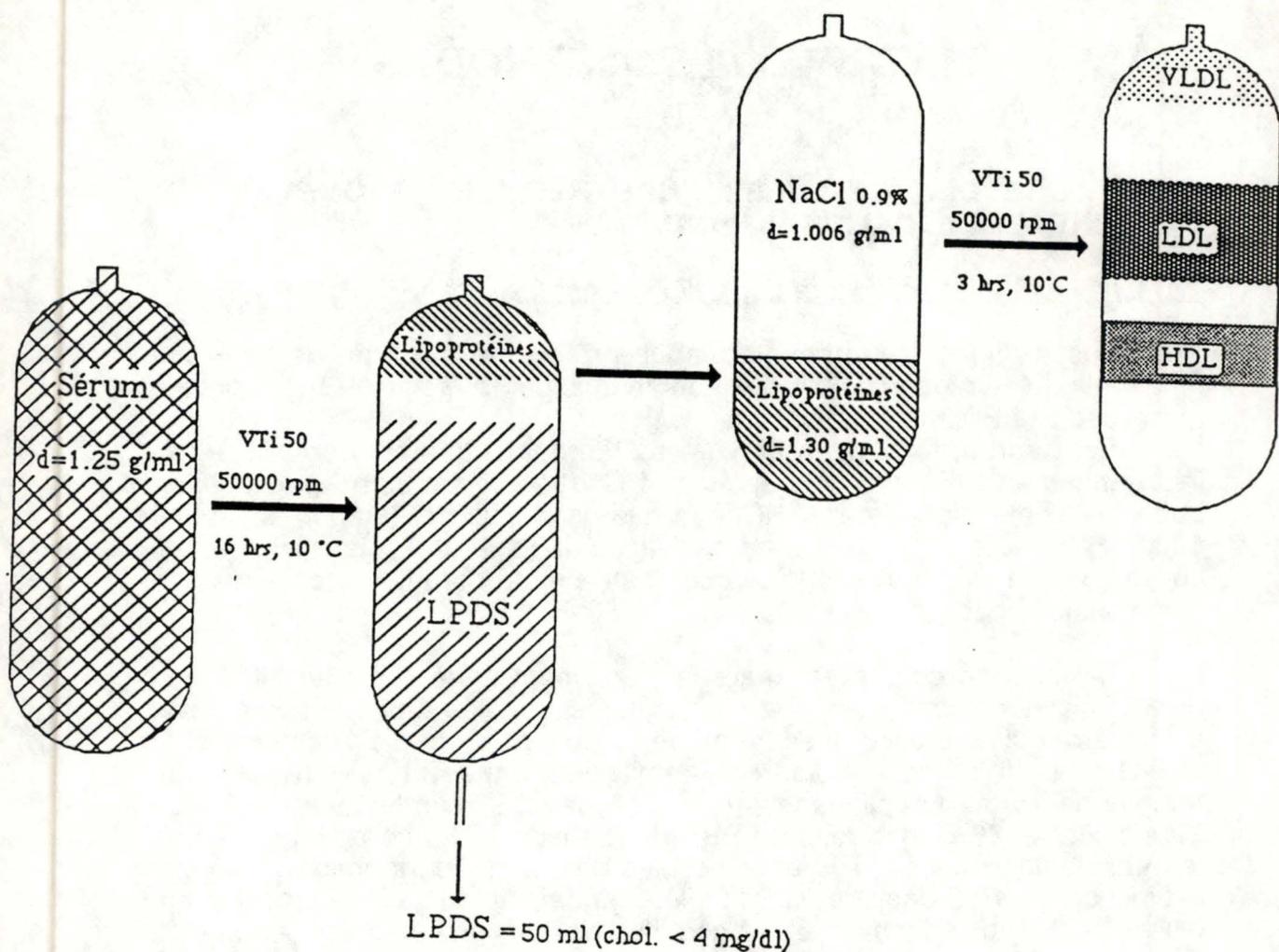
Les cordons sont prélevés stérilement, immédiatement après l'accouchement. Ils sont conservés à 4°C dans un tampon appelé "Cord buffer" (140 mM NaCl - 4 mM KCl - 11 mM de D-glucose - tampon phosphate 1mM pH7.4). La date, l'heure de naissance, le sexe de l'enfant ainsi que la consommation éventuelle de cigarettes par la mère durant la grossesse sont communiqués par les maternités.

La mise en culture est réalisée stérilement entre 4 heures et 5 jours après l'accouchement. La veine ombilicale est canulée à une extrémité avec un trocard, puis perfusée avec 20 ml de "Cord buffer", afin d'éliminer le sang qu'elle pourrait contenir. L'autre extrémité est fermée et la veine est alors remplie de 10 ml de collagénase 0.1 % (Type CLS, Worthington ou Cooper Biomedicals, 186 U/mg) dans du PBS de Dulbecco). La collagénase permet le détachement des cellules endothéliales des parois de la veine. La veine est incubée à 37°C dans du "Cord buffer" pendant 20 minutes. Le contenu de la veine est récolté dans un tube à centrifugation à fond conique. La veine est ensuite rincée avec 20 ml de "Cord buffer", qui sont récoltés et ajoutés au même tube à centrifuger.

Les cellules endothéliales sont séparées de la solution de collagénase 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 M199 (Flow Laboratories) additionné

- de L-glutamine (Sigma) 2mM,
- d'HEPES 15 mM,
- d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml, nystatin 25 U/ml),
- de 20 % de sérum de veau nouveau né (NBS, Flow Laboratories).

Les cellules provenant d'un cordon sont déposées dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre (Nunc) préalablement recouverte d'un film de gélatine (Sigma) 0.2 % dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite incubées en atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37°C.



**Fig. 1:** Représentation schématique du principe utilisé pour préparer le LPDS, concentrer les lipoprotéines et enfin, séparer les trois classes de lipoprotéines (Poumay, 1988).

## 1.2. Changement de milieu et repiquage

Le premier changement de milieu est effectué le lendemain de la mise en culture. Le milieu est ensuite renouvelé tous les deux jours.

Quand les cellules sont confluentes, 4 à 5 jours après l'ensemencement, les boîtes sont repiquées dans un rapport un à trois. Les boîtes sont d'abord lavées avec 3 ml de tampon "HEPES" (137 mM NaCl - 4 mM KCl - 12 mM glucose - 10 mM HEPES pH 7.5) à température ambiante. Puis elles sont incubées à 37°C pendant 20 minutes dans une solution contenant 1.5 ml de collagénase 0.2 % dans le tampon "HEPES" et 1.5 ml de BSA/EDTA (BSA 0.5 % et EDTA 0.02 %). Cette étape permet le détachement des cellules.

La solution contenant les cellules est récupérée dans un tube à centrifugation à fond conique. La boîte est rincée avec 2 ml de tampon "HEPES", qui sont ajoutés à la solution de cellules. Le tout est centrifugé pendant 5 minutes à 1000 tours/minute. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 14 ml de milieu M199 contenant 20 % de NBS. La suspension de cellules obtenue est répartie dans 9 boîtes de 35 mm de diamètre (Nunc) ou dans des multipuits (24 puits de 2 cm<sup>2</sup> de surface) (Nunc).

## 1.3. Examen des cellules en culture

Les cellules sont observées quotidiennement dans les boîtes de culture ou les multipuits à l'aide d'un microscope inversé Leitz Diavert, équipé d'objectifs de phase de grossissement 10X et 20X.

## **2. ISOLEMENT DES LDL**

(voir fig. 1.)

L'isolement des lipoprotéines (Poumay et Ronveaux-Dupal, 1985) est réalisé à partir de 80 ml de sérum ABO poolé prélevé le jour même par le centre de transfusion de la Croix-Rouge. Le mélange de sérum ainsi obtenu permet d'éviter l'influence des variations individuelles éventuelles.

Les 80 ml de sérum sont soumis à une première centrifugation de 5 minutes à 1000 tours/minute afin d'éliminer les globules rouges qui pourraient y subsister.

80 ml de BHT (Hydroxytoluène butylé) (Merck) 10 mM sont ajoutés au sérum. Le BHT sert à protéger les lipoprotéines de l'oxydation. La densité du sérum 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, qui sont alors fermés par soudure.

Une première centrifugation est réalisée avec un rotor vertical Beckman Vti 50 pendant 16 heures à 10°C et 50000 tours/minutes, dans une ultracentrifugeuse Beckman L5-65. En fin de centrifugation, à 2000 tours/minute, le frein est coupé pour permettre une décélération lente.

Le sommet des tubes est découpé à l'aide d'un scalpel. Les lipoprotéines (qui constituent une bande au sommet du tube) sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rétréci. Les lipoprotéines des deux tubes sont rassemblées et mises à la densité de 1.30 mg/ml avec du KBr, pour un volume total de 10 ml. 30 ml de NaCl 0.9 % additionné de BHT (10 µM) sont déposés dans un tube à centrifugation Quick Seal. La solution de lipoprotéines est injectée dans le fond du tube à l'aide d'une seringue prolongée d'un fin tuyau. Le tube est scellé après remplissage.

Une centrifugation de 3 heures à 50000 tours/minute est réalisée (accélération et décélération lentes). Après centrifugation, 3 bandes distinctes sont observées, correspondant aux VLDL, LDL et HDL, de haut en bas.

Ces 3 bandes sont récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur à bout effilé. Les solutions lipoprotéines obtenues (en particulier les LDL, seules utilisées pour ce travail) sont dialysées pendant 48 heures contre un tampon isotonique NaCl 0.15 M - Tris 10 mM - EDTA 0.01 % - BHT 10 µM, pH 7.4. Ce tampon est renouvelé toutes les 6 heures.

#### Dosage protéique des lipoprotéines

Après dialyse, les 3 types de lipoprotéines sont filtrées sur un Millex 0.22 µM: leur concentration en protéine est déterminée selon la méthode de Lowry *et al* (1951). L'étalon utilisé est de l'albumine bovine sérique (BSA) à une concentration de 0.4 mg/ml.

NB: Afin de vérifier si l'isolement est correct, ce dosage est effectué sur les 3 types de lipoprotéines, bien que seules les LDL sont utilisées dans ce travail.

#### Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol est effectué selon la méthode de Allain *et al*. (1974) à l'aide d'un kit enzymatique commercialisé par Analys.

Principe: l'hydrolyse du cholestérol par voie enzymatique produit du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La peroxydase, en présence de peroxyde d'hydrogène, catalyse l'oxydation d'un chromogène rouge, l' amino-4-antipyrine. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre (LKB Ultraspec II) à une longueur d'onde de 500 nm, est proportionnelle à la concentration en cholestérol.

Le dosage du cholestérol est effectué sur les lipoprotéines et sur le sérum déficient en lipoprotéines.

### Le sérum déficient en lipoprotéines (LPDS)

Après la première centrifugation (16 heures) de l'isolement des lipoprotéines, après avoir prélevé ces dernières, le fond de chaque tube est percé au moyen d'une aiguille hypodermique et le contenu est recueilli en aliquots d'environ 3 ml. Le contenu en cholestérol est dosé afin de déterminer les fractions les plus pauvres en cholestérol. Les fractions les plus pauvres en cholestérol constituent le LPDS. Les aliquots ayant une concentration en cholestérol inférieure à 8 mg/dl sont rassemblés et dialysés contre du PBS (tampon phosphate de potassium 10mM, pH7,4 contenant 0,3% de NaCl).

Une concentration finale en cholestérol inférieure à 4mg/dl est alors obtenue. Ce LPDS est additionné au milieu de culture pour induire la production de récepteurs aux LDL chez les cellules endothéliales car ce milieu est pauvre en cholestérol.

### **3. LE TUMOR NECROSIS FACTOR**

Pour toutes nos expériences, nous avons utilisé du TNF alpha humain recombinant (r hTNF alpha) produit par la levure, livré stérile (Boehringer).

Caractéristiques générales:

- PM: 17000
- Structure primaire identique à celle du TNF alpha humain naturel (une chaîne polypeptidique de 157 acides aminés)
- Activité spécifique  $> 2 \cdot 10^7$  U/mg

### **4. TEST DE CYTOTOXICITE: ESTIMATION DE LA LYSE DES CELLULES PAR LA MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE LIBEREE DANS LE MILIEU**

#### 4.1. Dosage de la LDH

L'activité de la LDH est déterminée en mesurant la vitesse de la diminution de l'absorbance à 340 nm au spectrophotomètre (LKB, Ultraspect II) du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) produite par la LDH de l'échantillon étudié en présence d'un excès de pyruvate (Wroblenski et La Due, 1985).

En pratique, 100 µl de l'échantillon sont ajoutés dans une cuvette à 2.85 ml de tampon phosphate 0.1 M pH 7.4, qui contient du pyruvate 960 µM (Boehringer) en excès par rapport à la concentration de NADH (150 µM). La diminution de l'absorbance est enregistrée pendant 5 minutes. La pente de la droite permet de calculer l'activité de LDH présente dans l'échantillon testé.

Pour évaluer le pourcentage de l'activité LDH libérée par les cellules et estimer la proportion des cellules lésées, on procède comme suit:

- le surnageant des cellules est prélevé de leur boîte et placé dans la glace.
- les cellules sont rincées une fois avec 2 ml de PBS.
- la membrane cellulaire est fragilisée par ajout d'1 ml de PBS/Triton 0.1 % suivi d'une incubation de 3 minutes pour fragiliser les membranes.
- les cellules sont raclées dans le PBS/Triton 0.1 % à l'aide d'un morceau de gomme dure monté sur une aiguille hypodermique. La suspension de débris cellulaire est placée dans la glace.
- l'activité de la LDH du milieu de culture + sérum 20 % est mesurée (activité contrôle).
- l'activité de la LDH du surnageant de culture (contenant du milieu + sérum 20 % + la LDH éventuellement libérée par les cellules) est mesurée. A cette activité, il faut soustraire l'activité contrôle présente dans ce milieu du fait du sérum: on obtient ainsi l'activité LDH libérée dans le milieu.
- l'activité LDH de la suspension de cellules raclées est mesurée (activité non libérée par les cellules).

Le pourcentage représenté par la lyse cellulaire est donc calculé par la formule suivante:

$$(\text{Activité LDH libérée}) \times 100 / ((\text{Activité LDH libérée}) + (\text{Activité LDH non libérée})) = \text{pourcentage de cellules lysées.}$$

#### 4.2. Observation morphologique des cellules en microscopie photonique

Des photos de cellules sont prises en début et en fin d'incubation, au microscope inversé à contraste de phase (Leitz Diavert).

### **5. TESTS DE PROLIFERATION CELLULAIRE**

#### 5.1. Test d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN

##### 5.1.1. Repiquage des cellules endothéliales

Les cellules sont repiquées dans des plaques multipuits de 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> chacune à raison de 50000 cellules par cupule. Les cellules repiquées proviennent d'une seule et même boîte. Le milieu de culture utilisé est le milieu M199 + NBS 10 % (0.5 ml/cupule).

##### 5.1.2. Incubation des cellules endothéliales avec le TNF et la thymidine tritiée

Vingt-quatre heures après le repiquage, le milieu est renouvelé et dans chaque cupule, 500 µl de milieu M199 + NBS 20 % contenant le TNF à la concentration voulue sont ajoutés. Dans les cupules contrôles, 500 µl de milieu M199 + NBS 20 % sont ajoutés.

Dans notre première expérience (voir résultats, fig. 7A et B) nous avons incubé les cellules avec le TNF pendant 24 heures. 12 heures avant la fin de l'incubation, nous avons ajouté 1  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-thymidine par cupule.

Dans notre deuxième expérience (voir résultats, fig. 8), nous avons incubé les cellules avec le TNF pendant 12 heures dans la moitié des cupules et 24 heures dans l'autre moitié. Les deux durées d'incubation ont débuté en même temps. La thymidine (1  $\mu$ Ci/cupule) a été ajoutée 6 heures avant la fin de l'incubation.

### 5.1.3. Estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN

En fin d'incubation, le surnageant de culture est retiré et les cellules sont lavées 2 fois avec 0.5 ml de PBS afin d'éliminer la thymidine tritiée qui n'aurait pas été incorporée. Elles sont ensuite détachées et détruites à l'aide d'une gomme dure dans 400  $\mu$ l de PBS. La suspension de débris cellulaires obtenue est retirée des cupules après plusieurs aspirations-expulsions à la micropipette. La suspension est mélangée au Vortex et 100  $\mu$ l sont déposés dans une fiole de comptage avec 3 ml d'Aqualuma. Ensuite le nombre de désintégrations par minute (dpm) est mesuré pendant 3 minutes grâce à un compteur à scintillation  $\beta$ .

Les protéines sont dosées dans les 200  $\mu$ l restant de la suspension de débris cellulaires (deux dosages sur 100  $\mu$ l).

## 5.2. Courbe de croissance par quantification de cellules

### 5.2.1. Méthode par comptage des cellules sur chambres de Bürcker

Des cellules sont repiquées dans deux plaques multipuits de 24 cupules, contenant chacune 0.5 ml de milieu M199 + NBS 20 %, à raison de 15000 cellules par cupules.

Après 24 heures d'incubation, le milieu des cupules est remplacé de la manière suivante:

- 0.5 ml de milieu M199 + NBS 20 % (contrôle) sont déposés dans 6 cupules.
- 0.5 ml de milieu M199 + NBS 20 % contenant 50 mg/ml de TNF sont déposés dans 6 cupules.
- 0.5 ml de milieu M199 + NBS 20 % contenant 50 0 200mg/ml de TNF sont déposés dans 6 cupules

Dans chaque multipuits, les cellules des 6 cupules restantes ont été comptées sur une chambre Bürcker (voir ci-dessous).

Ce jour est considéré comme le jour 0. Deux jours plus tard (jour 2) les chambres des différentes cupules de la première plaque multipuits sont comptées sur chambre de Bürcker. Le milieu des cupules de la deuxième plaque multipuits est remplacé avec 0.5 ml du même type de milieu. Deux

jours plus tard (jour 4) les cellules de chaque cupule de la deuxième plaque multipuits sont comptés sur une chambre de Bürcker.

#### Comptage sur chambres de Bürcker

Avant de pouvoir être comptées, les cellules doivent être détachées du fond de la cupule. A cet effet, le milieu de la culture est retiré de chaque cupule et est remplacé par un mélange de 250 µl de collagénase 0.2 % avec 250 µl de BSA/EDTA. Les cellules sont détachées après 20-30 minutes d'incubation à 37°C. Le contenu de la cupule est déposé dans un tube à centrifugation à fond conique. La cupule est rincée deux fois avec 1 ml de tampon "HEPES". Ces 2 ml sont déposés dans le tube à centrifugation.

Les cellules sont centrifugées à 1000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant contenant la collagénase est éliminé délicatement.

Les cellules sont resuspendues dans 50 µl au jour 0 et 2 et dans 100 µl au jour 4. On ajoute 5 ou 10 µl d'une solution d'érythrosine B selon le volume de la suspension. On agite et on laisse agir le colorant pendant 4 minutes. Ensuite un petit volume de la suspension cellulaire est glissé entre le socle et la lamelle de la chambre de Bürcker. On compte les cellules se trouvant sur le quadrillage de la chambre de Bürcker au microscope à contraste de phase. Sachant que le volume compris entre le quadrillage et la lamelle est de 0.9 µl, on peut retrouver le nombre de cellules qui ont été resuspendues.

L'érythrosine B permet de déterminer la viabilité des cellules: les cellules mortes se colorent en rouge par inclusion du colorant et les cellules viables restent blanches par exclusion du colorant.

#### 5.2.2. Méthode au cristal violet

Cette méthode a été élaborée par Kueng *et al.* (1989). Elle consiste à colorer les cellules *in situ* après fixation à la glutaraldéhyde.

Les cellules endothéliales sont repiquées dans des plaques multipuits de 96 cupules (Nunc) à raison de 10000 dans 100 µl de milieu M199 + NBS 20 %. Le lendemain, le milieu est retiré et 100 µl de milieu M199 + NBS 20 % contenant la concentration en TNF voulue sont ajoutés à chaque cupule.

Après différents temps d'incubation, on fixe les cellules avec 20µl de glutaraldéhyde 50% (Fluka-Chemika-Biochemika) diluée 5 fois dans du PBS.

Après trente minutes, la plaque est rincée 3 fois avec de l'eau désionisée puis séchée. La plaque peut être conservée ainsi pendant quelques jours.

Ensuite, les cellules sont colorées par addition de 100µl de cristal de violet (Merck) 0,1% dans de l'acide borique (Merck) dilué à 200mM dans de l'eau distillée et à pH9. Après une légère agitation de 20 minutes sur un

plateau tournant, la plaque est lavée abondamment avec de l'eau désionisée puis séchée. On resolubilise le colorant dans 100 $\mu$ l d'acide acétique (Janssens Chemika) dilué à 10% dans de l'eau distillée.

On lit l'absorbance à une longueur d'onde de 595nm grâce à un lecteur multiplaques (microplate reader, model 3550, Bio-Rad).

## 6. MARQUAGE DES LDL AVEC L'IODE RADIOACTIF (IODINATION)

Les LDL sont marquées à l'iode radioactif selon une adaptation de la méthode de Mc Farlane (1958) utilisant le chlorure d'iode comme agent oxydant (ICI) et modifiée par Bilheimer *et al.* (1972) pour le marquage des lipoprotéines.

