



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude comparative de LDL modifiées dans la partie lipidique et/ou protéique sur l'activation induite des monocytes/macrophages humains et murins en culture, stimulés ou non

Douxchamps , Catherine

Award date:
1996

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.

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Etude comparative de LDL modifiées dans la partie lipidique et/ou
protéique sur l'activation induite des monocytes/macrophages
humains et murins en culture, stimulés ou non**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

Catherine Douxchamps

Décembre 1996

**Etude comparative de LDL modifiées dans la partie lipidique et/ou
protéique sur l'activation induite des monocytes/macrophages
humains et murins en culture, stimulés ou non**

Douxchamps Catherine

Résumé

L'athérosclérose est une maladie touchant plus de 50 % de la population de nos pays occidentaux. L'étude du rôle des facteurs de transcription dans l'athérogenèse n'a commencé que depuis quelques années et les travaux effectués *in vitro* sont fort controversés. Mais, le matériel utilisé, c'est-à-dire les différentes préparations de LDL modifiées, est difficile à manipuler, à caractériser et donc très variable d'un laboratoire à l'autre, de même que les modèles cellulaires utilisés. Nous avons décidé d'étudier l'effet de différentes préparations de LDL sur l'activation des monocytes/macrophages, en suivant d'une part l'activation du facteur NF- κ B, facteur de transcription contrôlant de nombreux gènes impliqués dans les stades précoces de la maladie et d'autre part, la libération d'IL-6, cytokine dont le gène possède une séquence cible pour NF- κ B dans son promoteur. L'étude des facteurs de transcription dans l'athérogenèse faisant l'objet d'un nouveau projet dans le laboratoire, nous avons décidé dans un premier temps de choisir des modèles adéquats pour démarrer ce travail. Pour ce faire, nous avons étudié la lignée monocytique humaine THP-1 (différenciée ou non en macrophages) et la lignée macrophagique murine J774. Nous avons démontré que ces cellules sous forme macrophagique, incubées en présence de LDL modifiées dans la partie protéique, se transforment bien en cellules spumeuses comme dans le cas *in vivo* de la pathogénie. Ensuite, nous avons démontré que l'activation du facteur NF- κ B et la libération d'IL-6 ont bien lieu dans ces cellules après les avoir stimulées avec de l'IL-1 ou des LPS. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons comparé différentes préparations de LDL sur l'activation induite ou non des monocytes/macrophages. Ainsi, nous avons pu démontrer que des LDL non modifiées, modifiées dans la partie protéique (MDA-LDL) ou modifiées dans la partie protéique et lipidique (oxLDL) ont un effet inhibiteur sur l'activation de NF- κ B et ne provoquent pas de libération d'IL-6 au niveau des macrophages. Enfin, nous avons également constaté que ces LDL, quel que soit leur état, diminuaient la libération d'IL-6 chez les macrophages stimulés par des LPS. Par contre, seules les MDA-LDL inhibent la production de M-CSF par des macrophages non stimulés. Dans ce dernier cas, on voit donc un effet spécifique des MDA-LDL.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Décembre 1996

Promoteur: M. Raes

Je remercie le Professeur Remacle de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et tout particulièrement, Martine Raes pour sa grande compétence et son expérience qui ont été très enrichissantes.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Isabelle pour m'avoir suivie et guidée tout au long de cette année, pour m'avoir soutenue dans les périodes plus dures....

Un tout grand merci à Andrée, François, Martine et Edouard de m'avoir dépannée et conseillée lors de mes expériences.

Merci aussi au laboratoire et aux mémorants pour cette ambiance de bonne humeur et de joie de vivre qui a régné tout au long de cette année. Merci à Steph, Michet, Anne et Patsy.

Un merci plus particulier s'adresse à Barbara pour ses conseils judicieux mais aussi pour les bons moments de "papotte" passés ensemble.

Je remercie également le Professeur Collen et le Professeur Holvoet du Center for Vascular Molecular Biology (KUL) pour leur collaboration à la réalisation de ce travail et pour les LDL fournis si aimablement.

Une pensée toute particulière est dédiée à mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mes études, à Isabelle, à Véronique et à ma famille "adoptive" chez qui j'ai partagé mes cinq années d'étude.

Enfin, pour terminer, mille mercis à Etienne pour être resté à mes côtés durant les périodes plus difficiles et pour être parvenu à m'encourager de l'autre côté de la terre lors des six dernières semaines.