Les LDL sont dialysées 24 heures contre un tampon glycine à pH 10 contenant du NaCl 0.1 M, du NaOH 0.1 N et de la glycine (Janssen Chimica) 0.1 M. L'ICI est préparé de la manière suivante: dans un tube en verre siliconé 3 ml d'une solution stock d'ICI (Merck - 53.4 mg dans 10 ml d'HCl 1N) sont déposés. 5 ml de CCl<sub>4</sub> (Merck) y sont ajoutés. Le tout est mélangé au Vortex et centrifugé à 3000 tours par minute pendant 15 minutes. Cette étape consiste à extraire par le CCl<sub>4</sub> l'iode libre de la solution d'ICI. Après centrifugation, on récupère 1 ml d'ICI dont on dilue 40  $\mu$ l dans 960  $\mu$ l de glycine 2M pH10. Les LDL sont dialysées dans le tampon glycine pH 10 de manière à obtenir une concentration de 1 mg/ml en protéine. Sous une hotte, 1 mCi de Na<sup>125</sup>I (Amersham) dans 200  $\mu$ l de tampon glycine pH 10 est ajoutée à la solution de lipoprotéines (2ml à 1 mg de protéines/ml). Ensuite 200  $\mu$ l de la solution d'ICI diluée sont ajoutés et le tout est immédiatement et vigoureusement agité pendant quelques secondes. Les LDL iodées sont alors placées dans un tube à dialyse Spectrapor 3 et dialysées dans un système continu contre 5 litres de tampon Tris 10 mM - NaCl 0.15 M - EDTA 0.01 % - BMT 10 $\mu$ M pH 7.4.

### Mesure du pourcentage d'iode libre et de l'activité spécifique

A 5  $\mu$ l de LDL marquées, on ajoute 1 ml de BSA (Boehringer) 1 mg/100 ml d'eau distillée et 500  $\mu$ l d'acide trichloracétique (TCA) 50 %. Le tout est centrifugé à 5000 tours/minute pendant 10 minutes. La radioactivité du surnageant et celle du culot sont mesurées au compteur gamma (LKB, Wallac Minigamma 1275).

Le rapport de la radioactivité dans le surnageant sur celle du culot donne le pourcentage d'iode libre dans la solution de LDL marquées. La radioactivité du culot divisée par la quantité de protéines donne l'activité spécifique des LDL marquées.

## 7. MESURES DE LA LIAISON DES $^{125}\text{I}$ -LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES

### 7.1. Mesure de la liaison totale des $^{125}\text{I}$ -LDL

Après la préincubation des cellules dans du milieu M199 + LPDS 10 % en présence ou en absence de TNF, la plaque multipuits 24 cupules est placée en chambre froide à 4°C. Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont incubées avec 0.5 ml de milieu M199 + LPDS 10 % contenant 10 µg/ml de  $^{125}\text{I}$ -LDL, prérefroidi à 4°C. A la fin de l'incubation ce milieu est immédiatement aspiré et remplacé par du PBS + BSA 0.2 %. Chaque cupule de cellules est lavée trois fois très rapidement avec le PBS + BSA 0.2 % et lavée deux fois pendant 10 minutes dans ce même tampon. Ces lavages sont suivis par deux lavages dans du PBS dépourvu de BSA. Les cellules endothéliales sont alors détruites dans 400 µl de NaOH 0.5 N. La radioactivité de 100 µl de lysat est déterminée dans un compteur gamma, tandis que le contenu en protéines cellulaires est dosé sur 2 fois 100 µl de lysat. La liaison est exprimée en µg de  $^{125}\text{I}$ -LDL liées par mg de protéines cellulaires.

### 7.2. Mesure de la liaison non spécifique et spécifique

La liaison non spécifique à 4°C est établie de la même façon que la liaison totale, mais l'incubation des cellules se réalise avec le milieu M199 + LPDS 10 % + les  $^{125}\text{I}$ -LDL contenant en plus en excès des LDL non-marquées (la concentration des LDL non-marquées vaut 50 fois celle des  $^{125}\text{I}$ -LDL).

La liaison de haute affinité (spécifique) est calculée en retirant la valeur de la liaison de faible affinité à la valeur de la liaison totale correspondante.

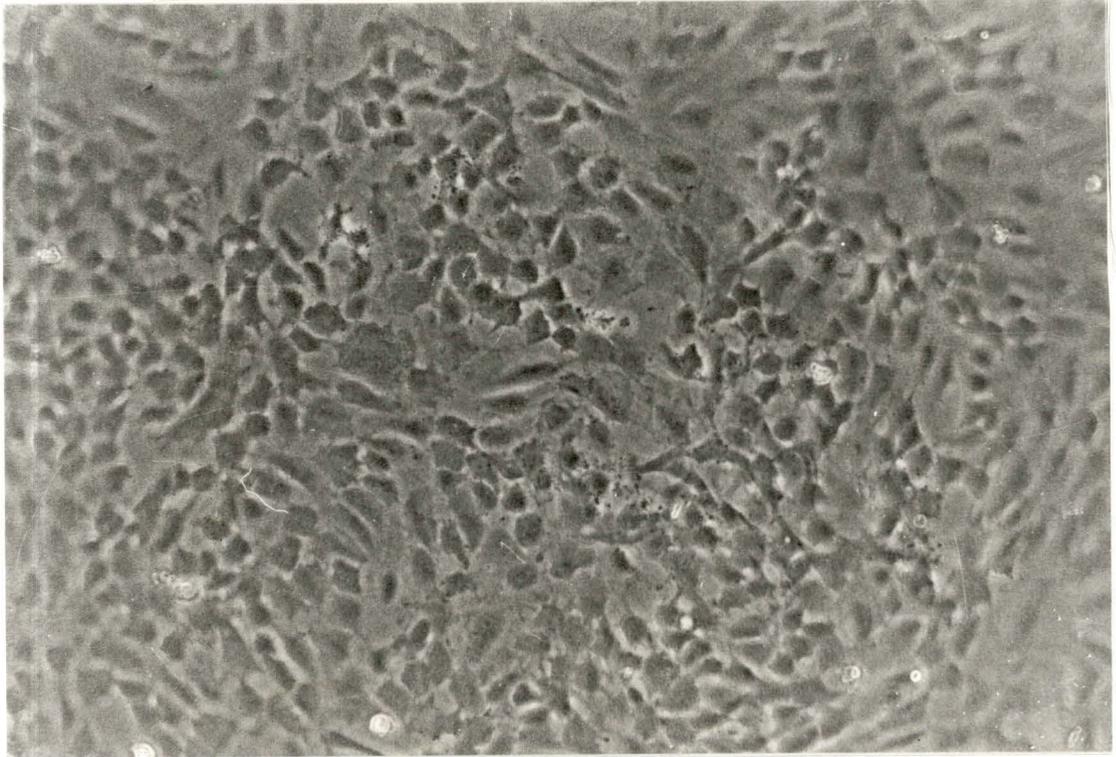


Fig. 1: Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture, à confluence (grossissement: 166 X).  
Les cellules polygonales et jointives constituent une monocouche.

# RESULTATS

## 1. IDENTIFICATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE

Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture, observées au microscope à contraste de phase inversé, présentent un aspect en monocouche caractéristique (figure 1) déjà décrit dans la littérature (Jaffe, 1984) et dans notre laboratoire (Poumay, 1988). En microscopie photonique, l'identification des cellules endothéliales se base sur cet aspect de monocouche formant une sorte de "pavement" de cellules plus ou moins polyédriques, tassées les unes contre les autres mais ne se chevauchant pas. A confluence, on n'observe plus d'espace entre les cellules et celles-ci adhèrent fortement au fond de la boîte.

Les cellules endothéliales ont été utilisées en première sous-culture pour toutes nos expériences.

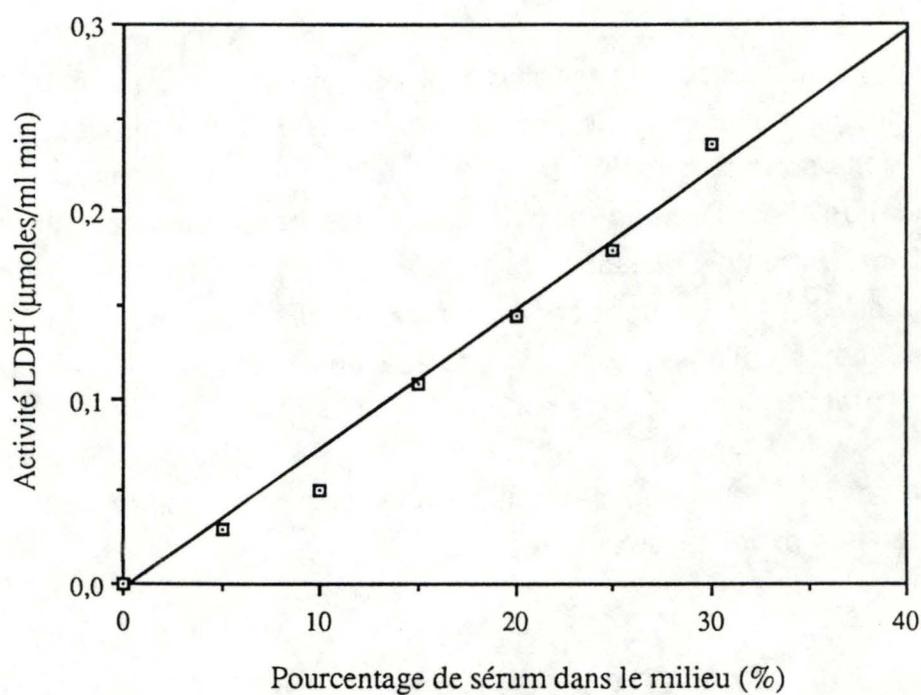
## 2. TEST DE CYTOTOXICITE DU TNF SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES

Nous avons choisi d'utiliser la méthode d'estimation de la lyse cellulaire par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu de culture.

Nous avons également considéré l'aspect morphologique en microscopie photonique.

### 2.1. Mesure de l'activité LDH dans le milieu additionné de sérum (NBS) en concentration croissante

Etant donné que les cellules sont cultivées dans du milieu M199 additionné de sérum (NBS), nous avons voulu déterminer si ce milieu de culture possède une activité LDH. Dans ce but, nous avons mesuré l'activité



**Fig. 2:** Mesure de l'activité de la LDH dans le milieu de culture en fonction du pourcentage (v/v) de sérum (NBS) qu'il contient.  
Une seule mesure a été réalisée pour chaque concentration en sérum.

LDH du milieu M199 seul ou en présence de NBS en concentration croissante (voir figure 2).

On observe que le milieu M199 seul n'a pas d'activité LDH. Par contre, le même milieu additionné de sérum possède une activité LDH directement proportionnelle au pourcentage de sérum qu'il contient.

## 2.2. Essai de mesure du pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales incubées avec différentes concentrations de TNF

Des boîtes de cellules confluentes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C avec 1 ml de M199 + NBS 5% contenant différentes concentrations en TNF comprises entre 0 et 400 ng/ml. Trois boîtes ont été incubées pour chaque concentration en TNF.

Après 24 heures d'incubation, l'activité LDH du surnageant de culture et l'activité LDH non libérée par les cellules ont été mesurées pour chaque boîte. L'activité due au sérum a aussi été déterminée.

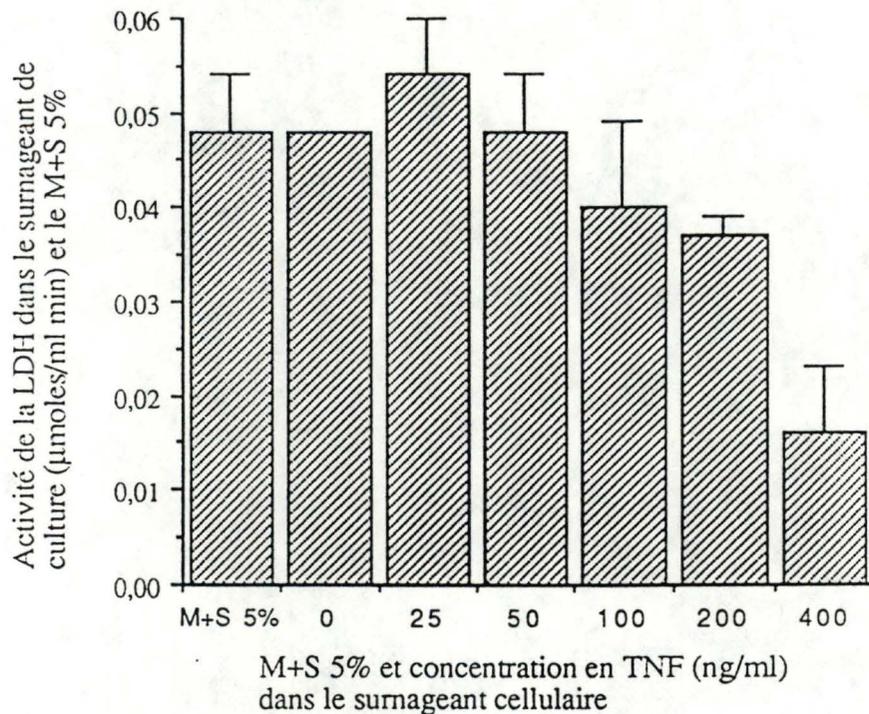
La figure 3 représente l'activité de la LDH mesurée dans le M199 + NBS 5% (activité due au sérum) et dans les différents surnageants de culture. Ce graphe nous montre qu'il n'y a eu aucune libération de LDH par les cellules endothéliales (à l'exception de la concentration 25 ng/ml). Pour les concentrations en TNF comprises entre 100 et 400 ng/ml il y a même une diminution de l'activité LDH par rapport à l'activité due au sérum.

## 2.3. Mesure du pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales pendant différentes durées d'incubation avec le TNF

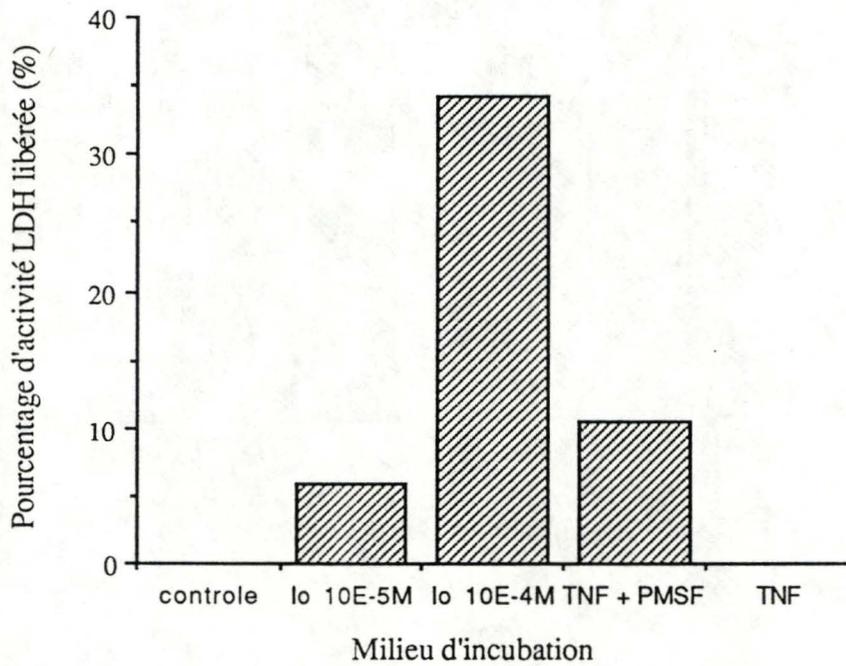
### 2.3.1. Incubation d'une durée de 2 heures

Des boîtes de cellules confluentes ont été incubées pendant 2 heures à 37°C de la manière suivante:

- 2 boîtes avec 1 ml de m199 + NBS 20%. Ces boîtes constituent le contrôle.



**Fig. 3:** Comparaison entre l'activité de la LDH mesurée dans le milieu contenant 5% de sérum (= activité due au sérum) et dans le surnageant des cellules endothéliales ayant été incubées pendant 24 heures dans du milieu (M199) contenant 5% de sérum et différentes concentrations en TNF. Chaque valeur représente la moyenne de 3 boîtes  $\pm$  1 écart-type. Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.



**Fig. 4:** Effet du TNF sur le pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales pendant 2 heures. Les cellules ont été incubées pendant 2 heures dans du milieu (M199) contenant 20% de sérum:

- seul (contrôle).
- avec de l'ionophore A23187  $10^{-5}$  M (Io 10E-5 M).
- avec de l'ionophore A23187  $10^{-5}$  M (Io 10E-4 M).
- avec 200 ng de TNF/ml et du PMSF 0,5 mM (TNF+PMSF).
- avec 200 ng de TNF/ml (TNF).

Chaque valeur représente la moyenne de 2 boîtes.  
 Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.

- 2 boîtes avec 1 ml de M199 + NBS 20% contenant de l'ionophore A23187 (Boehringer)  $10^{-5}$  M.

- 2 boîtes avec 1 ml de M199 + NBS 20% contenant de l'ionophore A23187  $10^{-4}$  M.

- 2 boîtes avec 1 ml de M199 + NBS 20% contenant du TNF à 200 ng/ml.

- 2 boîtes avec 1 ml de M199 + NBS 20% contenant du TNF à 200 ng/ml et du PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure) 0,5 mM. Ce test au PMSF a été réalisé suite aux résultats de l'expérience précédente (voir Discussion 1.2. et 1.3.1.).

### Dosage de la LDH

Après 2 heures d'incubation, l'activité LDH du surnageant de culture et l'activité LDH non libérée par les cellules ont été mesurées sur chaque boîte. L'activité LDH due au sérum a été déterminée.

Le pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales en fonction du milieu d'incubation est représenté à la figure 4. Aucune libération de LDH n'a été observée, ni dans le contrôle, ni dans les boîtes traitées au TNF seul. En fait, pour ces dernières boîtes, une baisse d'activité LDH par rapport au contrôle (M199 + NBS 20%) est même observée .

D'autre part, en présence d'ionophore A23187 la libération de LDH est plus élevée à  $10^{-4}$  M qu'à  $10^{-5}$  M.

Une libération de LDH est également observée au niveau des boîtes incubées avec le TNF et le PMSF.

### Observations morphologiques

Lors de la même expérience les cellules d'une boîte de chaque type de milieu testé ont été photographiées après 20 minutes et deux heures d'incubation.

Les photographies et leurs commentaires sont présentés à la planche 1.

**Planche 1: Photographies prises au microscope inversé à contraste de phase**  
 (grossissement:115X) d'un même champ de cellules endothéliales après 20 minutes (page de gauche) et 2 heures (page de droite) dans différents milieux d'incubation:

Numéro de la photo	Molécules ajoutées au milieu M199 + sérum 20 %	Temps d'incubation
1	/	20 minutes
2	/	2 heures
3	TNF (200 ng/ml)	20 minutes
4	TNF (200 ng/ml)	2 heures
5	TNF (200 ng/ml) + PMSF 0.5 mM	20 minutes
6	TNF (200 ng/ml) + PMSF 0.5 mM	2 heures
7	ionophore A23187 $10^{-5}$ M	20 minutes
8	ionophore A23187 $10^{-5}$ M	2 heures
9	ionophore A23187 $10^{-4}$ M	20 minutes
10	ionophore A23187 $10^{-4}$ M	2 heures

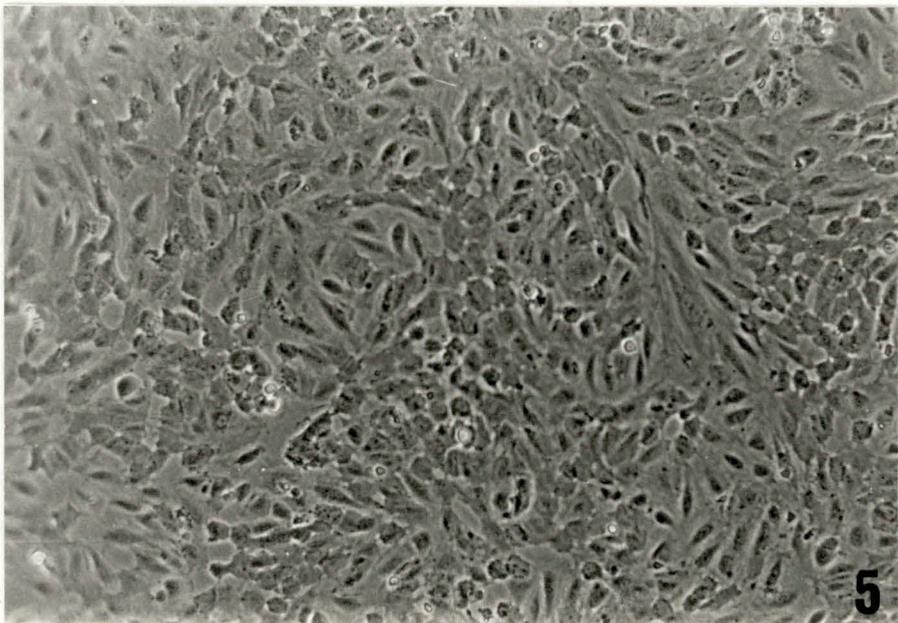
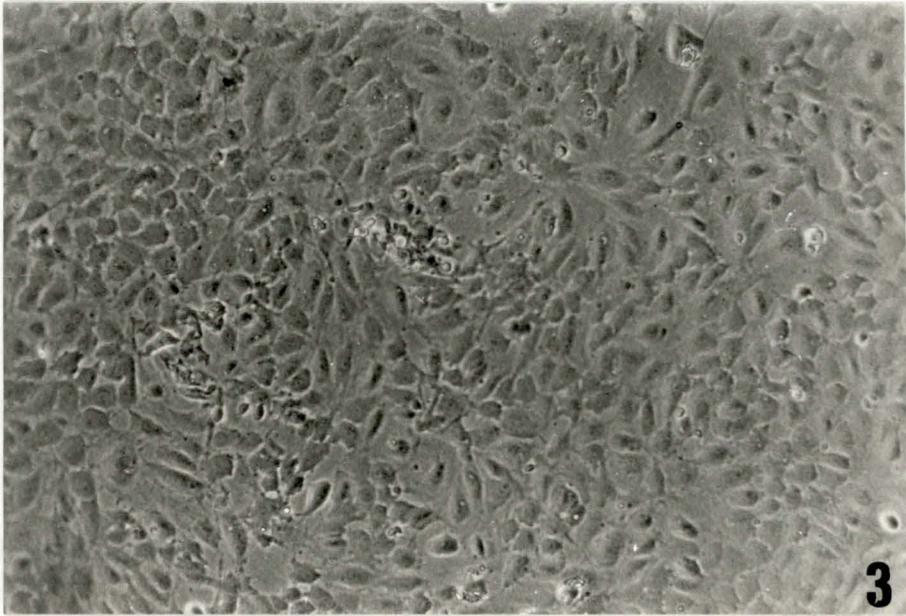
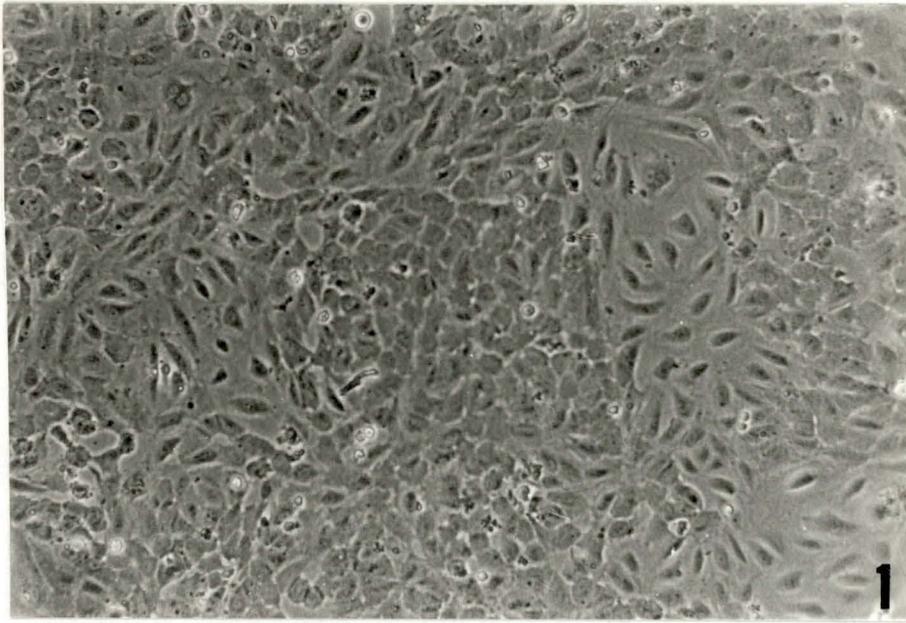
Photos numéros 1 à 6: aucun changement morphologique du tapis cellulaire formé de cellules polygonales n'est perceptible.

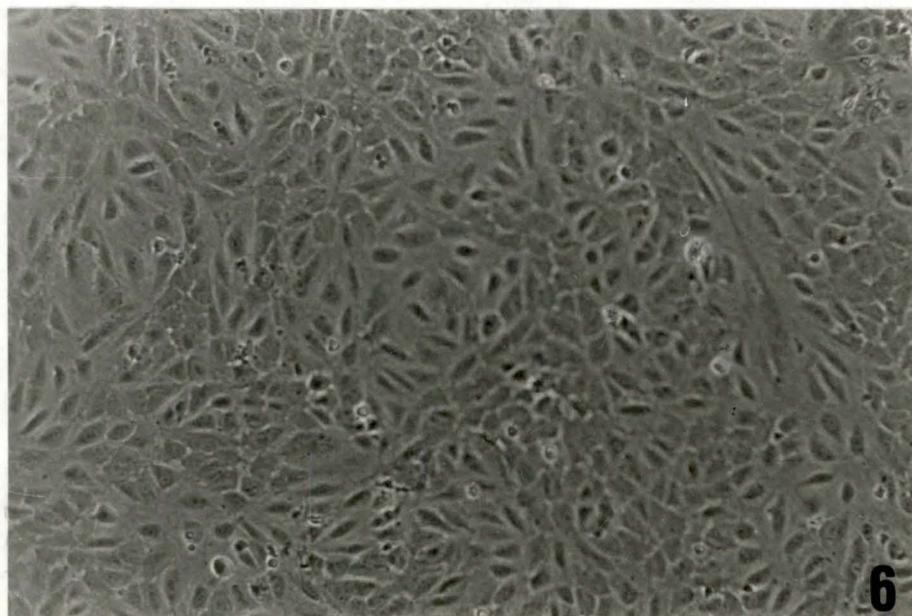
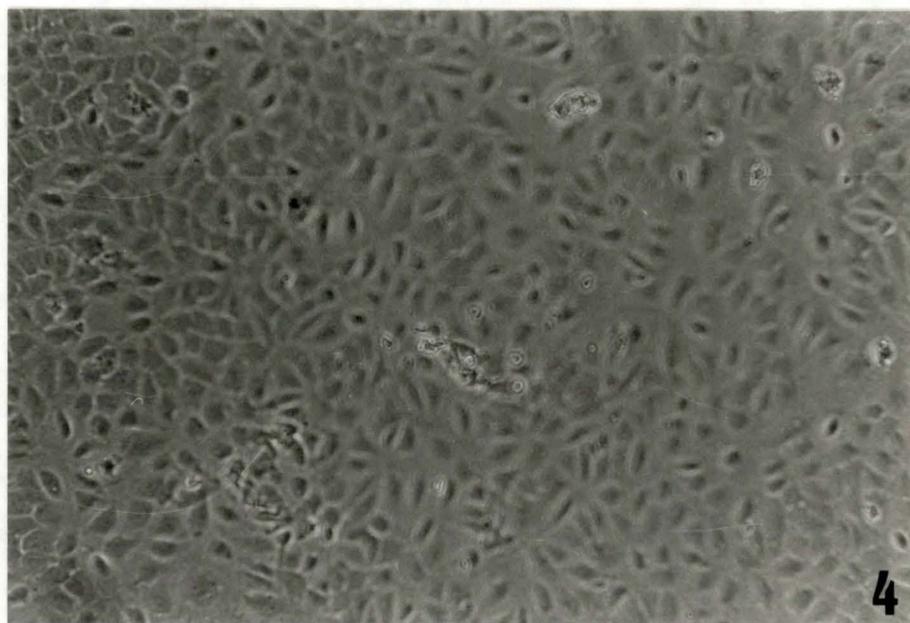
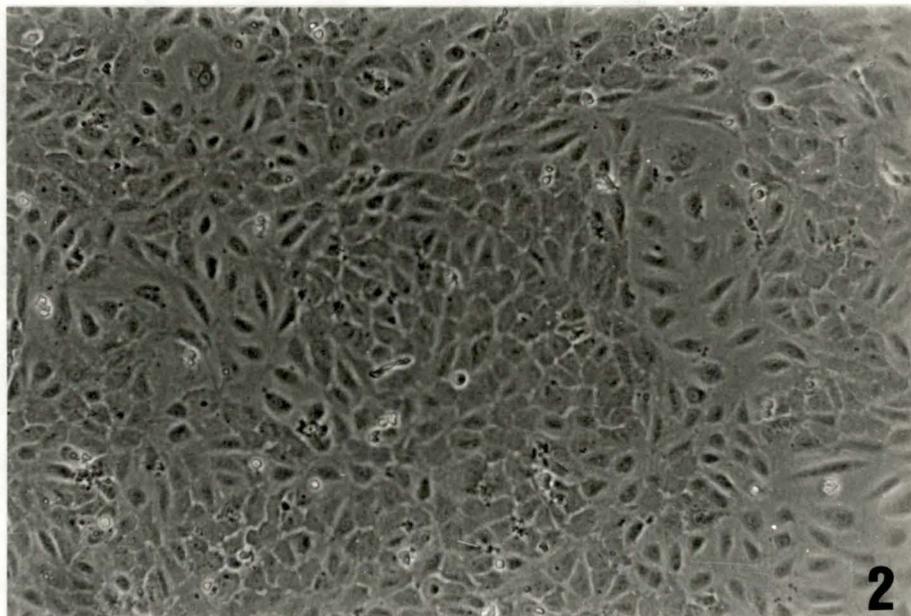
Photo numéro 7: nous observons un début de rétraction cellulaire. Un halo clair ( ↗ ) met en évidence des cellules en voie de détachement.

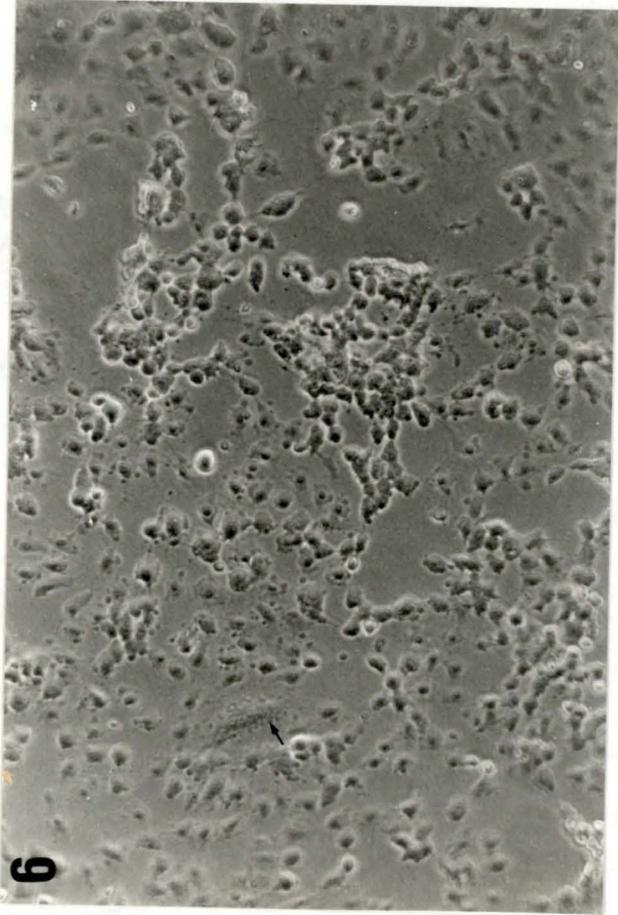
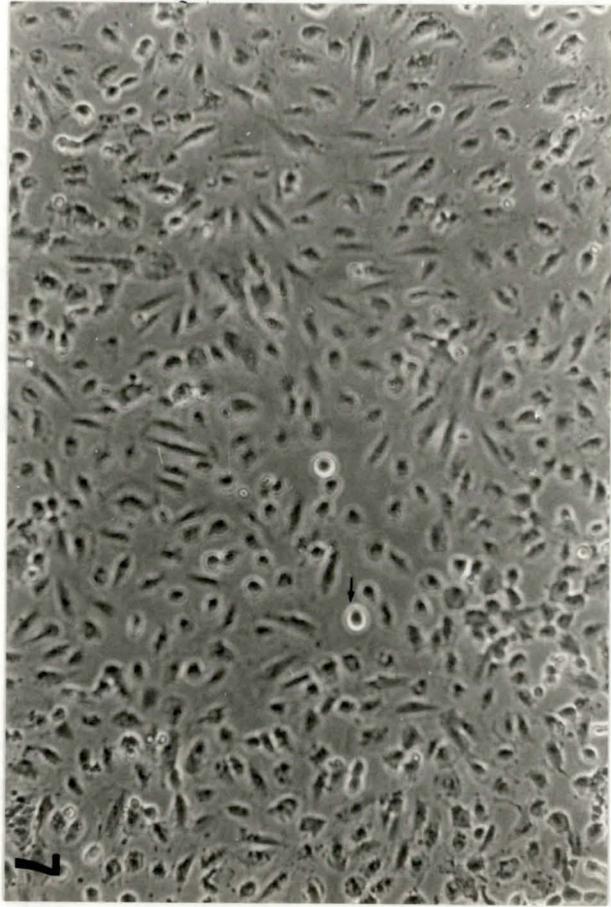
Photo numéro 8: les cellules présentent le même aspect que celui observé sur la photo numéro 7.

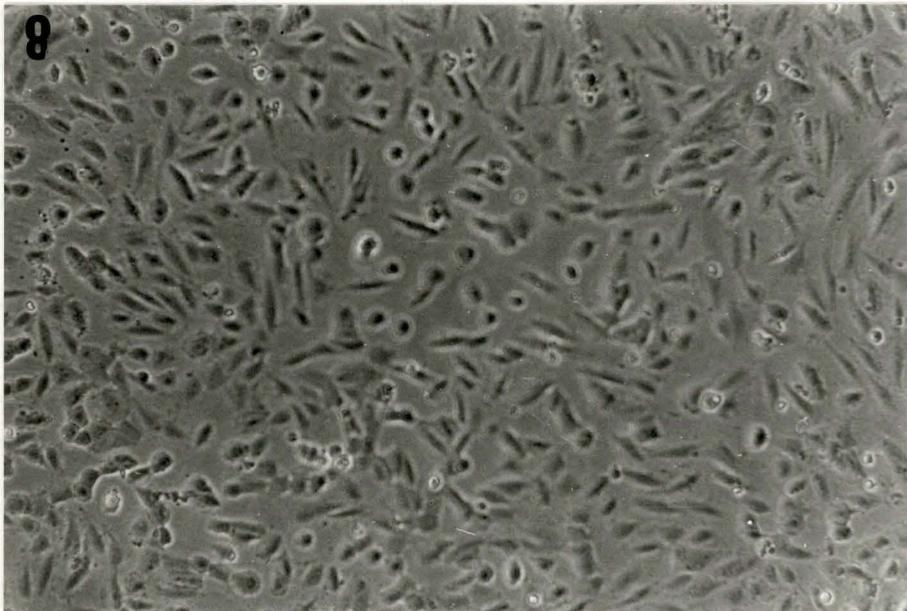
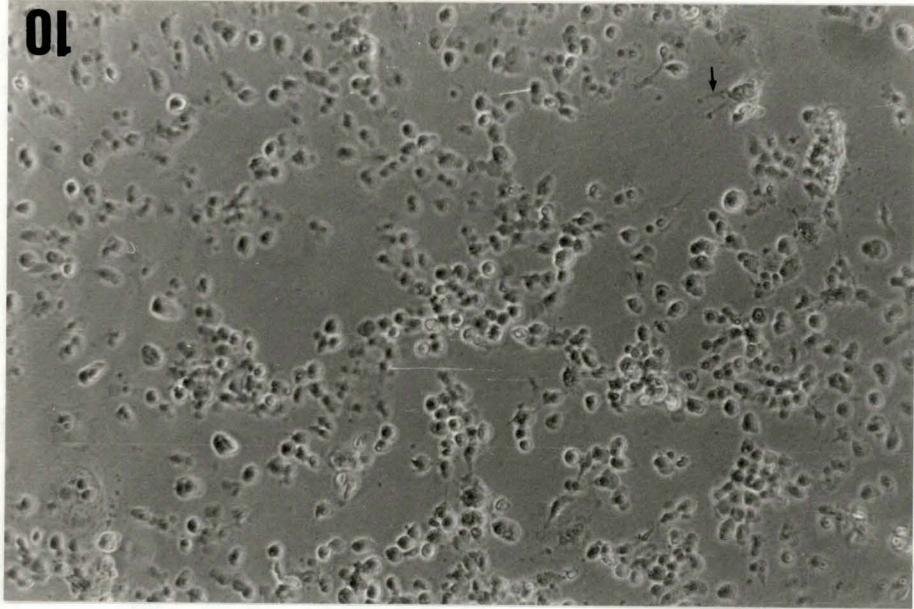
Photo numéro 9: la plupart des cellules sont rétractées. Bon nombre d'entre elles présentent de "blebs" ( ↗ ) à leur surface.

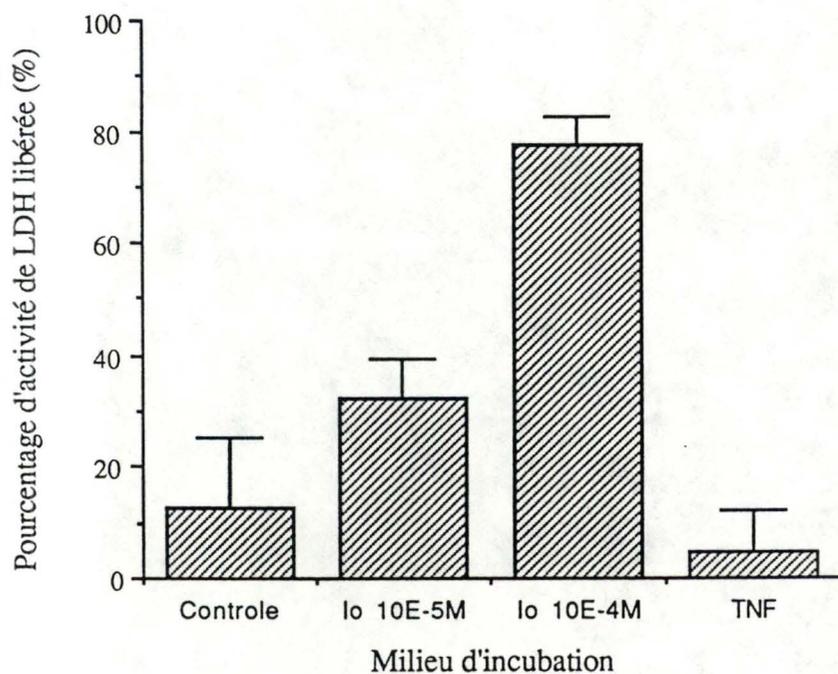
Photo numéro 10: la rétraction est accentuée. On note des fibres d'ancrage ( ↗ ) au niveau de certaines cellules.











**Fig. 5:** Effet du TNF sur le pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales pendant 24 heures.  
Les cellules ont été incubées pendant 24 heures dans du milieu (M199) contenant 20% de sérum (NBS):

- seul (contrôle).
- avec de l'ionophore A23187  $10^{-5}$  M (Io 10E-5 M).
- avec de l'ionophore A23187  $10^{-4}$  M (Io 10E-4 M).
- avec 200 ng de TNF/ml.

Chaque valeur représente la moyenne de 3 boîtes  $\pm$  1 écart-type.  
Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.

### 2.3.2. Incubation d'une durée de 24 heures

La même expérience que la précédente a été réalisée sur une période d'incubation de 24 heures (seul le test en présence de PMSF n'a pas été reproduit). Trois boîtes par type de milieu de culture ont été incubées. Les cellules étaient subconfluentes.

#### Dosage de la LDH

Nous avons réalisé les mêmes mesures que lorsque le temps d'incubation était limité à 2 heures.

La figure 5 montre le pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules en fonction du milieu d'incubation.

Cette fois, une libération de LDH est observée aussi bien au niveau des boîtes contrôles que dans celles traitées au TNF. Toutefois, elle est plus faible en présence de TNF. Les cellules mises en présence d'ionophore A23187 ont libéré de la LDH en plus grande quantité que celles du contrôle et celles incubées avec du TNF. L'effet lytique de l'ionophore est plus prononcé à  $10^{-4}$  M qu'à  $10^{-5}$  M.

#### Observations morphologiques

Dans cette même expérience, pour chaque type de milieu testé, les cellules ont été photographiées sur une boîte après 2 minutes et au terme des 24 heures d'incubation.

Les photographies et les commentaires qui s'y rapportent sont présentés à la planche 2.

### 2.2.3. Incubation d'une durée de 48 heures

L'expérience a été réalisée de la même manière que la précédente mais sur une période d'incubation de 48 heures. Cependant, les cellules n'ont pas été photographiées. Les cellules étaient subconfluentes. Après 48 heures, les mêmes mesures d'activité LDH que dans les deux expériences précédentes ont été réalisées.

Planche 2: Photographies au microscope inversé à contraste de phase (grossissement: 115X) d'un même champ de cellules endothéliales après 2 minutes (page de gauche) et 24 heures (page de droite) dans différents milieux d'incubation:

Numéro de la photo	Molécules ajoutées au milieu M199 + sérum 20 %	Temps d'incubation
1	/	2 minutes
2	/	24 heures
3	TNF (200 ng/ml)	2 minutes
4	TNF (200 ng/ml)	24 heures
5	ionophore A23187 $10^{-5}$ M	2 minutes
6	ionophore A23187 $10^{-5}$ M	24 heures
7	ionophore A23187 $10^{-4}$ M	2 minutes
8	ionophore A23187 $10^{-4}$ M	24 heures

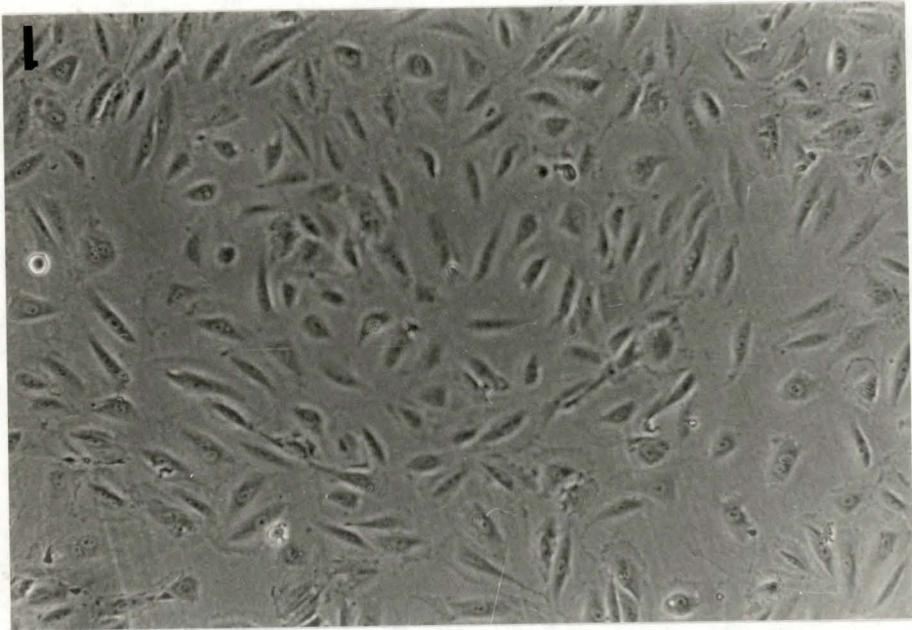
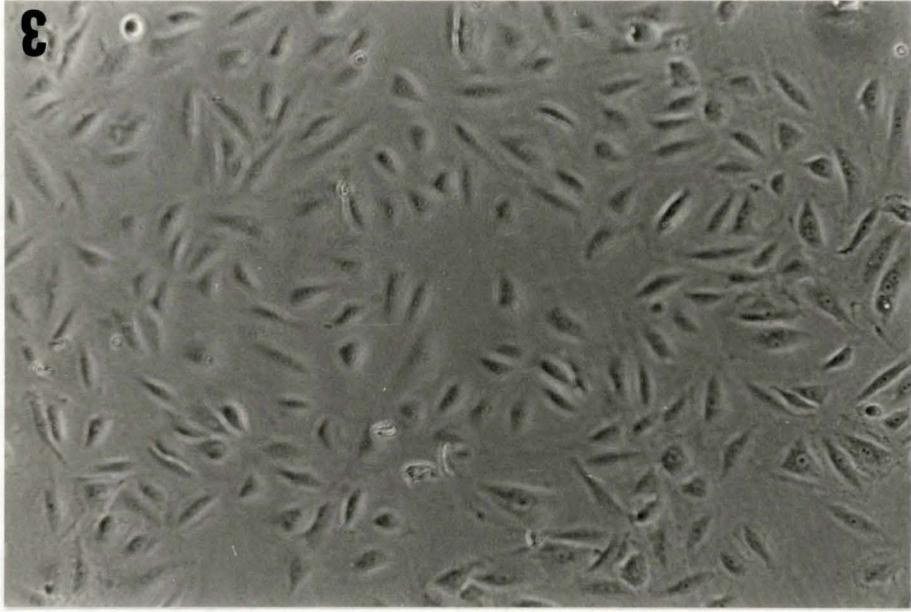
Photos numéros 1 à 4: aucun changement n'est observé au niveau de la morphologie de ces cellules subconfluentes.