ABBREVIATIONS

ACAT	acétyl Co A acyl transférase
ADCC	antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity
AP-1	activator protein-1
BSA	albumine bovine
CETP	cholestéryl ester transfer protéine
CFU-G	colony forming unit granulocyte
CFU-GM	colony forming unit, granulocyte-monocyte
CFU-M	colony forming unit monocyte
CPM	coups par minute
CREB	cyclic AMP responsive element binding
CSF	colony stimulating factor
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DO	densité optique
EDTA	éthylène dinitrotétraacétique
ELAM	endothelial-leukocytes adhesion molecule
ELISA	enzyme linked immuno sandwich assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
	technique de retard sur gel
FGF	fibroblast growth factor
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
HDL	high density lipoprotein
	lipoprotéine de forte densité
HNE	hydroxynonenal
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFNa	interferon a
IL-1	interleukine 1
IL-6	interleukine 6
IOD	intensité de la densité optique
LCAT	lécithin cholestéryl acyl transférase
LDL	low density lipoprotein
	lipoprotéine de faible densité
LOOH	hydroperoxydes lipidiques
LPC	lysophosphatidylcholine
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharides
M-CSF	macrophage/monocyte colony stimulating factor
MDA	malondialdéhyde
MDA-LDL	LDL modifiées par du MDA
mmLDL	minimally or mildly modified LDL
	LDL moyennement oxydées

N-LDL	LDL natives
NF-kB	nuclear factor-kappa B facteur nucléaire-kappa B
NO	oxyde nitrique
oxLDL	highly oxidized LDL LDL fortement oxydées
PAF	platelet activating factor
PBS	tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9%, porté à pH 7,4.
PDGF	platelet derived growth factor
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PUFAs	polyunsaturated fatty acids acides gras polyinsaturés
RPM	tours par minute
T25	boîte de culture de 25 cm ² (Corning)
T75	boîte de culture de 75 cm ² (Corning)
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TGFβ	transforming growth factor β
TNF	tumor necrosis factor
TNFα	tumor necrosis factor α
VCAM-1	vascular cells adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein lipoprotéine de très faible densité

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
1. L'artère.....	8
1.1. Introduction.....	8
1.2. Description et structure de l'artère.....	8
1.2.1. L'intima.....	8
1.2.2. La média.....	10
1.2.3. L'adventice.....	11
1.2.4. Vascularisation et innervation.....	11
1.3. Les artères de large calibre ou artères élastiques.....	11
2. Les monocytes/macrophages.....	13
2.1. Le développement de la lignée monocyttaire en macrophages <i>in vivo</i>	13
2.2. Différenciation des monocytes <i>in vitro</i>	14
2.2.1. Processus de différenciation.....	14
2.2.2. Les lignées monocytaires.....	15
2.3. Les fonctions principales des macrophages.....	16
2.4.1. La chimiotaxie.....	16
2.4.1.A. Au niveau tissulaire.....	16
2.4.1.B. Au niveau cellulaire.....	17
2.4.2. La phagocytose.....	17
2.4.3. Autres fonctions.....	17
3. Les lipoprotéines de faible densité.....	19
3.1. Le métabolisme du cholestérol et son transport.....	19
3.1.1. Le transport des lipides endogènes et exogènes.....	20
3.1.2. Les chylomicrons et les VLDL.....	20
3.1.3. Le métabolisme des LDL.....	21
3.1.4. Le métabolisme des HDL.....	22
3.2. Description de la particule LDL.....	23
3.2.1. Définition.....	23
3.2.2. Contenu lipidique.....	23
3.2.3. Contenu protéique.....	23
3.2.4. Caractéristiques biochimiques.....	24
4. Origines de l'athérosclérose.....	25
4.1. Le processus déclencheur: les hypothèses.....	25
4.1.1. le dysfonctionnement de l'endothélium.....	25
4.1.2. Le dépôt lipidique.....	26
4.2. Facteurs de risques.....	27

4.3. Désordres héréditaires du métabolisme lipidique et athérosclérose	28
4.4. Athérogénèse et LDL oxydées	28
4.4.1. Séquestration des LDL dans l'intima	29
4.4.2. Oxydation des LDL in vivo	29
4.4.3. Mécanisme d'oxydation des LDL in vitro	30
4.4.4. Arguments en faveur de la présence de LDL oxydées in vivo	33
4.5. Effets biologiques des LDL oxydées sur les monocytes et les macrophages	34
4.5.1. Recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages	34
4.5.1.A. Effets des LDL oxydées sur les monocytes	34
4.5.1.B. Bases moléculaires	35
4.5.2. Formation de cellules spumeuses	36
4.5.2.A. Les récepteurs scavenger des macrophages	36
4.5.2.B. Mécanismes menant à la formation de cellules spumeuses	38
4.6. Contribution des cellules musculaires lisses, prolifération et synthèse de la matrice extracellulaire	38
4.7. Complications liées aux lésions avancées	39
5. Evolution des lésions athérosclérotiques	41
6. Rôle hypothétique du facteur NF-kappa B dans l'athérosclérose	42
6.1. Biologie du facteur NF-κB	42
6.1. Biologie du facteur NF-κB	43
6.1.1. Description sous sa forme inactive	43
6.1.2. Activation de NF-κB	44
6.2. NF-κB et l'athérogénèse	45
7. Objectifs du mémoire	46

MATERIELS ET METHODES

1. Culture de cellules	48
1.1. Matériels	48
1.2. Méthode	48
1.2.1. Comptage	48
1.2.2. Repiquage	49
1.2.3. Congélation - décongélation	49