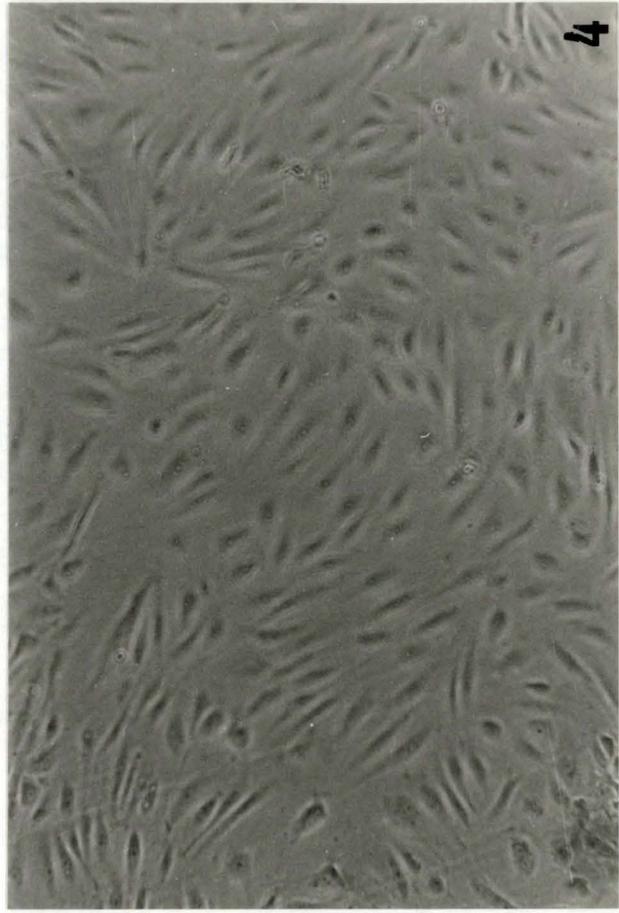
Photo numéro 5: malgré le caractère flou du cliché, on peut noter une bonne adhérence cellulaire.

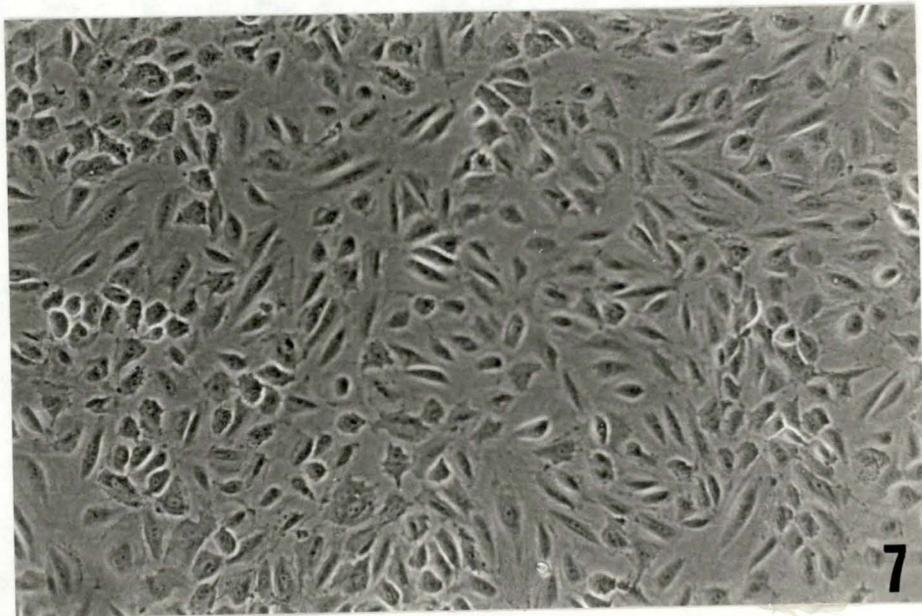
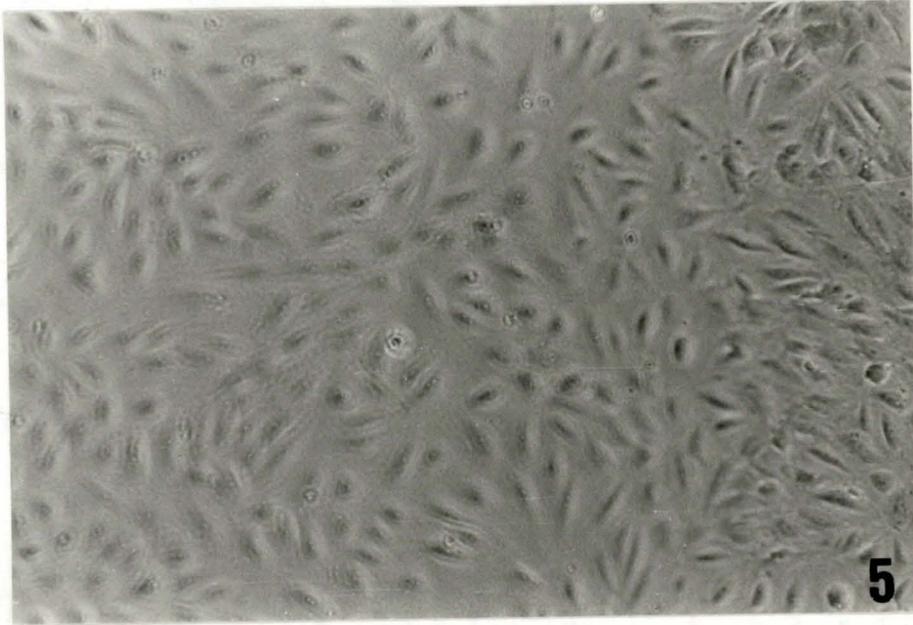
Photo numéro 6: un certain nombre de cellules sont en voie de détachement.

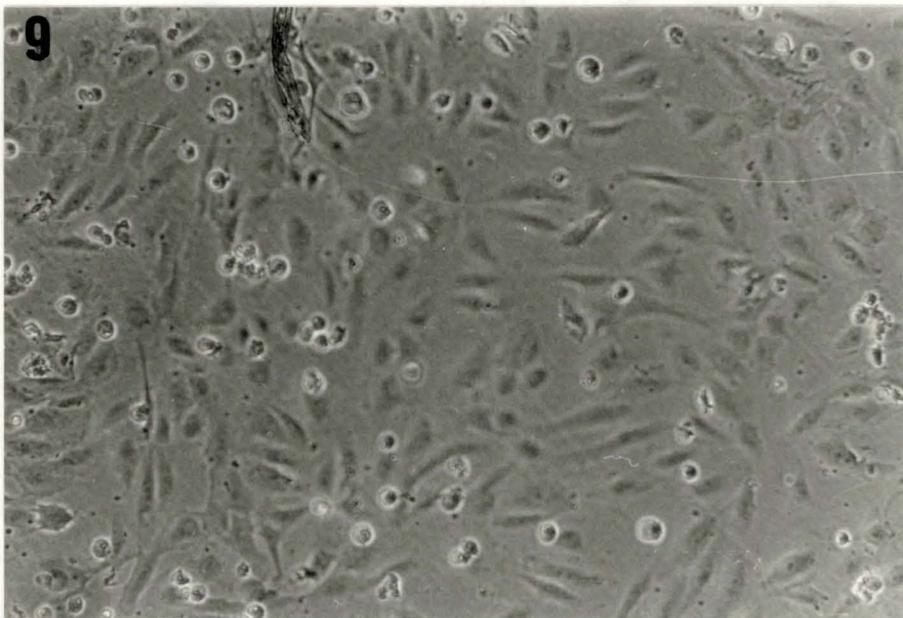
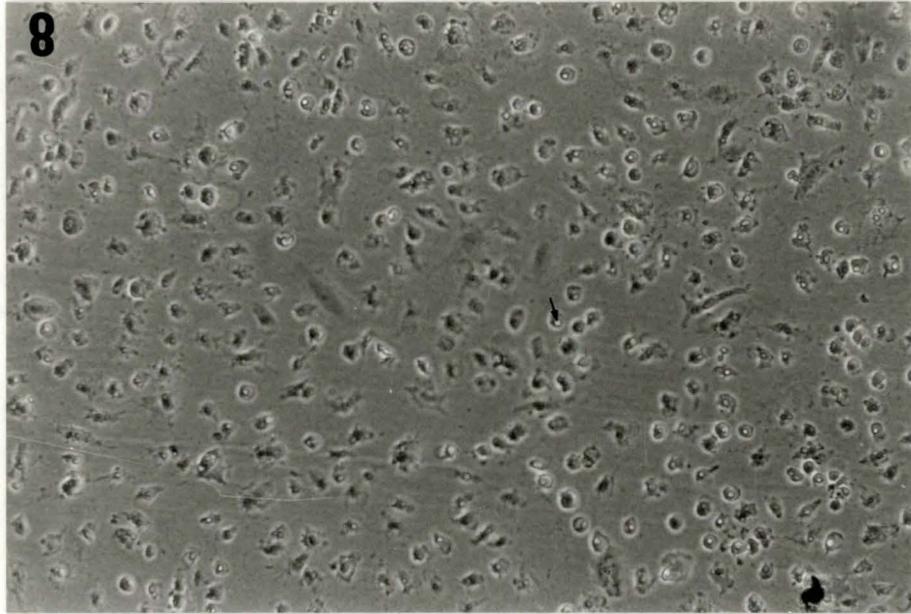
Photo numéro 7: la rétraction cellulaire débute: un halo clair entoure plusieurs cellules en voie de soulèvement.

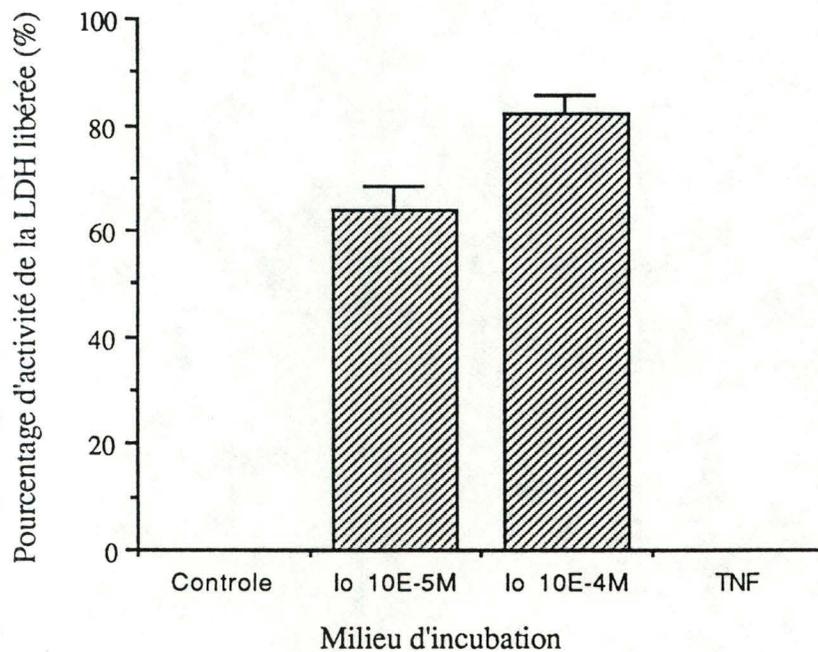
Photo numéro 8: une grande majorité des cellules sont rétractées. La zone blanche ( / ) perçue au centre de certaines cellules représente le noyau faisant protrusion à la surface des cellules rétractées.











**Fig. 6:** Effet du TNF sur le pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales pendant 48 heures. Les cellules sont incubées pendant 48 heures dans du milieu (M199) contenant 20% de sérum (NBS):

- seul (contrôle).
- avec de l'ionophore A23187  $10^{-5}$  M (Io 10E-5 M).
- avec de l'ionophore A23187  $10^{-4}$  M (Io 10E-4 M).
- avec 200 ng de TNF/ml.

Chaque valeur représente la moyenne de 3 boîtes  $\pm$  1 écart-type. Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.

La figure 6 indique le pourcentage d'activité LDH libérée par les cellules endothéliales en fonction du milieu d'incubation.

Aucune libération n'est observée que ce soit en absence ou en présence de TNF. En fait, il y a même une diminution de l'activité LDH dans le surnageant cellulaire des boîtes contrôles et des boîtes traitées au TNF, par rapport à l'activité due au sérum. Cette baisse d'activité est plus importante en présence de TNF que dans le contrôle.

### **3. EFFET DU TNF SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE**

#### 3.1. Effet du TNF sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine par les cellules endothéliales

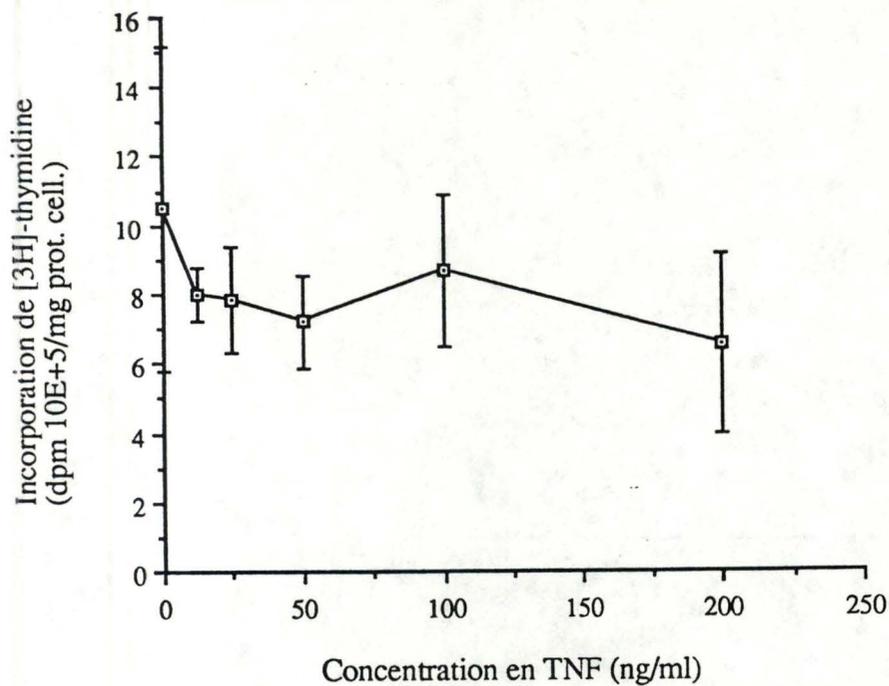
##### 3.1.1 Première expérience

Dans cette expérience, les cellules ont été incubées pendant 24 heures en présence de différentes concentrations en TNF comprises entre 0 et 200 ng/ml. La [<sup>3</sup>H]-thymidine a été ajoutée au milieu de culture 12 heures avant la fin de l'incubation. Trois cupules ont été incubées par concentration.

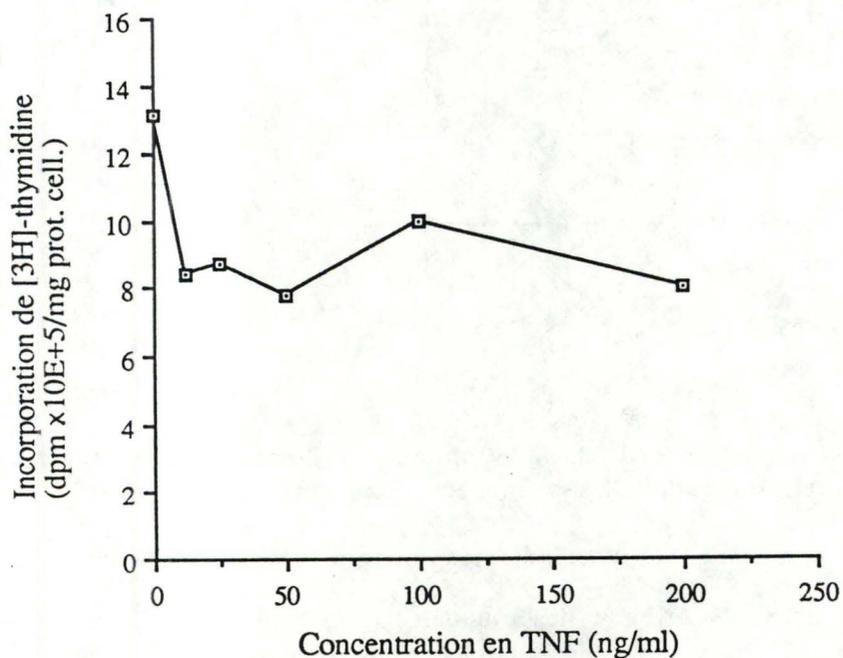
Lorsque les trois valeurs d'incorporation ont été obtenues pour chaque concentration, nous avons remarqué que pour trois concentrations (100, 200 et surtout 0 ng/ml) sur six, une des trois valeurs était fort éloignée des deux autres ce qui engendre une forte variabilité de l'incorporation de thymidine à ces concentrations (voir figure 7.A).

En conséquence, l'analyse de la variance conclut à un effet non significatif du TNF sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine par les cellules endothéliales. C'est pourquoi il nous a semblé utile d'écarter la valeur la plus éloignée des deux autres pour chaque concentration. La moyenne de ces deux valeurs a alors été présentée en fonction de la concentration en TNF sur le graphe de la figure 7.B.

A



B

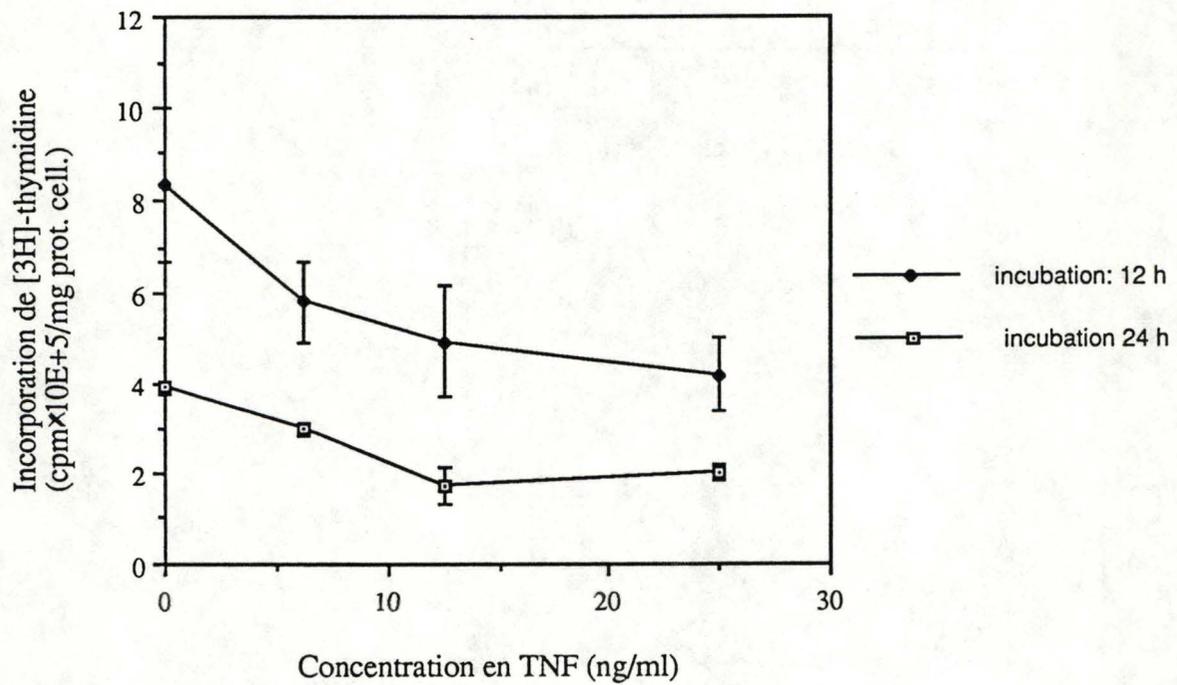


**Fig. 7:** Effet de la concentration en TNF dans le milieu sur l'incorporation de  $[^3\text{H}]$ -thymidine par les cellules endothéliales après 24 heures d'incubation. La  $[^3\text{H}]$ -thymidine ( $1 \mu\text{Ci/cupule}$ ) a été ajoutée 12 heures avant la fin de l'incubation.