1.2.3.A. Matériels	49
1.2.3.B. Congélation	50
1.2.3.C Décongélation	50
2. Test de toxicité	51
2.1. Matériels	51
2.2. Méthode	51
2.2.1. Coloration des cellules en suspension	51
2.2.2. Coloration des cellules adhérentes	52
3. Dosages de protéines	53
3.1. La méthode Bradford	53
3.1.1. Matériels	53
3.1.2. Méthode	53
3.2. La méthode au Folin	53
3.2.1. Principe	53
3.2.2. Matériels	53
3.2.3. Méthode	54
4. Préparation des LDL	54
4.1. Isolement des LDL	54
4.1.1. Matériels	55
4.1.2. Méthode	55
4.2. Modification des N-LDL à l'aide du malondialdéhyde	56
4.2.1. Matériels	56
4.2.2. Méthode	56
4.3. Modification des N-LDL à l'aide du chlorure de cuivre	57
4.3.1. Matériel	57
4.3.2. Méthode	57
4.4. Caractérisation biochimique des différentes préparations de LDL	58
4.4.1. Le dosage des TBARS	59
4.4.1.A. Matériels	59
4.4.1.B. Méthode	59
4.4.2. La migration électrophorétique des LDL sur gel d'agarose	60
4.4.2.A. Matériels	60
4.4.2.B. Méthode	60
4.4.3. Le suivi de l'oxydation au spectrophotomètre	61
4.4.3.A. Matériels	62
4.4.3.B. Méthode	62
5. Différenciation des monocytes en cellules macrophagiques	64
5.1. Matériels	64

5.2. Méthode.....	64
6. Différenciation des cellules macrophagiques en cellules spumeuses	65
6.1. Différenciation des cellules macrophagiques en cellules spumeuses.....	65
6.1.1. Matériels	65
6.1.2. Méthode	65
6.2. Coloration des cellules spumeuses	65
6.2.1. Matériels	65
6.2.2. Méthode	66
7. E.M.S.A.....	66
7.1. Matériels.....	66
7.1.1. Pour la stimulation des cellules	66
7.1.2. Pour l'extraction	67
7.1.3. Pour le marquage de la sonde	67
7.1.4. Pour la liaison sonde-protéine	68
7.1.5. Pour l'électrophorèse	68
7.1.6. Pour la révélation sur film	69
7.2. Méthode.....	69
7.2.1. Cellules en suspension.....	69
7.2.1.A. Culture des cellules.....	69
7.2.1.B. Stimulation.....	69
7.2.1.C. Récolte des protéines	70
7.2.2. Cellules adhérentes	70
7.2.2.A. Culture des cellules.....	70
7.2.2.B. Stimulation.....	70
7.2.2.C. Extraction	70
7.2.3. La liaison de la sonde aux protéines	71
7.2.4. Electrophorèse	71
7.2.5. Analyse et quantification	71
7.2.5.A Sur film autoradiographique	71
7.2.5.B Sur Instantimager	72
8. ELISA.....	72
8.1. Principe.....	72
8.2. ELISA IL-6.....	73
8.2.1. Matériels et solutions.....	73
8.2.1.A. Pour la stimulation	73
8.2.1.B. Pour l'ELISA.....	73
8.2.2. Méthode	74
8.2.2.A. Repiquage	74
8.2.2.B. Courbe d'étalonnage.....	74

ELISA IL-6 humain pour les cellules THP-1(ELISA ultrasensible).....	74
ELISA IL-6 murin pour les cellules J774.....	74
8.2.2.C. ELISA	75
8.2.2.D. Mesure de la quantité d'IL-6	75
8.3. ELISA M-CSF.....	76
8.3.1. Matériel.....	76
8.3.2. Méthode	76
8.2.2.A. Repiquage	76
8.3.2.B. Courbe d'étalonnage.....	76
8.3.2.C. ELISA	77
8.3.2.D. Mesure de la quantité de M-CSF	77

RESULATS ET DISCUSSIONS

1. Les modèles cellulaires	78
1.1. Les cellules humaines THP-1	78
1.1.1. Différenciation des monocytes THP-1 en macrophages.....	78
1.1.2. Différenciation des macrophages en cellules spumeuses.....	79
1.2. Les cellules murines macrophagiques J774	80
1.2. Discussion	80
2. Recherche de contrôles positifs pour l'étude de l'activation des monocytes/macrophages, par l'utilisation d'IL-1 β et de LPS	82
2.1. L'activation du facteur de transcription NF- κ B.....	82
2.1.1. Les cellules THP-1	83
2.1.1.A. Sous forme de monocytes	83
Stimulation avec l'interleukine 1 β	83
Stimulation avec des lipopolysaccharides.....	83
2.1.1.B. Sous forme macrophagique.....	84
Stimulation avec l'interleukine 1 β	84
Stimulation avec des lipopolysaccharides.....	84
Tentatives de diminution de l'activation constitutive des macrophages.....	84
2.1.2. Les macrophages murins J774.....	86
Stimulation avec l'interleukine 1 β	86
Stimulation avec des lipopolysaccharides.....	87
2.2. La production de cytokines: l'IL-6.....	87
2.2.1. Les cellules macrophagiques THP-1	88
Stimulation avec l'interleukine 1 β	88