**A.** Chaque point représente la moyenne de 3 cupules  $\pm$  1 écart-type.

**B.** Pour la même expérience, chaque point représente la moyenne des 2 cupules dont les valeurs sont les plus proches l'une de l'autre.

Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.



**Fig. 8:** Effet de la concentration en TNF dans le milieu sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine par les cellules endothéliales incubées pendant 12 heures et 24 heures.

La [<sup>3</sup>H]-thymidine (1  $\mu$ Ci/cupule) a été ajoutée 6 heures avant la fin de l'incubation.

Chaque point représente la moyenne de 3 cupules  $\pm$  1 écart-type.

Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.

On remarque alors que le niveau d'incorporation du contrôle augmente fortement, ce qui s'explique par le fait que pour ce contrôle, la valeur écartée était particulièrement éloignée des deux autres (elle était plus de deux fois plus faible que chacune des deux autres). Ainsi, la figure 7.B nous montre une diminution sensible de l'incorporation de thymidine tritiée par rapport au contrôle, en présence de TNF dès la plus faible concentration utilisée (12,5 ng/ml). Au delà de cette concentration, le niveau d'incorporation de thymidine aurait tendance à se stabiliser

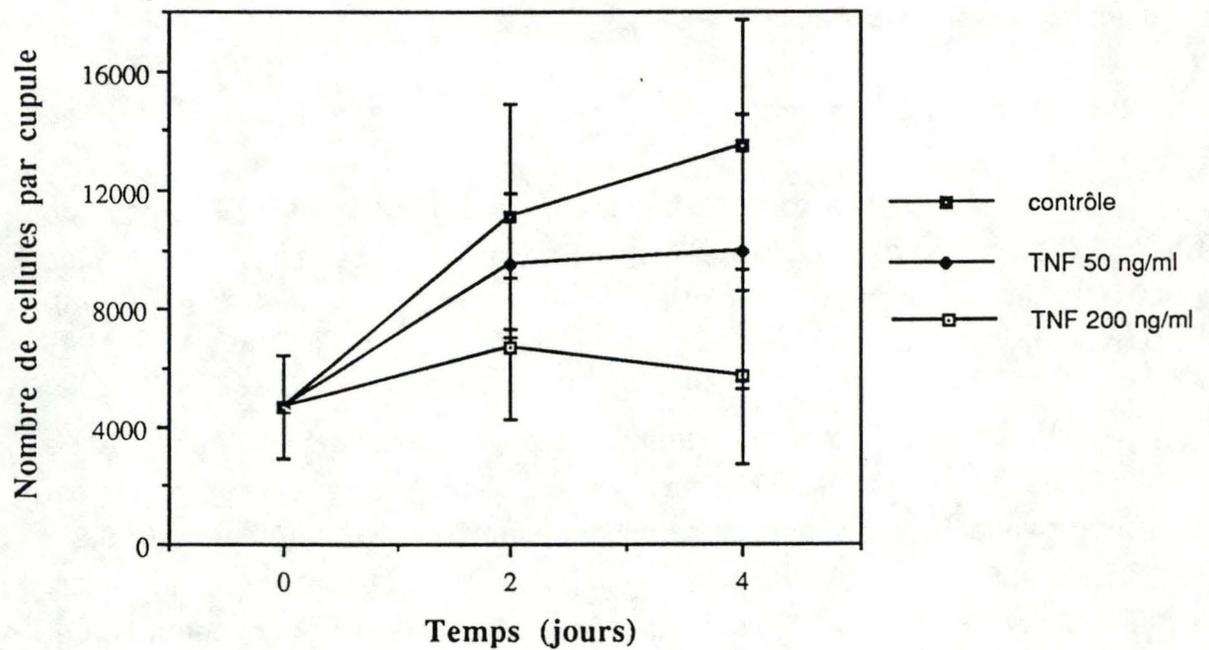
### 3.1.2. Deuxième expérience

Cette expérience consiste à détailler l'action du TNF sur l'incorporation de [3H]-thymidine dans la zone de concentration comprise entre 0 et 50 ng/ml, comme envisagé dans la discussion de l'expérience précédente (voir "Discussion" 2.1.)

Les cellules (provenant d'une seule boîte) repiquées dans une plaque multipuits de 24 cupules sont divisées en deux groupes. Le premier est incubé pendant 12 heures à des concentrations en TNF différentes (0; 6,25; 12,5; 25 et 50 ng/ml). Le deuxième groupe est incubé pendant 24 heures aux mêmes concentrations. Trois cupules ont été incubées par concentration et par temps d'incubation. Les incubations de 12 et 24 heures ont débuté en même temps. La [3H]-thymidine (1  $\mu$ Ci/cupule) a été ajoutée au milieu de culture 6 heures avant la fin de chacune des deux durées d'incubation.

La figure 8 représente l'incorporation de [3H]-thymidine en fonction de la concentration en TNF pour les deux durées d'incubation.

Une baisse de l'incorporation de [3H]-thymidine par les cellules endothéliales est observée lorsque la concentration en TNF augmente. Cette diminution est observée pour les deux durées d'incubation. L'analyse statistique permet de dire que la concentration du TNF a un effet hautement significatif sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules endothéliales. Le niveau d'incorporation observé est plus élevé pour 12 heures d'incubation que pour 24 heures.



**Fig. 9:** Effet du TNF sur la prolifération des cellules endothéliales. Méthode du comptage de cellules sur chambre de Bürcker.  
 Les cellules ont été incubées pendant différents temps dans du milieu (199) contenant 20% de sérum (NBS) et du TNF à 3 concentrations différentes (0, 50 et 200 ng/ml).  
 Pour le jour 0, le point représente la moyenne de 12 cupules  $\pm$  1 écart-type.  
 Pour le deuxième et quatrième jour, chaque point représente la moyenne de 6 cupules  $\pm$  1 écart-type.

### 3.2. Estimation de l'effet du TNF sur la prolifération des cellules endothéliales par quantification de cellules

#### 3.2.1. Méthode par comptage de cellules sur chambres de Bürcker

Les cellules endothéliales repiquées à raison de 15000 par cupule et incubées avec trois concentrations en TNF (0, 50, 200 ng/ml) ont été comptées 1, 3 et 5 jours après le repiquage (correspond aux jours 0, 2 et 4 sur le graphe de la figure 9). Les résultats sont présentés à la figure 9.

Cette expérience semble, à première vue, montrer un effet inhibiteur du TNF sur la prolifération des cellules endothéliales. Cependant, la variabilité des mesures est fort élevée. De plus, pour les cellules traitées au TNF à la concentration 200 ng/ml, le comptage ne met en évidence aucune augmentation de leur nombre, alors qu'en observant les cellules au microscope, il était manifeste que ce nombre était plus élevé au quatrième jour qu'au premier.

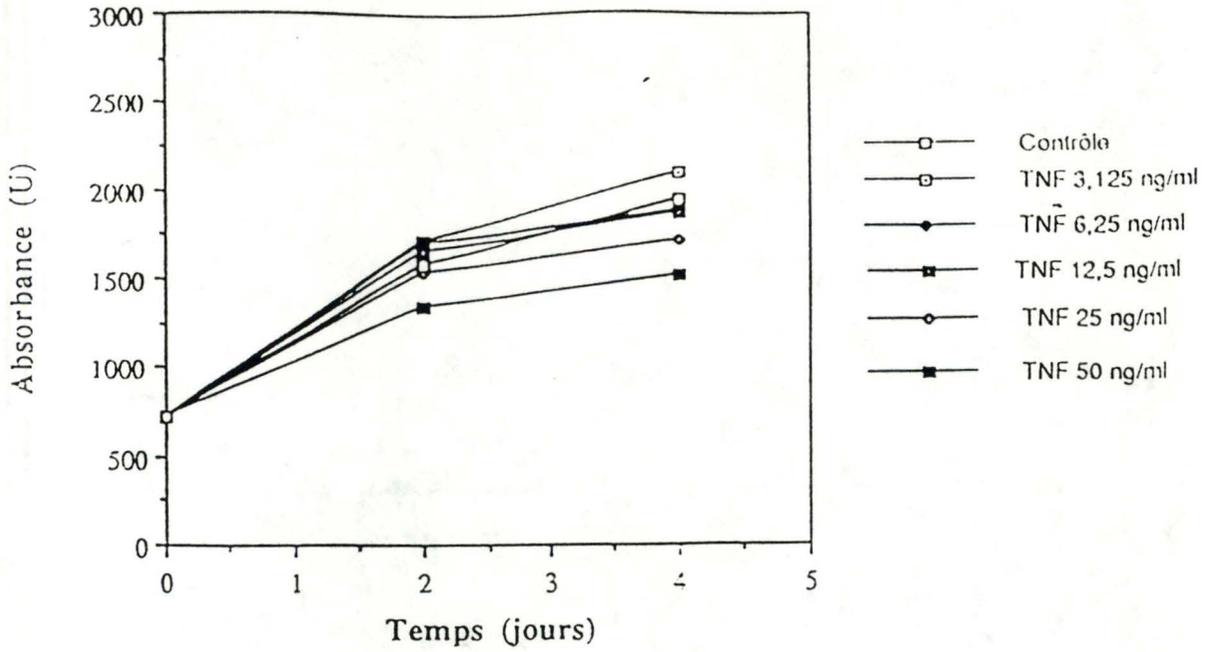
Il faut noter aussi que les cellules ayant été incubées à raison de 15000 par cupule, on n'en compte qu'environ 5000 le jour suivant.

#### 3.2.2. Méthode au cristal violet

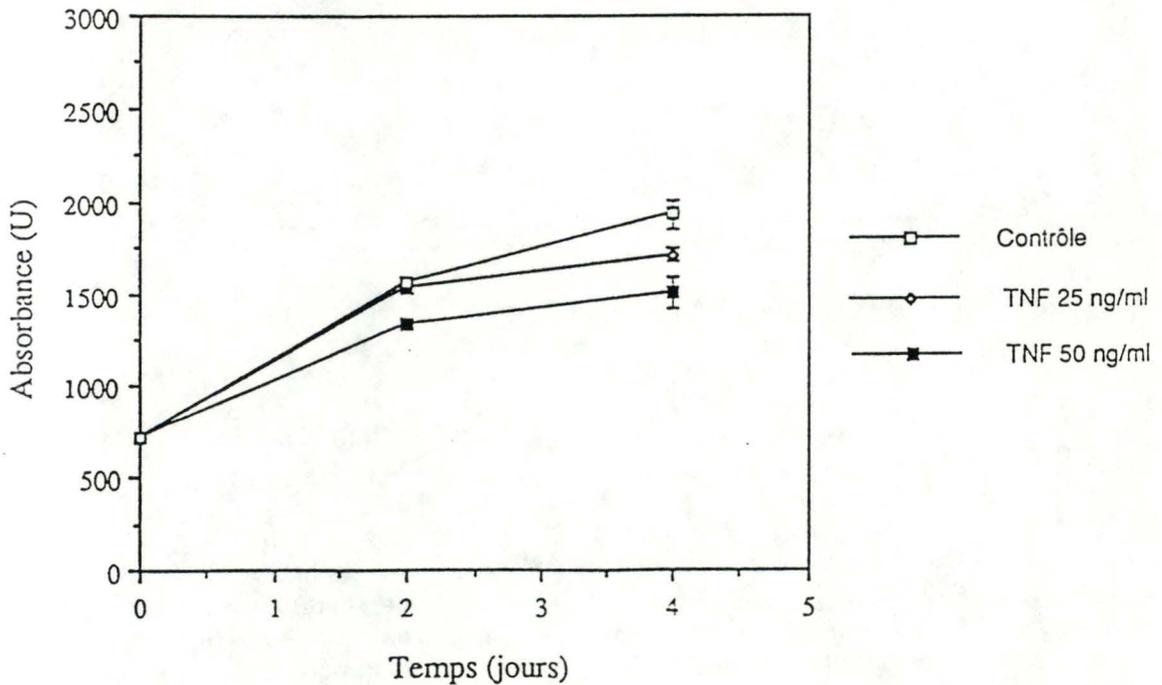
Les cellules endothéliales repiquées à raison de 10000 par cupule ont été fixées et colorées au cristal violet 1, 3 et 5 jours après le repiquage (correspond aux jours 0, 2 et 4 sur les figures 10.A et 10.B). Le milieu M199 + NBS 20% contenant différentes concentrations en TNF (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 et 50 ng/ml) a été rajouté au jour 0.

La figure 10.A décrit les courbes de croissance obtenues aux différentes concentrations en TNF. On remarque un effet inhibiteur du TNF sur la croissance des cellules endothéliales pour les concentrations en TNF de 25 et 50 ng/ml. L'effet est plus accentué à 50 ng/ml. Aux plus basses concentrations utilisées, les cellules endothéliales présentent une courbe de croissance proche de celle des cellules contrôles.

A



B



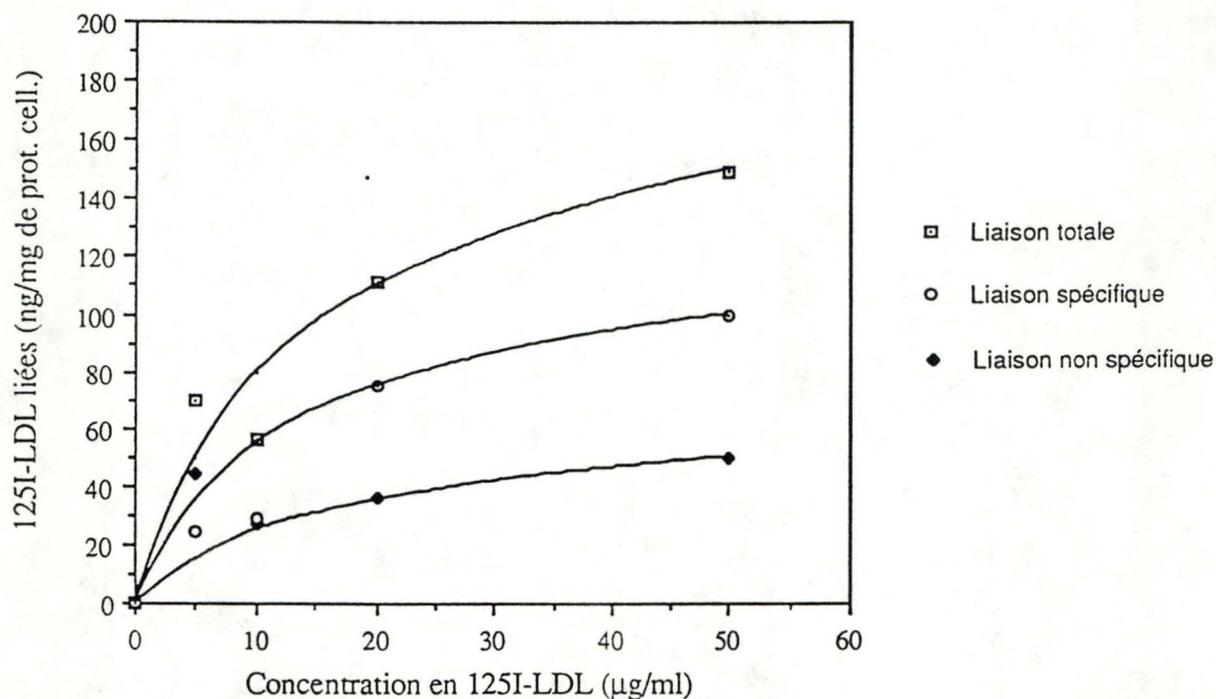
**Fig. 10:** Effet du TNF sur la prolifération des cellules endothéliales. Méthode au cristal violet.

Les cellules ont été incubées pendant différents temps dans du milieu (M199) contenant 20% de sérum et du TNF à différentes concentrations. Au jour 0, le point représente la moyenne de 12 cupules ( $\pm 1$  écart-type). Au deuxième et quatrième jour, chaque point représente la moyenne de 6 cupules ( $\pm 1$  écart-type).

**A.** Graphe reprenant les évolutions de croissance cellulaire pour toutes les concentrations en TNF utilisées. Par souci de clarté, les écarts-type n'ont pas été représentés.

**B.** Graphe ne reprenant, par souci de clarté, que l'évolution de croissance cellulaire en absence de TNF et en présence de 25 et 50 ng de TNF/ml.

Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.



**Fig. 11:** Liaison des  $^{125}\text{I-LDL}$  aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en  $^{125}\text{I-LDL}$  dans le milieu d'incubation. Les cellules ont été préincubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 36 heures, avec du milieu (M199) contenant 10% de LPDS. Ensuite, les cellules ont été incubées, pendant 2 heures, à  $4^\circ\text{C}$ , dans du milieu (M199) contenant 10% de LPDS et différentes concentrations en  $^{125}\text{I-LDL}$  (+ LDL non marquées en excès pour la liaison non spécifique.). Chaque point représente la moyenne de 2 expériences. La liaison spécifique a été calculée en retirant la valeur de la liaison non spécifique à la liaison totale correspondante. Cette expérience a été réalisée avec des cellules endothéliales en première sous-culture.

La figure 10.B montre, pour plus de clarté, uniquement les courbes de croissance à 25 et 50 ng de TNF/ml comparées à celle du contrôle.

#### **4. EFFET DU TNF SUR LA LIAISON DES $^{125}\text{I}$ -LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE**

##### 4.1. Liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL en fonction de leur concentration dans le milieu de culture

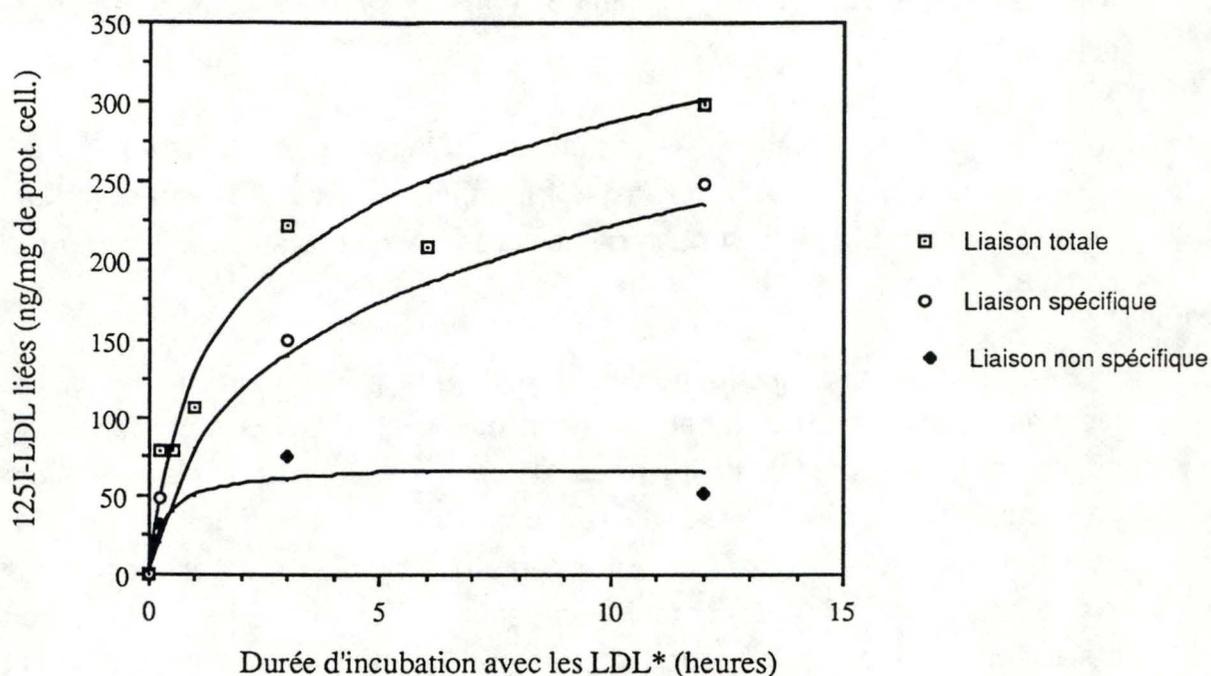
Les cellules ont été cultivées pendant 36 heures dans du M199 + LPDS 10%. Le LPDS, pauvre en cholestérol, permet de stimuler l'expression des récepteurs pour LDL à la surface des cellules endothéliales (van Hinsberg *et al.*, 1983; Poumay, 1988).

Après cette préincubation au LPDS, une partie des cellules a été incubée à 4°C, pendant 2 heures, dans du M199 + LPDS 10% contenant différentes concentrations (voir figures 11) en  $^{125}\text{I}$ -LDL, en vue de déterminer la liaison totale des  $^{125}\text{I}$ -LDL sur ces cellules, en fonction de leur concentration dans le milieu. L'autre partie des cellules a été incubée dans les mêmes conditions excepté la présence supplémentaire de LDL non marquées en excès par rapport aux  $^{125}\text{I}$ -LDL, ceci afin de déterminer la liaison non spécifique des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules en fonction de leur concentration dans le milieu.

Les liaisons totales et non spécifique ont été mesurées comme décrit dans "matériel et méthodes"

La figure 11 représente les liaisons totales, spécifiques et non spécifiques des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en  $^{125}\text{I}$ -LDL présente dans le milieu.

Nous voyons une augmentation rapide de la liaison totale aux plus faibles concentrations, la liaison diminue ensuite progressivement aux concentrations plus élevées. A 50 $\mu\text{g/ml}$ , la quantité de LDL liée n'est pas



**Fig. 12:** Liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales pour différents temps d'incubation avec les  $^{125}\text{I}$ -LDL.  
 Les cellules ont été préincubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 48 heures dans du milieu (M199) contenant 10% de LPDS.  
 Ensuite, les cellules ont été incubées à  $4^\circ\text{C}$ , pendant différents temps, avec du milieu (M199) contenant 10% de LPDS et  $10\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL/ml (+ des LDL non marquées en excès pour la liaison non spécifique).  
 Chaque point représente la moyenne de 2 expériences. La liaison spécifique a été calculée en retirant la valeur de la liaison non spécifique à la liaison totale correspondante.  
 Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.

encore stabilisée. La liaison non spécifique augmente plus lentement que la liaison spécifique.

#### 4.2. Liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL en fonction du temps d'incubation avec les $^{125}\text{I}$ -LDL

Les cellules ont été cultivées pendant 48 heures dans du M199 + LPDS 10%. Ensuite, une partie des cellules est incubée à 4°C dans du M199 + LPDS 10% contenant 10  $\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL/ml, pendant différents temps (voir figure 12). Cela permet de mesurer la liaison totale des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales. Les autres cellules sont incubées dans le même milieu mais contenant en plus, des LDL non marquées en excès. La liaison non spécifique est mesurée sur ces cellules pour des temps d'incubation différents.

La liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL en fonction du temps d'incubation est représentée à la figure 12.

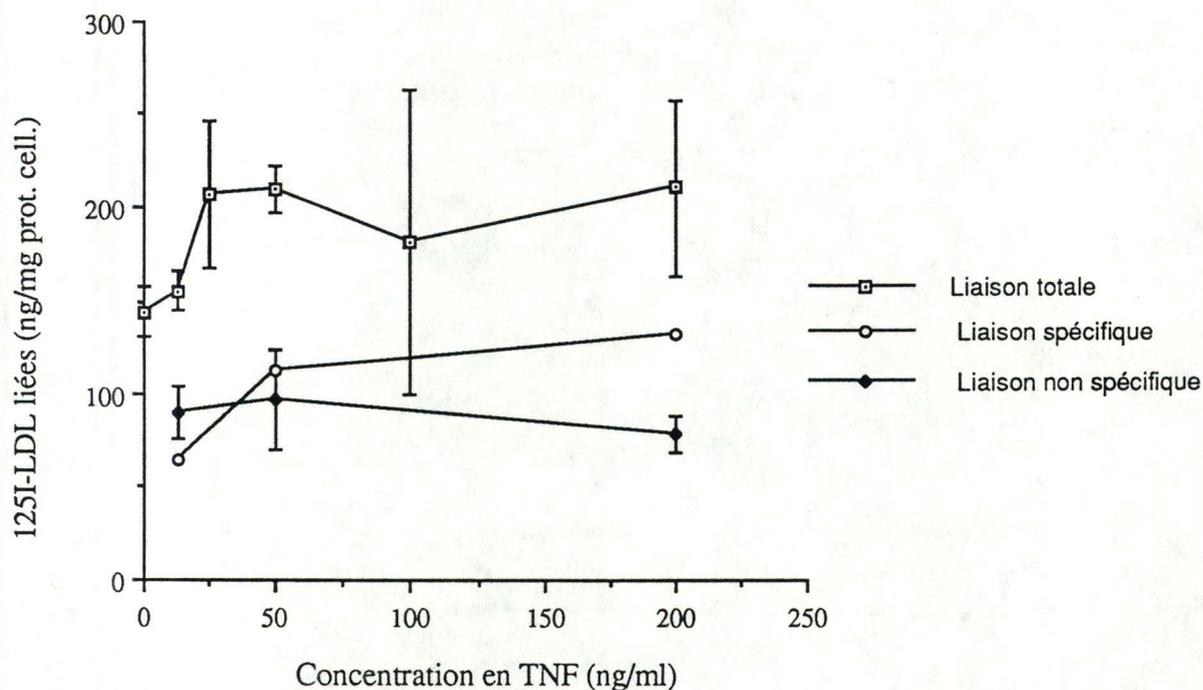
La liaison spécifique ne cesse d'augmenter jusqu'à 12 heures d'incubation bien que l'augmentation de la liaison s'atténue progressivement en fonction du temps d'incubation croissant. La liaison non spécifique atteint rapidement un plateau.

#### 4.3. Effet du TNF sur la liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales

##### 4.3.1. Liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en TNF dans le milieu de culture

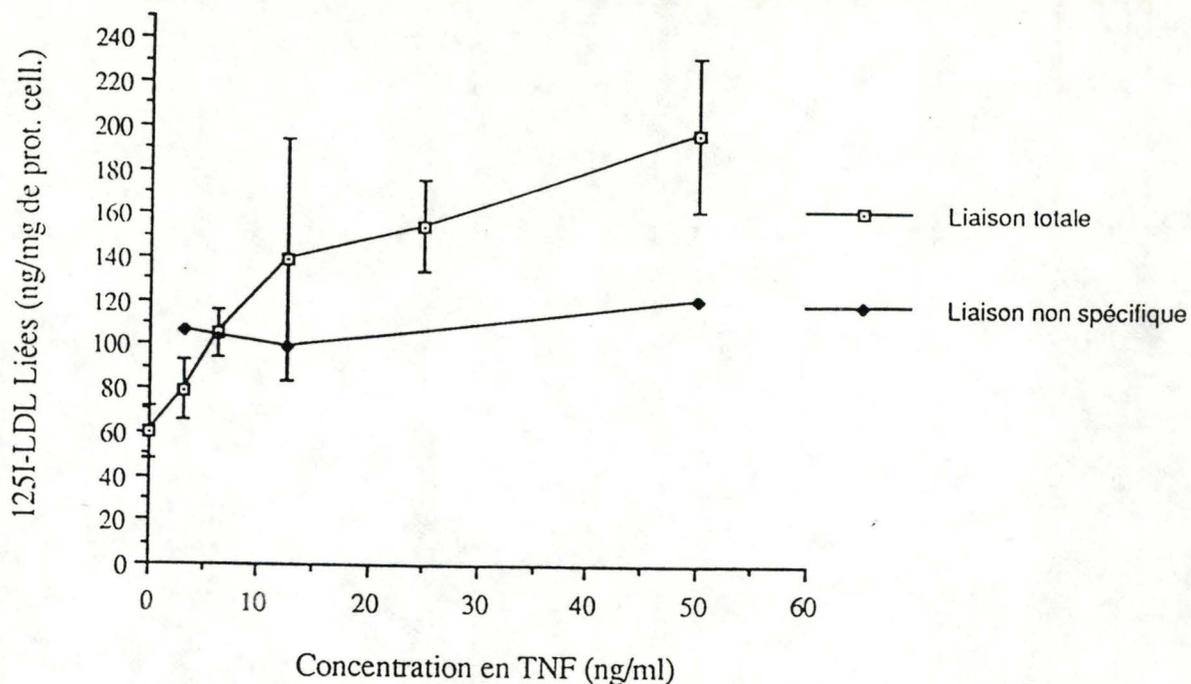
###### A. Première expérience

Les cellules endothéliales ont été préincubées pendant 48 heures à 37°C dans du M199 + LPDS 10% contenant différentes concentrations en TNF (voir figure 13). Ensuite, la liaison totale a été déterminée sur ces cellules, incubées 2 heures à 4°C dans du M199 + LPDS 10% contenant 10  $\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL/ml. La liaison non spécifique a été également mesurée sur

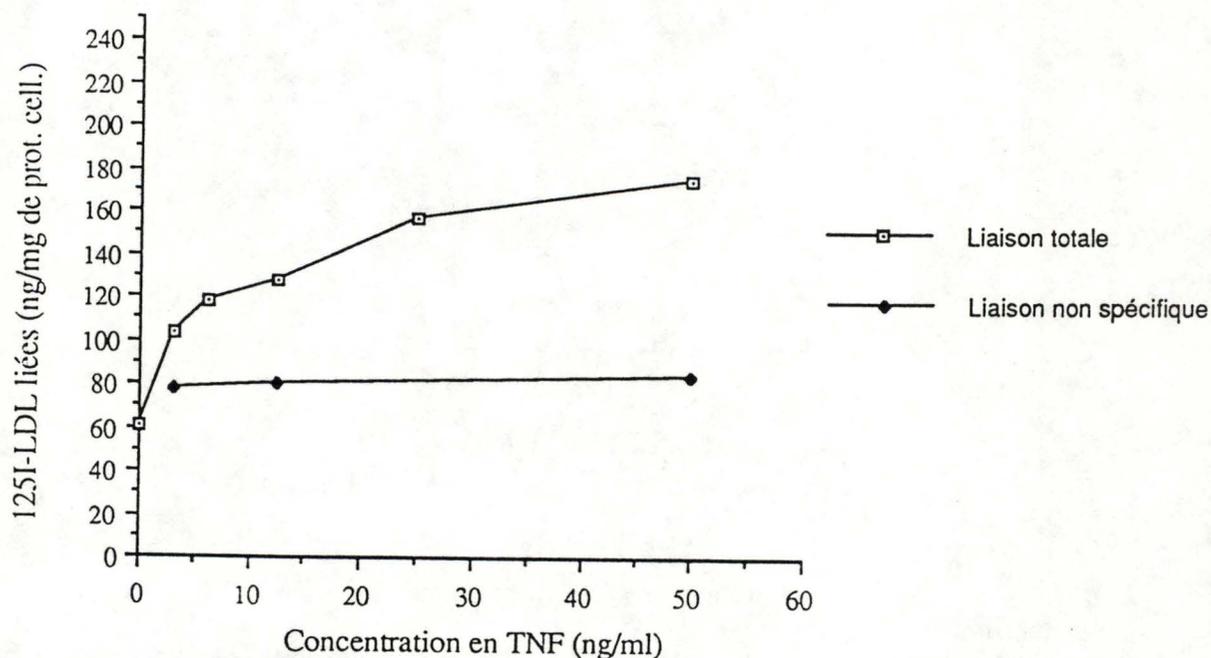


**Fig. 13:** Effet de la concentration en TNF sur la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales. Les cellules ont été préincubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 48 heures, dans du milieu (M199) contenant 10% de LPDS et différentes concentrations en TNF. Ensuite, les cellules ont été incubées à  $4^\circ\text{C}$ , pendant 2 heures, dans du milieu (M199) contenant 10% de LPDS et  $10\ \mu\text{g/ml}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL (+ LDL non marquées en excès pour la liaison non spécifique). Chaque point représente la moyenne de 3 expériences  $\pm 1$  écart-type. La liaison spécifique a été calculée en retirant la valeur de la liaison non spécifique à la liaison totale correspondante. Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales en première sous-culture.

A



B



**Fig. 14:** Effet de la concentration en TNF sur la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales.

Les cellules ont été préincubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 48 heures, dans du milieu (M199) contenant 10% de LPDS et différentes concentrations en TNF.

Ensuite, les cellules ont été incubées, à  $4^\circ\text{C}$ , pendant 2 heures, dans du milieu (M199) contenant 10% de LPDS et  $10\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL/ml (+ LDL non marquées en excès pour la liaison non spécifique).

La liaison spécifique a été calculée en retirant la valeur de la liaison non spécifique à la liaison totale correspondante.

**A.** Résultats d'une expérience.

Pour la liaison totale, chaque point représente la moyenne de 3 cupules  $\pm 1$  écart-type.

Pour la liaison non spécifique, chaque point représente la moyenne de 2 cupules.

**B.** Moyennes des résultats de 2 expériences.

Cette expérience a été réalisée sur des cellules endothéliales

d'autres cellules, incubées dans le même milieu mais en présence d'un excès de LDL non marquées.

La figure 13 montre la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en TNF dans le milieu de préincubation.

Une augmentation de la liaison totale semble avoir lieu lorsqu'on met les cellules en présence de TNF. L'effet observé est maximal à partir de 25 ng de TNF/ml et paraît se stabiliser. La liaison non spécifique ne semble pas affectée par la concentration en TNF. Puisque la liaison non spécifique varie peu en fonction de la concentration en TNF, l'évolution de la liaison spécifique est parallèle à celle de la liaison totale. La liaison spécifique augmente dans la zone de concentration comprise entre 0 et 50 ng de TNF/ml.

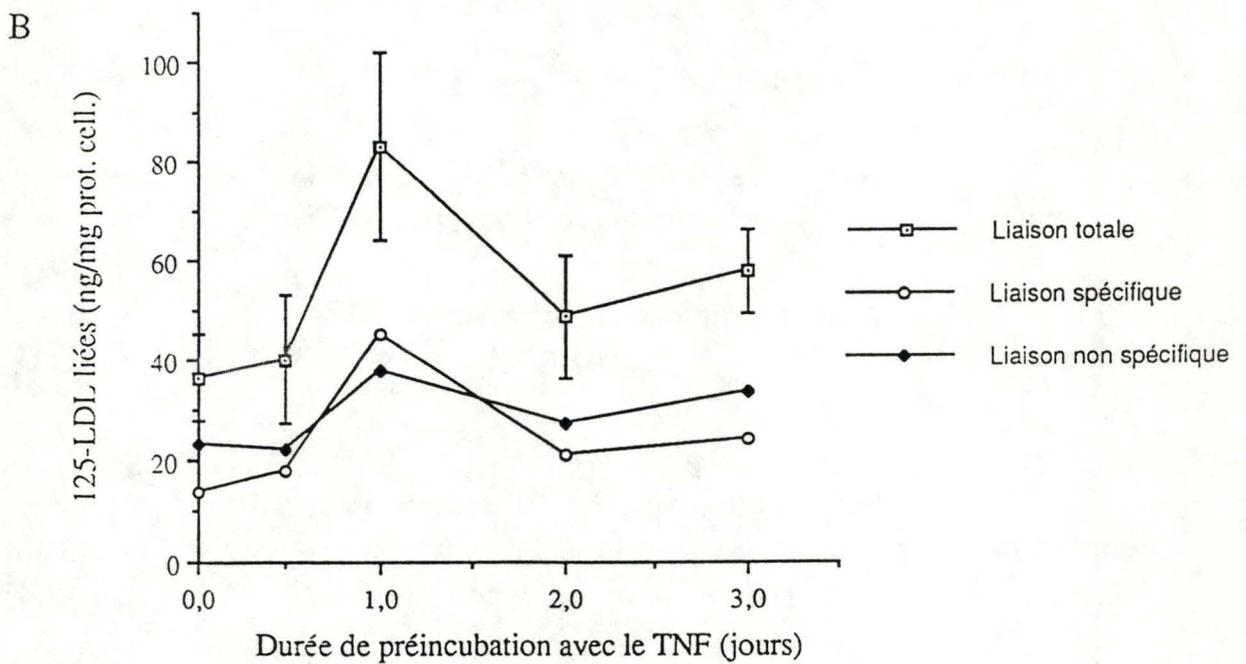
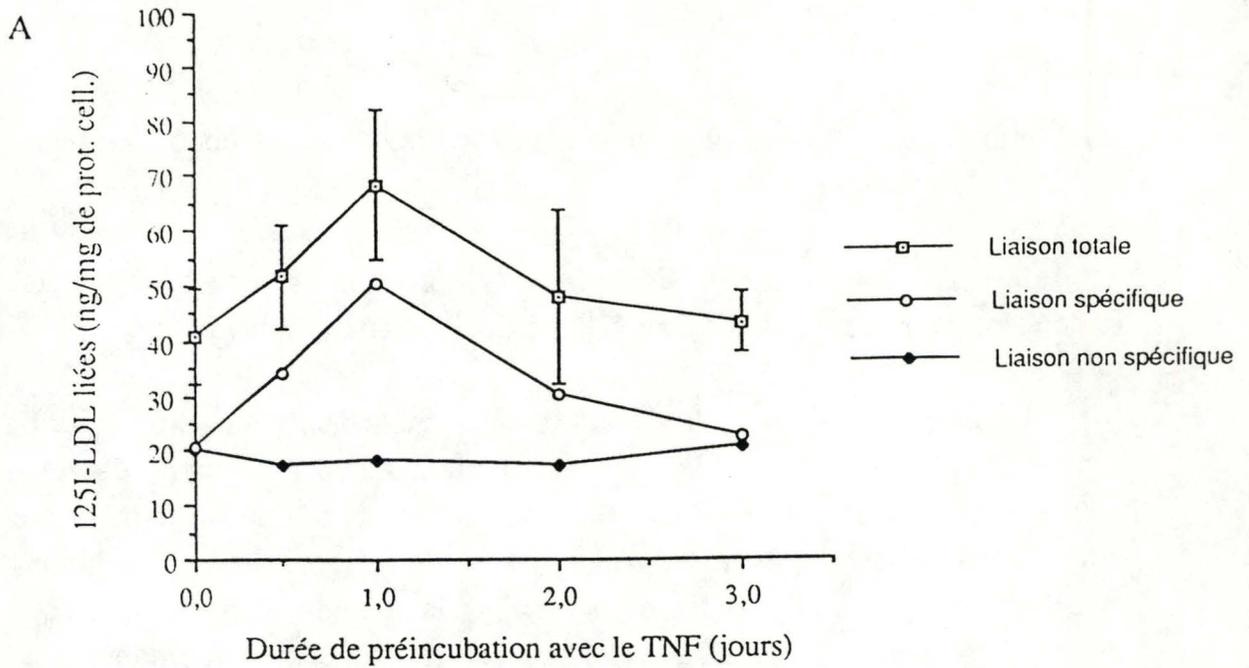
#### B. Seconde expérience

Cette expérience a été réalisée de la même manière que la précédente. Seules les concentrations en TNF diffèrent.

Les liaisons totales et non spécifiques des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en TNF sont représentées à la figure 14 A.

Une augmentation sensible de la liaison totale est détectée lorsque la concentration en TNF s'élève. Des valeurs de liaison non spécifique trop élevées par rapport à celles de la liaison totale ont été obtenues. C'est pour cette raison que nous n'avons pas représenté la liaison spécifique sur le graphe (nous aurions eu des valeurs négatives aux faibles concentrations en TNF). La liaison non spécifique se maintient plus ou moins au même niveau quelque soit la concentration en TNF.

On peut noter que le niveau de la liaison totale en absence de TNF est proche de celui observé à la figure 11 pour 10  $\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL/ml. Il semble donc que c'est bien le niveau de la liaison non spécifique qui soit trop élevé.



**Fig 15:** Effet de la durée de préincubation avec le TNF sur la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales.  
 Les cellules endothéliales ont été préincubées à  $37^\circ\text{C}$ , pendant différents temps, dans du milieu (M199) contenant du sérum (\*) et 50 ng de TNF/ml. Ensuite, les cellules ont été incubées à  $4^\circ\text{C}$ , pendant 2 heures, avec du milieu (M199) contenant du LPDS 10% et 10  $\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL/ml. (+ LDL non marquées en excès pour la liaison non spécifique).  
 Pour la liaison totale, chaque point représente la moyenne de 3 cupules  $\pm 1$  écart-type.  
 Pour la liaison non spécifique, chaque point représente la moyenne de 2 cupules.

(\*) **A.** Le NBS 20% a été remplacé dans cette expérience par du LPDS 10% 24 heures avant la fin de la préincubation.

**B.** Le NBS 20% a été remplacé, dans cette autre expérience, par du LPDS 10%, 48 heures avant la fin de l'incubation.

La figure 14 B montre la moyenne des résultats de l'expérience présentée à la figure 14 A et d'une autre expérience réalisée de la même manière. Une augmentation de la liaison totale des  $^{125}\text{I}$ -LDL est toujours observée lorsque la concentration en TNF augmente. La liaison non spécifique ne varie pas en fonction de la concentration en TNF.

#### 4.3.2. Liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la durée de préincubation avec le TNF

Des cellules endothéliales ont été préincubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant différents temps avec 50 ng de TNF/ml. Lors de deux expériences différentes, le NBS 20% contenu dans le milieu a été remplacé par du LPDS 10%, 24 heures (figure 15.A) et 48 heures (figure 15.B) avant d'incuber pour la liaison.

Les liaisons totale et non spécifique ont été déterminées comme dans les expériences précédentes.

La figure 15.A présente la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la durée de préincubation avec le TNF (avec 24 heures de préincubation avec le LPDS).

La figure 15.B représente une expérience similaire mais dans ce cas les cellules ont été incubées 48 heures avec le LPDS.

Dans les deux expériences, la liaison spécifique (comme la totale) augmente modérément après 12 heures de préincubation avec le TNF, puis elle atteint un maximum après un jour de préincubation; elle diminue ensuite pour des durées d'incubation plus longues.

Contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, les valeurs de liaison pour 24 heures d'incubation avec le LPDS (figure 15.A) ne sont pas plus faibles que celles observées pour la préincubation de 48 heures avec le LPDS (figure 15.B).

## DISCUSSION

### 1. TEST DE CYTOTOXICITE DU TNF

#### 1.1. Mesure de l'activité de la LDH dans le milieu additionné de sérum (NBS) en concentration croissante

Cette expérience (voir résultats, fig. 2) nous indique que le sérum contenu dans le milieu de culture possède une activité LDH. Dans les expériences de cytotoxicité que nous avons réalisées, il faut donc soustraire la valeur de l'activité due au sérum (cette activité a été mesurée lors de chaque expérience) à celle que l'on mesure dans le surnageant de culture pour obtenir l'activité LDH qui a été réellement libérée dans le milieu.

#### 1.2. Essai de mesure du pourcentage et de l'activité LDH libérée dans le milieu par les cellules endothéliales incubées avec différentes concentrations de TNF

D'après les résultats obtenus (voir résultats, fig. 3), nous n'observons pas de libération de LDH dans le milieu de culture (sauf dans le cas des boîtes contenant 25ng/ml de TNF). Pour les concentrations les plus élevées utilisées, on a même une baisse de l'activité LDH par rapport à celle du M+S 5%. Dans cette expérience, le pourcentage d'activité de LDH libérée ne peut donc être mesuré.

Nous avons utilisé 5% de sérum dans le milieu de culture afin de diminuer l'importance de l'activité due au sérum dans le surnageant. Cependant ce n'est pas utile car de toute façon on retire la valeur de l'activité du M+S à l'activité du surnageant. C'est pourquoi dans les expériences suivantes un milieu contenant la concentration de sérum optimale pour les cellules endothéliales, c'est-à-dire 20%, a été utilisé.