Stimulation avec les lipopolisaccharides.....	88
2.2.2. Les macrophages murins J774.....	89
2.3. Discussion	89
3. Effet de diverses préparations de LDL sur l'activation des monocytes/macrophages non stimulés.....	92
3.1. Sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B chez les monocytes/macrophages THP-1.....	92
3.1.1. Les monocytes THP-1	92
3.1.2. Les macrophages THP-1.....	93
3.2. Sur la production d'IL-6	93
3.2.1. Les macrophages THP-1.....	93
3.2.2. Les macrophages J774.....	94
3.3. Discussion	94
4. Effets de diverses préparation de LDL sur l'activation des macrophages THP-1, induite par les LPS	96
4.1. Etude de la production d'IL-6.....	96
4.2. Discussion	96
5. Effets de différentes préparations de LDL sur la production de M- CSF par les macrophages.....	97
5.1. Etude de la production de M-CSF.....	97
5.2. Discussion	97
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	100
BIBLIOGRAPHIE.....	104

INTRODUCTION

Dans nos pays industrialisés, l'athérosclérose peut être considérée comme responsable de la mort de plus de 50% de la population. Elle provoque une mortalité significative associée aux troubles cardiaques qui en résultent: angine de poitrine, infarctus du myocarde, cardiopathies ischémiques et arrêts cardiaques. Mais, on constate également une mortalité non cardiaque, liée à des accidents cérébrovasculaires, aux maladies vasculaires périphériques et aux embolies pulmonaires (O'Brien, 1994).

L'athérosclérose est caractérisée par un rétrécissement de la lumière artérielle suite à une accumulation de cholestérol dans la paroi. Elle désigne des lésions localisées, appelées "plaques fibreuses" ou "athéromes" qui se développent dans l'intima des grandes artères (aorte, artères coronaires et cérébrales...) à la suite de trois processus: prolifération des cellules musculaires lisses; hyperproduction de collagène, d'élastine et de protéoglycanes; accumulation de lipides extra- et intracellulaires.

D'un point de vue histo-pathologique, le processus se déroule comme suit. La lésion primitive est la strie lipidique, macroscopiquement visible sous l'endothélium. Elle y accumule des macrophages ayant un cytoplasme encombré d'esters de cholestérol. Ces macrophages sont appelés les cellules spumeuses, dérivées de monocytes circulants ayant migré au travers de l'endothélium (Fig 1). Ensuite, ces stries progressent, se multiplient et confluent pour former la plaque fibreuse (Fig 2). Cette lésion est excentrique, occupe l'intima et fait saillie dans la lumière dont elle réduit la section. La plaque repousse l'endothélium par une coque sous-jacente de tissu fibreux dense. Par la suite, des foyers de nécrose et de calcification apparaissent. La plaque peut s'ulcérer, mettant au contact du sang les composants de la lésion au niveau de la couche sous-endothéliale (fibres de collagène, débris cellulaires, phospholipides, etc...). La lésion est alors thrombogène. La thrombose est un accident aigu provoquant l'ischémie et la nécrose des tissus. Cette nécrose ischémique coagulative porte le nom d'infarctus (Hennen, 1983).

Actuellement, les recherches sur la pathogenèse de cette maladie sont essentiellement axées sur le rôle du cholestérol et des différentes lipoprotéines plasmatiques. Cet axe de recherche est logique, étant donné que l'on sait depuis longtemps que les profils de lipoprotéines plasmatiques et en particulier l'abondance des LDL (*low density lipoprotein*, lipoprotéine de faible densité) constituent un facteur de risque majeur. D'autre part, plus récemment, plusieurs équipes de chercheurs, se sont également intéressés aux modifications dans l'expression génétique ayant lieu dans la lésion athérosclérotique précoce. Toutefois, avant d'étudier ces différents aspects, nous allons rapidement rappeler les structures de l'artère.

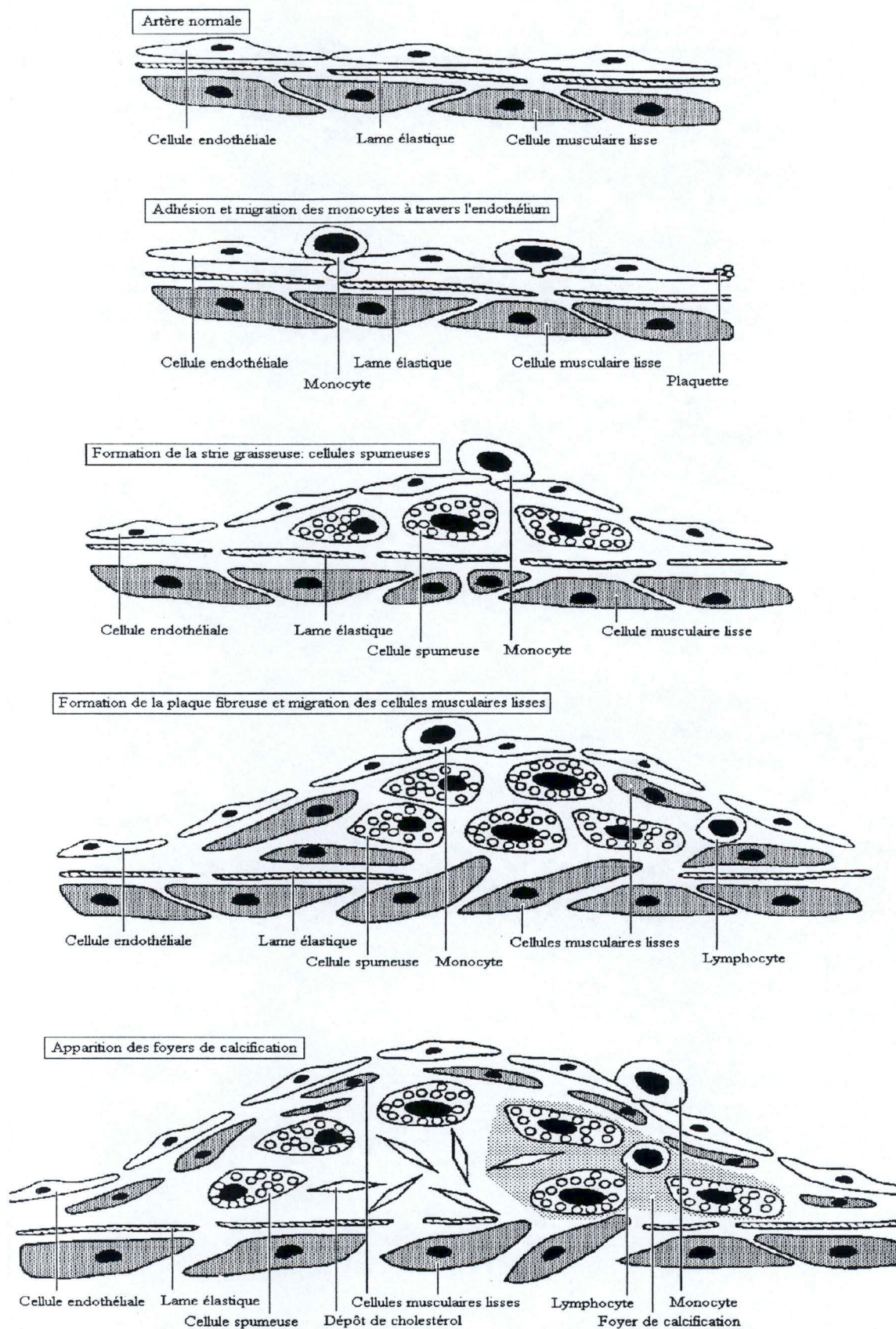


Fig. 1 Athérogenèse d'un point de vue histo-pathologique (d'après Collins, 1996).

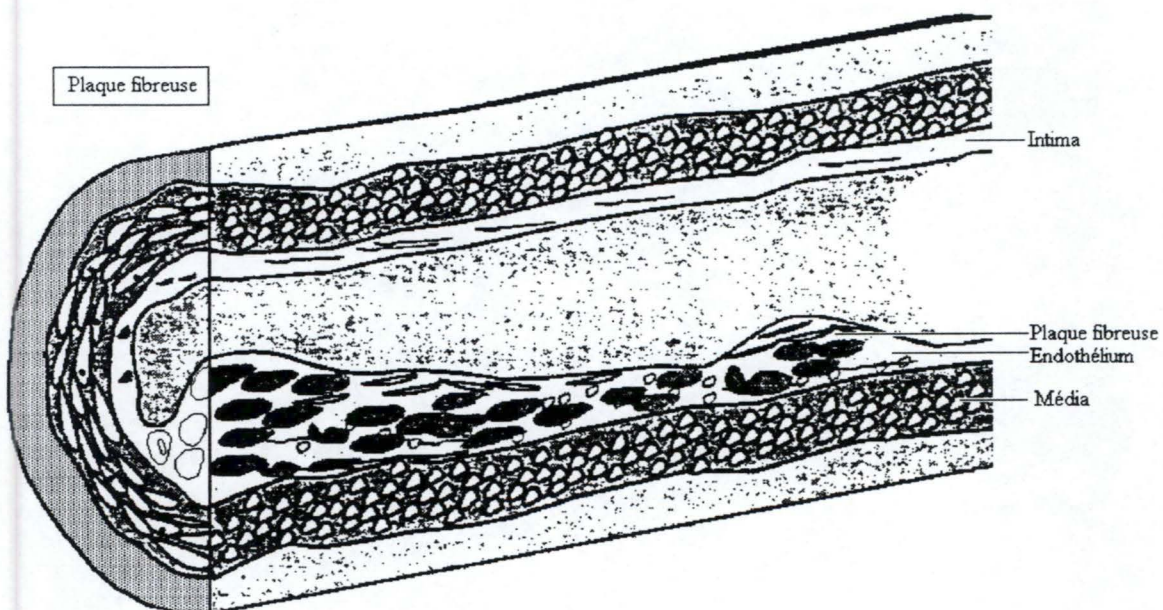
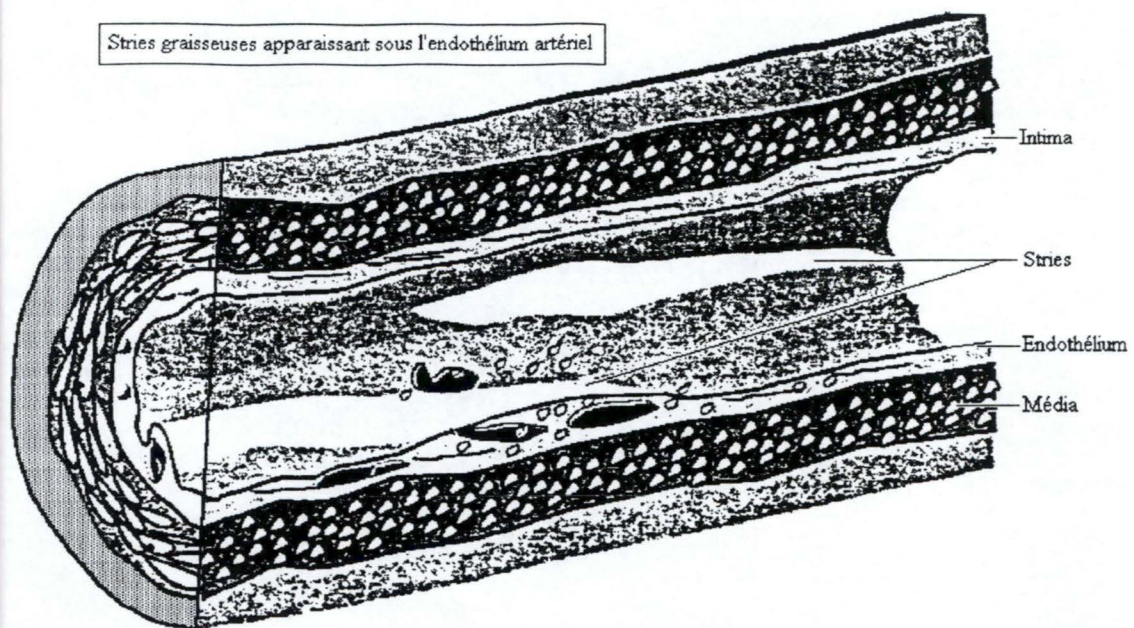