### 1.3. Mesure du pourcentage d'activité de LDH libérée dans le milieu par les cellules endothéliales sous l'action du TNF

#### 1.3.1. Durée d'incubation : 2 heures

Aucune libération de LDH n'a pu être observée dans le milieu contrôle (sans TNF), ni dans les boîtes contenant du TNF (200ng/ml) (voir résultats, fig.4). Au contraire, il y a à nouveau en présence de TNF une diminution de l'activité LDH dans le surnageant de culture par rapport à celle du M+S (ici 20%). Les cellules traitées avec l'ionophore A23187 ont libéré de la LDH. Cette libération est plus forte à  $10^{-4}$  M qu'à  $10^{-5}$  M.

Dans l'expérience précédente, nous avons déjà observé cette baisse d'activité aux concentrations plus élevées en TNF. Nous avons donc incubé 3 boîtes de cellules avec du milieu contenant du TNF et du PMSF (inhibiteur de protéases). Nous avons émis l'hypothèse que le TNF pourrait peut-être induire la production d'une protéase par les cellules endothéliales, cette protéase aurait pu inactiver une partie de la LDH.

Les résultats révèlent une libération de LDH en présence de TNF et de PMSF. Cette libération est plus élevée que celle provoquée par l'ionophore A23187 à  $10^{-5}$  M (voir résultats, fig.4). La comparaison des photos des cellules mises en présence de TNF avec celles des cellules incubées sans TNF ne montrent aucune différence morphologique. Il semble donc qu'après 2 heures d'incubation le TNF n'ait pas eu d'effet cytotoxique à cette concentration (voir résultats, fig.4).

Les cellules traitées avec l'ionophore A23187 présentent des altérations morphologiques (rétractions, "blebs"..). Cet ionophore agit en perforant la membrane cellulaire, augmentant ainsi sa perméabilité au  $Ca^{++}$ . L'entrée de ces ions dans la cellule provoque un déséquilibre ionique néfaste pour la cellule. Les altérations sont plus importantes à  $10^{-4}$ M. A  $10^{-5}$ M, les altérations sont restées faibles même à la deuxième prise de vue. Les différences d'intensité dans les altérations provoquées par l'ionophore à  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ M sont cohérentes avec les différences de valeur dans la libération de LDH entre les 2 concentrations.

Dans le cas des cellules traitées à l'ionophore, les résultats du dosage de LDH libérée et de l'observation morphologique se rejoignent : un effet cytotoxique de l'ionophore observé sur la morphologie cellulaire correspond à une libération de LDH conséquente.

Les cellules traitées en présence de TNF et de PMSF ne montrent pas d'altération, elles présentent le même aspect que les cellules contrôles. Pourtant, le résultat du dosage de LDH montrait une libération plus importante de LDH des cellules incubées en présence de TNF+PMSF par rapport à celles traitées à l'ionophore A23187 à  $10^{-5}M$ .

Les résultats du dosage de LDH et ceux de l'analyse morphologique semblent donc contradictoires. En conséquence nous n'avons pas approfondi nos investigations avec le PMSF.

La comparaison des photos des cellules mises en présence de TNF avec celles des cellules incubées sans TNF ne montrent aucune différence morphologique. Il semble donc qu'après 2 heures d'incubation le TNF n'ait pas eu d'effet cytotoxique à cette concentration (voir résultats, fig.4).

Nous avons par la suite pris connaissance d'un article traitant de la protection contre l'effet cytotoxique du TNF par les inhibiteurs de protéases (Baglioni *et al* , 1987). Ces auteurs ont montré que des inhibiteurs de protéases protègent des cellules humaines et murines de la toxicité médiée par le TNF. Il est possible qu'une protéase soit activée dans les cellules traitées au TNF. Elle pourrait être la cause directe des dommages cellulaires ou elle pourrait activer d'autres enzymes lytiques. Les découvertes de cette équipe sont cohérentes avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action du TNF impliquant l'activation d'une protéase.

Les inhibiteurs de protéases n'interfèrent pas avec la traduction du signal à partir des complexes TNF-récepteurs. Il semble donc possible que les signaux provenant du récepteur du TNF activent d'une part des réponses cellulaires spécialisées, par exemple la transcription de nouveaux ARNs et la synthèse de protéines caractéristiques des fibroblastes (Kirstein et Baglioni,

1986). D'autre part, une réponse générale pourrait être déclenchée, conduisant à l'activation d'une protéase. Celle-ci pourrait être présente sous forme d'un précurseur inactif dans toutes les cellules susceptibles de subir la cytotoxicité due au TNF et des protéines protectrices pourraient bloquer l'activation de cette protéase. Cette hypothèse serait-elle en rapport avec celle que nous avons émise quant à l'inactivation de la LDH par une protéase libérée par les cellules en présence de TNF? Des expériences supplémentaires s'avèrent nécessaires pour tester cette hypothèse.

### 1.3.2. Durée d'incubation : 24 heures

Dans ce cas-ci (voir résultats, fig.5.) une libération de LDH est observée en présence ou en absence de TNF. Le pourcentage de LDH libérée est toutefois plus faible en présence de TNF.

Aucune différence morphologique entre les cellules traitées au TNF et les cellules contrôles n'a été observée. Aucune altération n'est visible.

En ce qui concerne les cellules traitées à l'ionophore A23187, les conclusions sont identiques à celles de l'expérience précédente. Le niveau de libération de LDH plus élevé peut s'expliquer par un séjour plus long des cellules en présence de l'ionophore. Les altérations morphologiques observées après 24 heures sont plus importantes encore que celles observées après 2 heures. (signalons que les premières photos ont été prises après 2 minutes, alors que dans l'expérience précédente, c'était après 20 minutes d'incubation.).

### 1.3.3. Durée d'incubation : 48 heures

Aucune libération de LDH par les cellules incubées en absence ou en présence de TNF n'est observée (voir résultats, fig.6) . L'activité LDH est à nouveau plus faible dans le surnageant que dans le M+S20%, même dans le cas des cellules contrôle. Cependant la diminution d'activité est plus accentuée en présence de TNF.

Les cellules traitées avec l'ionophore A23187  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ M présentent un pourcentage d'activité LDH libérée plus important que dans l'expérience de 24 heures. A la concentration  $10^{-5}$ M, le pourcentage d'activité de LDH libérée à 48h est le double de celle mesurée après 24h. Un temps d'incubation prolongé accentue la lyse cellulaire.

#### 1.4. Conclusion des tests de cytotoxicité

La diminution d'activité LDH dans le surnageant en présence de TNF par rapport à l'activité LDH due au sérum ne permet pas de mesurer une éventuelle libération de LDH par les cellules. Ces résultats concernant la libération de LDH ne permettent pas d'affirmer avec certitude que le TNF n'est pas cytotoxique pour les durées et les concentrations étudiées (200ng/ml). Toutefois, l'observation morphologique semble indiquer que le TNF à la concentration et aux temps d'incubation utilisés n'a pas d'effet cytotoxique sur la cellule. Dans les expériences ultérieures, la concentration en TNF maximale que nous utiliserons sera de 200ng/ml.

D'après Schuger et ses collaborateurs (1989), le traitement des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine avec des concentrations de TNF humain comprises entre 0 et 50 ng/ml pendant 18 heures ne montre aucun signe de toxicité.

Sato et ses collaborateurs (1986), ont pu mettre en évidence un effet cytotoxique du TNF murin sur les cellules endothéliales des capillaires bovins mais pas sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, ni sur celles de l'aorte bovine.

## 2. EFFET DU TNF SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE

### 2.1. Effet du TNF sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules endothéliales

#### A. Première expérience (voir résultats, fig. 7. A et B)

Les résultats indiquent qu'une baisse de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules endothéliales semble avoir lieu en présence de TNF et ceci dès la plus faible concentration utilisée (12,5ng/ml). Nous avons dès lors décidé de réaliser une nouvelle expérience pour détailler la zone de concentration comprise entre 0 et 50 ng/ml où la baisse d'incorporation semble se manifester.

#### B. Seconde expérience

Une diminution d'incorporation de thymidine est à nouveau observée lorsque la concentration en TNF augmente(voir fig. 8.). Le TNF semble inhiber l'incorporation de thymidine.

Nos observations rejoignent les résultats de l'équipe de Sato (1986). Ces chercheurs ont mis en évidence une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée par des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et par des cellules endothéliales aortiques bovines, exposées pendant 48h à du TNF de souris.

Saegusa et ses collaborateurs (1990) ont également observé une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine incubées en présence de TNF humain recombinant.

Par contre l'expérience ne nous permet pas de tirer de conclusion quant à un effet de la durée d'incubation des cellules avec le TNF, sur l'incorporation de thymidine. En effet, il aurait fallu pour cela ajouter la thymidine tritiée au même moment pour les 2 durées d'incubation.

Les résultats montrent un niveau d'incorporation de thymidine tritiée plus élevé après 12 heures d'incubation qu'après 24 heures. Au moment où la thymidine tritiée a été rajoutée aux cellules incubées pendant 12 heures, il est probable que le nombre de cellules en phase S du cycle (synthèse d'ADN) était plus élevé qu'au moment où la thymidine tritiée a été ajoutée aux cellules incubées pendant 24 heures, ce qui explique qu'on mesure un niveau d'incorporation plus élevé pour 12 heures d'incubation.

On ne peut donc pas conclure à un effet de la durée d'incubation. Nous allons par conséquent étudier l'effet du TNF en fonction du temps sur la croissance des cellules endothéliales par quantification de cellules.

## 2.2. Estimation de l'effet du TNF sur la prolifération de cellules endothéliales par quantification de cellules

### 2.2.1. Méthode par comptage de cellules sur chambres de Bürcker

Les résultats (voir fig. 9.) montrent une grande variabilité dans les mesures et ne correspondent pas toujours à ce qui a été observé au microscope. Nous pensons que le fait de travailler sur un petit nombre de cellules -impliquant de les resuspendre dans un petit volume- rend difficile la récupération et l'homogénéisation des cellules. Le nombre de cellules comptées est par conséquent très variable.

Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion définitive quant à l'influence du TNF sur la prolifération cellulaire. Nous avons dès lors décidé d'utiliser une autre méthode de quantification des cellules, la méthode au cristal violet.

### 2.2.2. Méthode au cristal violet.

Cette méthode nous permet d'avoir une faible variabilité de la mesure par rapport à celle obtenue dans l'expérience par captage. D'après nos observations, le TNF a une activité inhibitrice sur la croissance des cellules endothéliales. Cet effet augmente avec la concentration en TNF.

### 2.3. Conclusions des tests de prolifération

Les tests d'incorporation de thymidine tritiée en présence de différentes concentrations en TNF nous ont montré que le TNF diminuait cette incorporation de thymidine durant la réplication de l'ADN en phase S du cycle des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture. L'incorporation de thymidine précède la mitose. La diminution de cette incorporation traduit donc une baisse de la croissance cellulaire.

La méthode de quantification cellulaire au cristal violet confirme l'effet inhibiteur du TNF sur la croissance des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture.

Cependant, alors qu'on observait déjà une baisse d'incorporation de thymidine tritiée pour 6,25 ng/ml de TNF, la méthode au cristal violet n'a permis de voir un effet inhibiteur du TNF qu'à partir de 25 ng/ml. La méthode de quantification cellulaire au cristal violet nous a également permis de suivre l'évolution de l'effet du TNF en fonction du temps.

Nos observations rejoignent les conclusions des équipes de Sato (1986) et de Saegusa (1990) qui ont également montré un effet inhibiteur du TNF sur la croissance des cellules endothéliales en culture.

Toutefois, si le TNF a un effet inhibiteur sur les cellules endothéliales *in vitro*, il n'en n'est pas nécessairement de même *in vivo*. Ainsi Frater-Schröder et ses collaborateurs (1987) ont mis en évidence que le TNF induit l'angiogenèse *in vivo*, c'est-à-dire qu'il stimule la prolifération des cellules endothéliales destinées à la formation de nouveaux vaisseaux.

### 3. EFFET DU TNF SUR LA LIAISON DES LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE

#### 3.1. Liaison des $^{125}$ I-LDL aux cellules endothéliales en fonction de leur concentration dans le milieu de culture

Cette expérience a été réalisée pour montrer les 2 types de liaison (spécifique et non spécifique) des LDL aux cellules. Van Hinsberg *et al.* ont mis en évidence en 1983 ces types de liaison chez les cellules endothéliales de l'artère et de la veine ombilicale en culture. Nous obtenons des valeurs de liaison spécifique du même ordre de grandeur que celles de l'équipe de von Hinsberg à 50  $\mu$ g/ml. Toutefois, ils observaient une saturation de cette liaison spécifique pour des concentrations en LDL dans le milieu de 10 à 20  $\mu$ g/ml. Sur notre graphe, nous n'observons pas encore de saturation pour ces concentrations (fig. 11).

D'après nos mesures, la liaison non spécifique semble atteindre un plateau alors que ce type de liaison est habituellement directement proportionnel à la concentration de LDL dans le milieu. En effet, contrairement à la liaison spécifique, il n'y a pas de saturation des récepteurs. Selon von Hinsberg *et al.* (1983), le processus de capture des LDL qui suit la liaison se fait surtout par la voie non spécifique pour des concentrations de LDL supérieures à 50 ng/ml, la voie spécifique étant déjà saturée à cette concentration. Pour des concentrations plus faibles, la voie spécifique domine.

#### 3.2. Liaison des $^{125}$ I-LDL aux cellules endothéliales en fonction du temps d'incubation avec les $^{125}$ I-LDL

La liaison non spécifique semble atteindre un maximum plus rapidement que la liaison spécifique. Celle-ci ne semble pas encore avoir atteint sa valeur maximale après 12 heures d'incubation (voir fig. 12).

### 3.3. Effet du TNF sur la liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales

#### 3.3.1. Liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la concentration en TNF dans le milieu

##### A. Première expérience

Cette expérience nous montre que le TNF semble stimuler la liaison spécifique des LDL aux cellules endothéliales. On observe une augmentation de la liaison pour des concentrations en TNF comprises entre 0 et 25-50 ng/ml (voir fig. 13). L'analyse statistique indique que les concentrations en TNF ont un effet hautement significatif sur la liaison des LDL aux cellules endothéliales. Aux concentrations supérieures, on observe un plateau (un des points est un peu plus bas sur le plateau mais montre une très grande variabilité). Suite à cette expérience, nous avons décidé d'étudier la liaison des LDL aux cellules endothéliales en présence de TNF en détaillant la zone de concentration comprise entre 0 et 50 ng/ml.

##### B. Seconde expérience

Les résultats de cette expérience (voir fig. 14) semblent indiquer que le TNF stimule la liaison totale des LDL aux cellules endothéliales en culture. Comme la liaison non spécifique reste constante en présence de TNF, la liaison spécifique évolue de la même manière que la liaison totale. Ceci confirme les résultats de l'expérience précédente, mais dans cette première expérience l'effet maximal de TNF s'observait déjà à 25 ng/ml alors que dans la seconde, la liaison continue à croître au-delà de cette concentration.

D'autres facteurs agissent en augmentant la liaison des LDL à certaines cellules. Ainsi, on a montré que l'insuline, le PDGF et l'EGF augmentent le nombre de récepteurs pour les LDL sur les fibroblastes permettant ainsi l'activation de la croissance cellulaire par un apport accru de cholestérol. Ishibashi *et al.* (1990) ont démontré que le M-CGF stimule l'expression du récepteur pour les LDL chez les macrophages.

Harada *et al.* (1990) ont étudié l'effet du TNF sur la liaison de LDL aux fibroblastes de la peau. Nous avons obtenu des résultats semblables aux leurs. En effet, ils ont mis en évidence une augmentation de la liaison spécifique à 4°C des LDL aux fibroblastes lorsque la concentration en TNF augmente (effet maximal observé à une concentration de 10 ng/ml). D'après ces résultats et les nôtres, il semble que le TNF augmente la synthèse et l'expression des récepteurs des LDL à la surface des fibroblastes et des cellules endothéliales.

Pour déterminer si le TNF augmente la synthèse du récepteur pour LDL dans les cellules endothéliales en agissant au niveau transcriptionnel, on pourrait tester l'augmentation de synthèse du mRNA du récepteur en utilisant pour sa détection une sonde marquée de cDNA complémentaire. Dans cet ordre d'idées, Nicholson *et al.* (1991) ont mis en évidence que le traitement des cellules musculaires lisses par l'interféron, le TNF et le TGF- $\beta$  augmente la liaison des LDL respectivement d'un facteur 3, 2 et 2. De plus, ils ont montré que la liaison augmentait parallèlement à la quantité de mRNA du récepteur pour LDL.

### 3.3.2. Liaison des $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en fonction de la durée de préincubation avec le TNF

D'après les résultats (voir résultats, graphes 15 A et B), il semble y avoir un effet de la durée de préincubation des cellules endothéliales avec le TNF sur le niveau de liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL à ces cellules. Il faut toutefois noter sur le graphe de la figure 15.B que la valeur de liaison pour une durée de préincubation de 2 jours (avec 50 ng de TNF par ml) est presque au même niveau que le contrôle (pas de préincubation avec le TNF).

Ce résultat est différent de ceux obtenus pour la même concentration en TNF (50 ng/ml) et présentés sur le graphe 14A et 14B. Sur ces graphes, pour une même durée de préincubation avec le TNF, l'effet stimulateur sur la liaison des LDL est très net.

On ne peut cependant pas exclure que la durée d'incubation avec le TNF puisse avoir un effet sur la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules

endothéliales. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer notre hypothèse. Il faudrait répéter les expériences de liaison des LDL en fonction du temps d'incubation du TNF pour différentes concentrations de façon à vérifier s'il y a à la fois un effet du temps d'incubation et de la concentration.

Plusieurs questions restent posées. Comment expliquer que la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales semble augmenter avec la durée d'incubation en présence de TNF, qu'elle atteint un maximum après un jour d'incubation et diminue par la suite? Des résultats similaires aux nôtres (au niveau de l'effet de la durée d'incubation de TNF) ont été observés lorsque le PDGF est ajouté à des cellules musculaires lisses artérielles en culture. Il est apparu que le PDGF stimule la synthèse du cholestérol et du récepteur pour LDL lors d'une première phase. L'augmentation de la quantité intracellulaire de cholestérol qui en résulte inhibe la synthèse du récepteur de LDL ce qui fait chuter l'intensité de la liaison des LDL. L'effet du TNF sur les cellules endothéliales en culture pourrait être similaire à celui du PDGF mais dans une moindre mesure.

Harada *et al.* ont montré dans une expérience similaire à la nôtre un effet du temps de préincubation des fibroblastes avec le TNF sur la liaison des LDL à ces cellules. Comme dans nos expériences, la liaison des LDL aux cellules augmente pour atteindre un maximum après un jour d'incubation avec le TNF. Si l'incubation est prolongée, la liaison diminue mais reste, après 2 jours, à un niveau plus élevé que le contrôle (dans notre cas, elle atteint le niveau du contrôle).

Parallèlement, cette équipe a réalisé un test d'incorporation de thymidine par les fibroblaste soumis au TNF, en fonction du temps. Ils observent une augmentation de l'incorporation de thymidine qui atteint un maximum après 15 heures. L'augmentation de liaison des LDL aux fibroblastes est donc parallèle à l'augmentation de leur prolifération cellulaire en présence de TNF. Les auteurs expliquent l'augmentation importante de liaison des LDL après un jour d'incubation avec le TNF par l'effet mitogène de celui-ci responsable d'une demande supplémentaire en cholestérol. Cette

demande provoque une augmentation du nombre de récepteurs aux LDL et donc une liaison accrue des LDL.

On ne peut pas étendre cette explication aux cellules endothéliales, car les résultats de différents auteurs, tout comme nos expériences de prolifération cellulaire, montrent un effet inhibiteur du TNF sur la prolifération des cellules endothéliales contrairement à ce qui est observé avec les fibroblastes.

Outre l'hypothèse (voir cas du PDGF) d'une inhibition de la synthèse des récepteurs de LDL par l'augmentation du cholestérol intracellulaire, on peut proposer que le TNF provoque un effet feedback négatif:

-soit sur les récepteurs au TNF ce qui empêcherait une stimulation ultérieure par le TNF et provoquerait donc une diminution de la liaison des LDL après 24 heures de préincubation. On pourrait tester cette hypothèse en utilisant des anticorps anti-récepteurs de TNF, couplés à un fluorochrome par exemple, de manière à quantifier les récepteurs au TNF présents à la surface des cellules au cours du temps.

-soit sur la voie d'activation par laquelle le TNF peut agir sur les récepteurs de LDL

## CONCLUSION GENERALE

### A. CONCLUSION GENERALE DU TRAVAIL ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail était d'étudier un effet éventuel du TNF sur la liaison spécifique des LDL aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture.

Au préalable, nous voulions déterminer si le TNF pouvait avoir une action cytotoxique sur ces mêmes cellules, ainsi qu'une influence sur leur croissance.

Bien que les résultats du test de cytotoxicité par mesure du pourcentage de LDH libérée par les cellules, ne nous permettent pas d'affirmer avec certitude que le TNF n'est pas cytotoxique pour les cellules endothéliales, l'observation morphologique des cellules traitées au TNF ne montre aucun signe d'altération cellulaire. Ceci semble indiquer que le TNF, à la concentration et aux durées d'incubation utilisées, n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture. Ceci rejoint d'ailleurs les données de la littérature (Sato *et al*, 1986; Schuger *et al*, 1989).

Grâce au test d'incorporation de thymidine tritiée et au test de prolifération par quantification des cellules au cristal violet, nous avons pu mettre en évidence que le TNF inhibe la croissance des cellules endothéliales en culture. Cette observation est également en accord avec la littérature (Sato *et al*, 1986; Saegusa *et al*, 1990).

L'étude de la liaison spécifique des  $^{125}\text{I}$ -LDL aux cellules endothéliales en culture, nous indique qu'il semble y avoir un effet stimulateur du TNF sur cette liaison lorsque la concentration de ce médiateur augmente dans le milieu de culture. Après une augmentation de la liaison pour les concentrations en TNF comprises entre 0 et 25-50 ng/ml, il semble qu'elle se stabilise. Le TNF stimule probablement la production des récepteurs de LDL

et/ou leur expression à la surface des cellules endothéliales. En vue de vérifier cette hypothèse, il faudrait essayer de détecter une augmentation de la quantité de mRNA codant pour le récepteur de LDL grâce à une sonde de cDNA complémentaire de ce messenger.