Fig. 2 Progression des stries graisseuses et formation de la plaque fibreuse sous l'endothélium artériel (d'après Hennen, 1993).

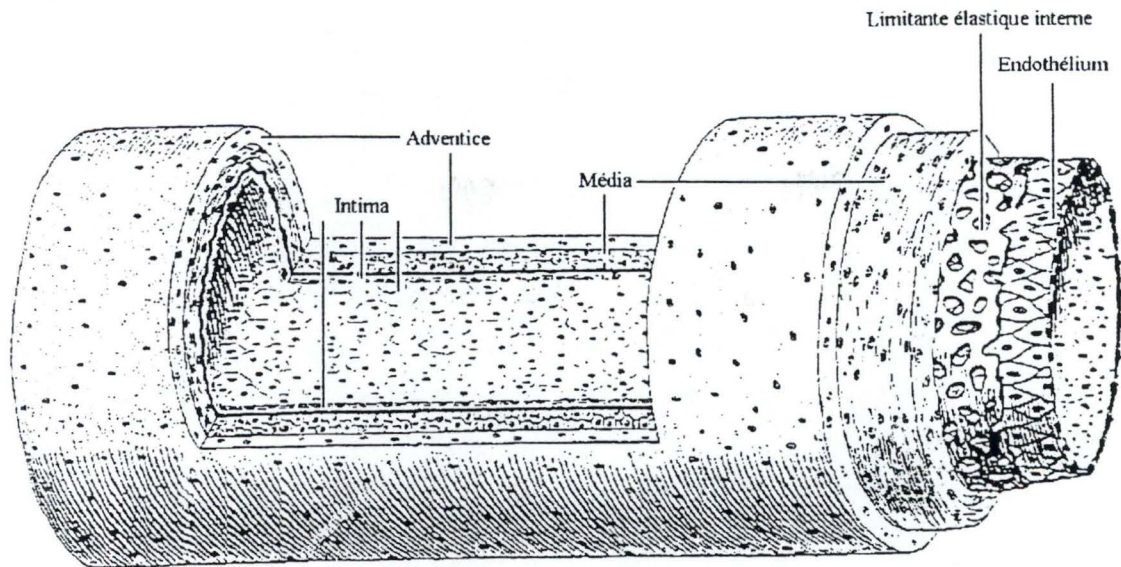


Fig. 3 Schéma d'une artère de moyen calibre (artère musculaire) montrant les différentes tuniques (d'après Junqueira et Carneiro, 1987).

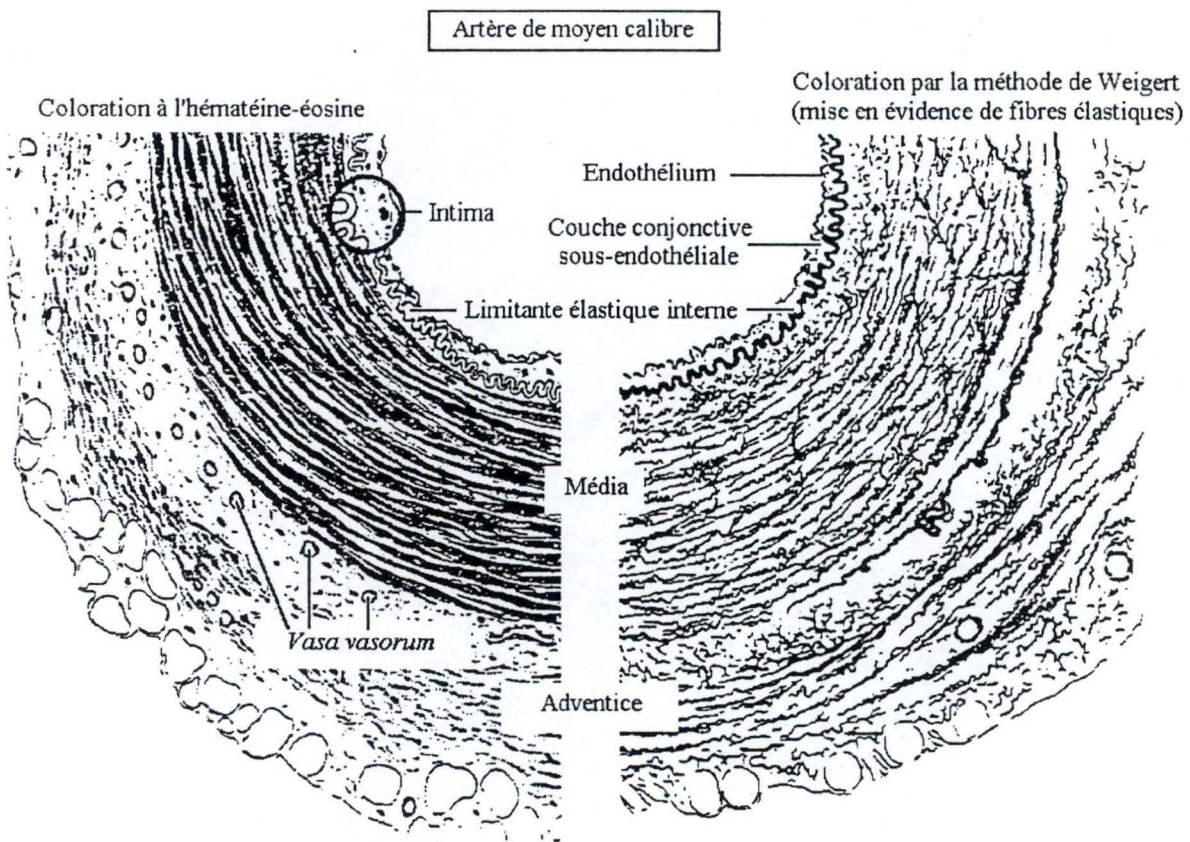


Fig. 4 Schémas comparatifs d'une artère de moyen calibre, par la coloration classique à l'hématéine-éosine (à gauche), et par la coloration selon Weigert (à droite), qui révèle spécifiquement les fibres élastiques (d'après Junqueira et Carneiro, 1987).

1. L'artère

1.1. Introduction

Les animaux multicellulaires ont besoin d'un système d'acheminement de l'O₂, des éléments nutritifs, d'hormones ou d'autres molécules signal vers les tissus. Ce système d'acheminement doit également permettre l'évacuation des déchets métaboliques vers les organes excréteurs et du CO₂ vers les poumons.

Chez les vertébrés, ces fonctions essentielles sont accomplies par le système vasculaire sanguin. Celui-ci est composé d'une pompe musculaire, le coeur et de deux systèmes de vaisseaux sanguins. L'un d'eux, la circulation pulmonaire, transporte le sang venant des poumons vers le coeur. L'autre, la circulation périphérique, distribue le sang vers tous les autres tissus et organes du corps. Dans les deux cas, le sang pompé du coeur passe successivement dans les artères de diamètre de plus en plus petit pour aboutir à des capillaires. Une fois dans les capillaires, il retourne par des veines dont le calibre est de plus en plus grand au niveau de la circulation périphérique, au fur et à mesure qu'il approche du coeur.

Le sang est donc transporté du coeur jusqu'aux capillaires des tissus par les artères. Celles-ci s'organisent en un système de vaisseaux commençant par l'aorte et l'artère pulmonaire. Celles-ci émergent respectivement des ventricules gauche et droit. Lorsqu'elles s'éloignent du coeur, elles se divisent en branches pour donner une multitude d'artères de calibre de plus en plus petit (Fawcett, 1994).

1.2. Description et structure de l'artère

L'organisation de base de la paroi de toutes les artères est caractérisée par la présence de trois tuniques concentriques, l'intima, la média et l'adventice (Figs 3 et 4).

1.2.1. L'intima

L'intima est composée d'un endothélium, d'une lame basale et d'une couche sous endothéliale.

L'endothélium est constitué d'une couche de cellules de type épithélial pavimenteux, très aplaties, les cellules endothéliales (0,3 à 0,5 μm d'épaisseur en périphérie et 1 à 3 μm au niveau du noyau). Ces cellules sont jointives et le microscope électronique à balayage révèle la présence de microvillosités recouvrant leur surface apicale. Les jonctions entre cellules endothéliales sont de trois types, *occludens*, *adhaerens* et *gap* (ou jonction communicante). Les deux premières jonctions assurent surtout la cohésion de l'endothélium, tandis que le dernier type de jonction joue un rôle dans les échanges métaboliques et ioniques entre cellules endothéliales et dans le contrôle des transports transendothéliaux.