Il est également possible qu'il y ait un effet du temps de préincubation des cellules endothéliales avec le TNF sur la liaison des  $^{125}\text{I}$ -LDL à ces cellules. Toutefois, comme les résultats se rapportant à cet effet du temps ne sont pas tout à fait en accord avec ceux obtenus pour l'effet de la concentration, il serait utile de refaire de nouvelles expériences de liaison en fonction du temps de préincubation des cellules avec le TNF, et ce, à différentes concentrations en TNF dans le milieu.

L'effet stimulateur du TNF sur la liaison spécifique des LDL aux cellules endothéliales en culture, pourrait s'avérer intéressant dans le cadre de l'étude de l'athérogenèse. En effet, si *in vivo* le TNF présentait le même type d'effet stimulateur sur la liaison des LDL aux cellules endothéliales, il est probable que cela renforcerait le processus d'endocytose spécifique des LDL et donc leur dégradation par l'endothélium. Il s'agirait à première vue d'un effet bénéfique sur l'athérosclérose, puisqu'il permettrait de baisser le taux plasmatique des LDL par élimination accrue de celles-ci. Plus les LDL du plasma sont dégradées par l'endothélium, moins il y en a qui passe dans l'intima.

Il serait intéressant de refaire le même type d'expérience que celles que nous avons réalisées, mais en étudiant l'endocytose des LDL à 37°C par les cellules endothéliales de la veine ombilicale, en absence et en présence de TNF.

## B. IMPLICATIONS DU TNF ET D'AUTRES CYTOKINES DANS LA FORMATION DES LESIONS ATHEROSCLEREUSES: DONNEES RECENTES

Dans la littérature, on trouve de plus en plus d'informations quant au rôle hypothétique des cytokines dans l'athérosclérose.

Le "Macrophage-Colony Stimulating Factor" (M-CSF) stimule le métabolisme du cholestérol chez les macrophages, par les voies dépendantes et indépendantes du récepteur de LDL (Shimano *et al*, 1990; Ishibashi *et al*, 1990) et par la voie faisant intervenir le récepteur "scavenger" (Ishibashi *et al*, 1990). Cette action du M-CSF pourrait intervenir dans la formation des cellules spumeuses à partir des monocytes/macrophages. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des lipoprotéines modifiées par oxydation peuvent stimuler la production de M-CSF par les cellules endothéliales (Rajavashisth *et al*, 1990). Or on se souvient (voir "Introduction", hypothèse du stress oxydant) que la présence de LDL oxydées a été mise en évidence dans la lésion athéroscléreuse (Palinski *et al*, 1989). Clinton *et al* (1991) ont mis en évidence l'expression de M-CSF dans des cultures de cellules vasculaires et dans des lésions athéroscléreuses.

Nicholson *et al* (1991) ont montré que l'interféron-gamma, le "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) et le TNF, augmentent la liaison de LDL acétylées par les récepteurs "scavengers" de certaines lignées de macrophages.

Outre son effet possible sur la liaison spécifique des LDL, le TNF pourrait avoir d'autres actions dans la pathologie de l'athérosclérose. Ainsi, on sait par exemple que l'adhésion des monocytes à l'endothélium constitue un des premiers évènements dans l'athérogenèse. Or on a vu (voir "Introduction", les effets biologiques du TNF) que le TNF stimulait l'expression de molécules d'adhésion pour les leucocytes, à la surface des cellules endothéliales. Calderon *et al* (1991) ont d'ailleurs mis en évidence que le TNF et l'IL1- $\beta$  induisaient l'apparition, sur les cellules endothéliales, d'une molécule d'adhésion pour les monocytes. Cette molécule est exprimée, selon les auteurs, uniquement dans les vaisseaux comportant des lésions athéroscléreuses et non à la surface des parois vasculaires normales.

L'IL9 est produite par les cellules endothéliales et probablement aussi par les cellules musculaires lisses. La sécrétion de ce facteur chémoattractif et activateur pour les macrophages, pourrait initier l'athérosclérose en recrutant les monocytes/macrophages, précurseurs des cellules spumeuses (Libby *et al*, 1991).

L'étude des cytokines, dont le TNF, dans la régulation des processus liés à l'athérosclérose, est en pleine expansion. Cette étude des cytokines dans le contexte de l'athérosclérose, va peut être mettre en évidence un rôle plus important des processus inflammatoires dans l'athérogenèse, plus d'un siècle après que Virchow ait proposé la théorie inflammatoire de l'athérogenèse.

## Biblio

1. Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E., Moffat, B., Spencer, S.A., Henzel, W.J., Bringman, J.S., Nedwin, G.E., Goeddel, D.V. & Harkins, R.N. (1985a).  
Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization.  
J. Biol. Chem., 260, 4, 2345-2354.
2. Aggarwal, B.B., Eessalu, T.E. & Hass, P.E. (1985b).  
Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon.  
Nature, 318, 665-667.
3. Allain, C.A., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W. & Fu, P.C. (19874).  
Enzymatic determination of total serum cholesterol.  
Clin. Chem., 20, 470-475.
4. Baglioni, C., Ruggiero, V., Latham, K. & Johnson, S.E. (1987).  
Cytocidal activity of tumour necrosis factor: protection by protease inhibitors.  
in: Tumour necrosis factor and related cytotoxins (Bock, G./Marsh, J., eds), pp. 52-63, Wiley John and Sons, Chichester.
5. Barath, P., Fishbein, M.C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R.H. & Forrester, J.S. (1990).  
Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma.  
Am. J. Pathol., 65, 297-362.
6. Benditt, E.P. & Benditt, J.M. (1973).  
Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerosis plaques.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1753-1756.

7. Bertolini, D.R., Nedwin, G.E., Bringman, T.S., Smith, D.D. & Mundy, G.R. (1986).  
Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factor .  
Nature, 319, 516-518.
8. Beutler, B. & Cerami, A. (1986).  
Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin.  
Nature, 320, 584-588.
9. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Fiers, W., Cotran, R.S. & Gimbrone, M.A. Jr. (1986).  
Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison of interleukin 1.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4533-4537.
10. 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.  
Biochem. Biophys. Acta, 260, 212-221.
11. Bodet, B. (1989).  
Stratégies anti-inflammatoires: l'inflation.  
Biofutur, Septembre , 25-37.
12. Broudy, V.C., Kaushausky, K., Segal, G.M., Harlan, J.M. & Adamson, J.W. (1986).  
Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony stimulating factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7467-7471.
13. Calderon, M., Yao, L., Bresnan, F., Hatcher, V.B., Factor, S.M. & Berman, J.W. (1991).  
A cytokine induced human endothelial cell-monocyte adhesion molecule expressed in vessels with

- atherosclerotic lesions.  
FASEB J., 5, A1438.
14. Capron, L. (1983).  
L'athérosclérose.  
Rev. Neurol., 139, 167-176.
15. Carswell, E.A., Old, L., Kassel, R.L., Green, S., Fiore,  
N. & Williamson, B. (1975).  
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis  
of tumors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3666-3670.
16. Clinton, S.K., Underwood, R., Sherman, M.L., Kufe, D.W.  
& libby, P. (1991).  
The expression of macrophage-colony stimulating factor  
(M-CSF) in cultured vascular cells and during  
atherogenesis.  
FASEB, J., 5, A1438.
17. 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.  
Acta Cardiol. (Suppl.), 20, 9-25.
18. Dembic, Z., Loetscher, H., Gubler, U., Pan, Y.E., Lahm,  
H.-W., Gentz, R., Brockhause, M. & Lesslauer, W.  
(1990).  
Two human TNF receptors have similar extracellular, but  
distinct intracellular, domain sequences.  
Cytokine, 2, 4, 231-237.
19. Detmar, M. & Orfanos, C.E. (1990).  
Tumor necrosis factor-alpha inhibits cell proliferation  
and induces class II antigens and cell adhesion  
molecules in cultured normal human keratinocytes in  
vitro .  
Arch. Dermatol. Res., 282, 238-245.

20. Engelberg, H. (1989).  
Endothelium in health and disease.  
Sem. in Thromb. and Haemost., 15, 2, 178-183.
21. Fiers, W., Beyaert, R., Brouckaert, P., Everaerd, B.,  
Libert, C., Suffys, P., Takahashi, N., Vanhaesebroek,  
B. & Van Roy, F. (1990).  
Mechanism of action of tumor necrosis factor and its  
implications for synergizing and antagonizing drugs  
in: Endotoxin from pathophysiology to therapeutic  
approaches (Maurice Rappin foundation, ed.), pp. 59-68,  
Medecine-Sciences/Flammarion, Paris.
22. Frater-Schröder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi,  
P. & Böhlen, P. (1987).  
Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of  
endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in  
vivo.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5277-5281.
23. Gamble, J.R., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J. & Vadas,  
M.A. (1985).  
Umbilical vein endothelium by human recombinant tumor  
necrosis factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8667-8671.
24. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1985).  
The LDL receptor and the regulation of cellular  
cholesterol metabolism.  
J. Cell Sci. (Suppl.), 3, 131-137.
25. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977).  
The low-density lipoprotein pathway and its relation to  
atherosclerosis.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 897-930.

26. Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarret, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P., Palladino, M.A. & Nedwin, G.E. (1984).  
Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity.  
*Nature*, 312, 721-724.
27. Hamblin, A.S. (1988).  
Biochemistry of lymphokines  
in: *Lymphokines* (Male, D., ed.), pp. 13-34, IRL Press, Oxford.
28. Hammersen, F. & Hammersen, E. (1985).  
Some structural and functional aspects of endothelial cells.  
*Basic Res. Cardiol.*, 80, 491-501.
29. Harada, K., Shimano, H., Kawakami, M., Ishibashi, S., Gotoda, T., Mori, N., Takaku, F. & Yamada, N. (1990).  
Effect of tumor necrosis factor/cachectin on the activity of the low density lipoprotein receptor on human skin fibroblasts.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 3, 1022-1027.
30. Haudenschild, C.C. (1984).  
Morphology of vascular endothelial cells in culture  
in: *Biology of endothelial cells* (Jaffe, E.A., ed.), pp. 129-140, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, MA.
31. Herman, A. . (1990).  
Rôle l'endothelium dans la régulation du tonus vasculaire.  
*Medisearch*, 41, 5-9.
32. Ishibashi, S., Inaba, T., Shimano, H., Harada, K., Inone, I., Mokuno, H., Mori, N., Gotoda, T., Takaku, F. & Yamada, N. (1990).  
Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and

degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages.

J. Biol. Chem., 265, 24, 14109-14117.

33. Jaffe, E.A. (1984a).  
Culture and identification of large vessel endothelial cells  
in: Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., ed.),  
pp. 1-13, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, MA.
34. Jaffe, E.A. (1985).  
Physiologic functions of normal endothelial cells.  
Ann. NY Acad. Sci., 454, 279-291.
35. Jaffe, E.A. (1984b).  
Synthesis of factor VIII by endothelial cells  
in: Biology of endothelial cells (Jaffe, E.A., ed.),  
pp. 209-214, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, MA.
36. Kawakami, M. & Cerami, A. (1981).  
Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity.  
J. Exp. Med., 154, 631-639.
37. Kirstein, M. & Baglioni, C. (1986).  
Tumor necrosis factor induces synthesis of two proteins in human fibroblasts.  
J. Biol. Chem., 261, 9565-9567.
38. Klebanoff, S.J., Vadas, M.A., Harlan, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., Agosti, J.M. & Waltersdorff, A.M. (1986).  
Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor.  
J. Immunol., 136, 11, 4220-4225.

39. Kovanen, P.T. (1985).  
Le contrôle du cholestérol.  
La Recherche, 172, 1472-1480.
40. Kueng, W., Silber, E. & Eppenberger, U. (1989).  
Quantification of cells cultured on 96-well plates.  
Anal. Biochem., 182, 16-19.
41. Langeler, E.G., Fiers, W. & van Hinsberg, V.W.  
Effects of tumor necrosis factor on prostacyclin  
production and the barrier formation of human  
endothelial cell monolayers.  
Atherosclerosis (in press), .
42. Libby, P., Loppnow, H., Fleet, J.C., Palmer, H., Li,  
H.M., Warner, S.J., Salomon, R.N., Clinton, S.K.  
(1991).  
Production of cytokines by vascular wall cells: an  
update and implications for atherogenesis.  
in: Atherosclerosis (Gotlieb et al., eds), pp.161-169,  
Plenum Press, New York.
43. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randell,  
R.J. (1951).  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
44. Mc Farlane, A.S. (1958).  
Efficient trace-labeling of proteins with iodine.  
Nature, 182, 53.
45. Mestan, J., Digel, W., Mittnacht, S., Hillen, H., Blohm,  
D., Möller, A., Jacobsen, H. & Kirchnen, H. (1986).  
Antiviral effects of recombinant tumour necrosis factor  
in vitro.  
Nature, 323, 816-819.

46. Ming, W.J., Bersani, L. & Mantovani, A. (1987).  
Tumor necrosis factors in chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes.  
*J. Immunol.*, 138, 5, 1469-1474.
47. Moser, R., Schleiffenbaum, B., Groscurth, P. & Fehr, J. (1989).  
Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage.  
*J. Clin. Invest.*, 83, 444-455.
48. Munker, R., Gassen, J., Ogawa, M. & Koeffler, P. (1986).  
Recombinant human TNF induces production of  
granulocyte monocyte-colony stimulating factor.  
*Nature*, 323, 79-82.
49. Munro, J.M., Pober, J.S. & Cotran, R.S. (1989).  
Tumor Necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*.  
*Am. J. Pathol.*, 135, 1, 121-133.
50. Nathan, C. & Sporn, M. (1991).  
Cytokines in context.  
*J. Cell Biol.*, 113, 5, 981-986.
51. Nawroth, P.P & Stein, D.M. (1986).  
Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor.  
*J. Exp. Med.*, 163, 740-745.
52. Nicholson, A.C., Stolpeck, A.T. & Hajjar, D.P. (1991).  
Cytokine regulation of LDL binding and LDL receptor

58. Pober, J.S. (1987).

Effects of tumor necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells

in: Tumor necrosis factor and related cytokines (Bock,

G.// Marsh, J., eds), pp.170-184, Wiley and Sons, Chichester.

59. Pober, J.S., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Lapierre, L.A., Fiers, W. & Gimbrone, M.A. Jr. (1986a).

Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface cultured human vascular endothelial cells.

J. Immunol., 136, 1680-1687.

60. Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R. & Springer, T.A. (1986b).

Overlapping patterns of activation on human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon.

J. Immunol., 137, 6, 1893-1896.

61. Poumay, Y. (1988).

Contribution à l'étude de l'athérogenèse. Effets des dérivés actifs de l'oxygène sur l'endocytose spécifique des lipoprotéines de faible densité par les cellules endothéliales.

Thèse de Doctorat. Facultés Universitaires N-D de la Paix, Namur.

62. Poumay, Y et Ronveaux-Dupal, 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.

63. Quinn, M.T, Parthasarathy, S. & Steinberg, D. (1985).

Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low-density lipoprotein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 5949-5953.

11

64. Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G. & Steinberg D. (1987).  
Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2995-2998.
65. Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M. & Lusis, A.J. (1990).  
Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins.  
Nature, 344, 254-257.
66. Rollins, B.J., Yoshimura, T., Leonard, E.J. & Pober, J.S. (1990).  
Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE.  
Am. J. Pathol., 136, 6, 1229-1233.
67. Ross, D. (1986).  
The pathogenesis of atherosclerosis - an update.  
N. Engl. J. Med., 314, 488-500.
68. Ross, R. & Glomset, J.A. (1976).  
The pathogenesis of atherosclerosis.  
N. Engl. J. Med., 295, 369-377 et 420-425.
69. Rouzer, C.A. & Cerami, A. (1981).  
Hypertriglyceridemia associated with *Trypanosoma brucei* infection in rabbits: role of defective

triglyceride removal.  
Mol. Biochem. Parasitol., 2, 31-38.

70. Saegusa, Y., Ziff, M., Welkovich, L. & Cavender, D. (1990).  
Effect of inflammatory cytokines on human endothelial cell proliferation.

12

J. Cell. Physiol., 142, 488-495.

71. Saklatava, J. (1986).  
Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage.  
Nature, 322, 547-549.
72. Saxena, U., Witte, L.D. & Goldberg, I.J. (1990).  
Tumor necrosis factor induced release of endothelial cell lipase.  
Arteriosclerosis, 10, 3, 470-476.
73. Schuger, L., Varani, J., Marks, R.M., Kunkel, S.L., Johnson, K.J. & Ward, P.A. (1989).  
Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha human umbilical vein endothelial cells.  
Lab. Invest., 61, 1, 62-68.
74. Schuger, L., Varani, J., Marks, R.M., Kunkel, S.L., Johnson, K.J. & Ward, P.A. (1989).  
Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha for human umbilical vein endothelial cells.  
Lab. Invest., 61, 1, 62.
75. Semb, H., Petersen, J., Tavernier, J. & olivecrona, T. (1987).  
Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo.  
J. Biol. Chem., 262, 8390-94.
76. Shalaby, M.R., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E.,

mRNA steady levels in arterial cells.  
FASEB J., 5, A1246.

9

53. Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Ylä-Herttuala, S., Gurtner, G.C, Socher, S.S., Butler, S.W., parthasarathy, S., Carew, T.E., Steinberg & Witztum, J.L. (1989).  
Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1372-1376.
54. Pekala, P.H., Kawakami, M. & Angus, C.W. (1983).  
Selective inhibition of synthesis of enzymes for "de novo" fatty acid biosynthesis by an endotoxin induced mediator for exudate cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2743-2747.
55. Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. & Goeddel, D.V. (1984).  
Human tumour necrosis factor precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin.  
Nature, 312, 724-729.
56. Pittilo, R.M. (1988).  
Endothelium and the vessel wall  
in: Platelet-vessl wall interactions (Pittilo, R.M./Machin, S.J., eds), pp. 33-59, Springer-Verlag, London.
57. Pober, J.S., Lapierre, L.A., Stolpen, A.H., Brock, T.A., Springer, T.A., Fiers, W., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L and Gimbrone, M.A. Jr. (1987).  
Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species.  
J. Immunol., 138, 10, 3319-3324.

Svedersky, L.P., Finkle, B.S. & Palladino, M.A. Jr.  
(1985).

Activation of human polymorphonuclear neutrophil  
functions by interferon-gamma and tumor necrosis  
factor.

J. Immunol., 135, 3, 2069-2073.

13

77. Shimano, H., Yamada, N., Ishibashi, S., Harada, K.,  
Matsumoto, A., Mori, N., Inaba, T., Motoyoshi, K.,  
Itahura, H & Fumirano, T. (1990).

Human monocyte colony-stimulating factor enhances the  
clearance of lipoproteins containing apolipoprotein  
B-100 via both low density lipoprotein receptor-  
dependent and -independent pathways in rabbits .

J. Biol. Chem., 265, 22, 12869-12875.

78. Simionescu, M. (1988).

Receptor-mediated transcytosis of plasma molecules by  
vascular endothelium

in: Endothelial cell biology in health and disease

(Simionescu, N./Simionescu, M., eds.), pp. 69-104,

(Plenum Press, New York).

79. Steinberg, D. (1987b).

Atherosclerosis from the viewpoint of cell biology

in: Atherosclerosis-developments, complications and  
treatment (Shepherd, J. et al., eds.), pp. 3-20,

Excerpta Medica, Amsterdam.

80. Steinberg, D. (1987a).

Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis.

Circulation, 76, 508-509.

81. Stryckmans, P. (1991).

Les cytokines en hématologie.

Medisearch, 50, 35-40.

82. Suffys, P., Beyaert, R., Van Roy, F. & Fiers, W. (1987).  
Reduced tumour necrosis factor-induced cytotoxicity by  
inhibitors of the arachidonic acid metabolism.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 2, 725-743.
83. Suffys, P., Beyaert, R., De Valck, D., Vanhaesebroeck,  
B., Van roy, F. & Fiers, W. (1991).  
Tumor necrosis factor mediated cytotoxicity is  
correlated with phospholipase A2 activity, but not with

14

arachidonic acid release per se.  
*Eur. J. Biochem.*, 195, 465-475.

84. Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari,  
J.S., Palladino, M.A. & Shepard, H.M. (1985).  
Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects  
on proliferation of normal and transformed cells in  
vitro.  
*Science*, 230, 943-945.
85. Talmadge, J.E., Bowersox, O., Tribble, H., Lee, S.H.,  
Shepard, H.M. & Liggit, D. (1987).  
Toxicity of tumor necrosis factor is synergistic with  
gamma-interferon and can be reduced with  
cyclooxygenase  
inhibitors.  
*Am. J. Pathol.*, 128, 3, 410-425.
86. Van Hinsberg, W.M., Havekes, L., Emeis, J.J., van Coven,  
E. & Scheffer, M. (1983).  
Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells  
from human umbilical cord arteries and veins.  
*Arteriosclerosis*, 3, 547-559.
87. Vilcek, J., Tsujimoto, M., Palombella, V.J., Kohase, M.  
& Le, J. (1987).  
Tumor necrosis factor: receptor binding and mitogenic  
action in fibroblasts.  
*J. Cell. Physiol.*, 5, 57-61.

88. Weibel, E.R. & Palade, G.E. (1964).  
New cytoplasmic components in arterial endothelia.  
J. Cell Biol., 23, 101-112.
89. Wong, G.H. & Goeddel, D.V. (1989).  
Tumour necrosis factor  
in: Human monocytes (Zembala, M./Asherson, G.L., eds),  
pp. 195-215, Academic Press, London .

15

90. Wong, H.W. & Goeddel, D.V. (1986).  
Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus  
replication and synergize with interferons.  
Nature, 323, 819-822.
91. Wroblewski, F. & La Due, J.S. (1955).  
Lactic dehydrogenase in blood.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. , 90, 210.