La durée de vie des cellules endothéliales est de 3 à 6 mois. Le renouvellement se fait à partir des mitoses des cellules environnantes. Les cellules endothéliales sont très sensibles aux agressions mécaniques, bactériennes, toxiques, virales,.... Lors d'une réparation après un traumatisme, les cellules en bordure de la lésion se multiplient et la recouvrent. Un traumatisme au niveau de la paroi artérielle et les réactions endothéliales qui en découlent (contraction, dégénérescence, desquamation, prolifération, sécrétion, ...) jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, de la thrombose et des artériopathies oblitérantes.

En temps que tissu de revêtement et barrière, l'endothélium protège les tissus sous-jacents. Il participe également par sa perméabilité sélective aux échanges métaboliques et gazeux entre le sang et les tissus. Il synthétise aussi diverses molécules comme les antigènes A et B des groupes sanguins, des protéines de structure (collagène, élastine), des protéoglycanes, des facteurs de croissance, des prostacyclines et des lipoprotéines lipases. Par ces synthèses, il participe au renouvellement des structures sous-jacentes, aux phénomènes d'hémostase et de thrombose, à la fibrinolyse et à la vasorelaxation. Enfin, les récepteurs endothéliaux sont sensibles à l'action d'hormones et ils semblent capables de répondre aux stimuli contractiles.

La lame basale de l'intima est composée d'un réseau de collagène de type IV, entouré d'une matrice de glycoprotéines adhésives, dont la laminine et de protéoglycanes, dont l'héparane-sulfate. Ensuite, un espace amorphe clair, traversé par de fins filaments, la sépare de la membrane plasmique. La lame basale intervient comme support des cellules et comme "guide" lors de la régénération cellulaire. Elle est aussi une barrière de protection autoimmunitaire.

La couche sous-endothéliale, située entre la lame basale et la première lame élastique, est occupée par une mince couche de tissu conjonctif, des fibres de collagène, des fibres élastiques, des glycoprotéines de structure dont la fibronectine et des cellules d'aspects divers: des fibroblastes, des myocytes fusiformes et étoilés, des macrophages

et des faisceaux de cellules musculaires longitudinales dans certaines artères. La contraction de ces faisceaux réduit la lumière vasculaire afin de réguler le courant sanguin au niveau du coeur, du rein et du poumon. L'épaisseur de la couche sous-endothéliale augmente avec l'âge (200 à 400 μm chez l'adulte) (Junquiera et Carneiro, 1987).

1.2.2. La média

La média est la tunique moyenne de la paroi vasculaire. Elle est constituée de myocytes lisses et d'éléments conjonctifs extracellulaires: fibres de collagènes et élastiques, glycoprotéines et glycoaminoglycanes. Les proportions des différents constituants varient d'un type d'artère à l'autre. La distinction entre artères de type élastique et artères de type musculaire est basée avant tout sur l'architecture de la média (Dadoune, 1990).

La média des artères élastiques, dont l'aorte par exemple, contient plusieurs lames élastiques occupant le tiers de son volume. Les espaces compris entre les lames élastiques contiennent des cellules musculaires, les cellules rameuses et une matrice conjonctive qui occupe également un tiers du volume de la média. Cette matrice est composée de fibres de collagène, de fibres élastiques très fines liant les lames élastiques voisines, de glycoprotéines adhésives (fibronectine, laminine, élastonectine) et de glycoaminoglycanes (Dadoune, 1990).

La média des artères musculaires, de calibre inférieur aux artères élastiques, contient des couches de myocytes à orientation spiralée, des fibres de collagène et une substance amorphe formée de glycoprotéines et glycoaminoglycanes. La composante élastique est fortement réduite.

L'épaisseur de la média augmente de la naissance à l'âge adulte à cause d'un enrichissement en collagène, en protéoglycanes et en élastine.(Dadoune, 1990).

La média peut s'individualiser par la présence d'une limitante élastique interne (entre l'intima et la média) et d'une limitante élastique externe (entre la média et l'adventice), selon le type et le calibre des artères.

1.2.3. L'adventice

Elle constitue la tunique externe de la paroi vasculaire, dont l'épaisseur varie selon le calibre du vaisseau. Elle contient des fibroblastes, différentes cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, plasmocytes), du collagène et des fibres élastiques. Elle contient également des adipocytes, des fibres nerveuses (*nervi vasorum*) ainsi que chez les artères de gros calibre, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, les *vasa vasorum*. Enfin, l'artère est liée aux tissus voisins par un tissu conjonctif lâche (péri-adventice) (Dadoune, 1990).

1.2.4. Vascularisation et innervation

La nutrition de la paroi vasculaire se fait par diffusion à partir du sang intraluminal pour la partie interne. L'oxygène et les substances nutritives traversent l'endothélium et diffusent à travers la média pour être évacués par les vaisseaux lymphatiques de l'adventice. Toutefois, pour les vaisseaux de gros calibres, la paroi devient trop épaisse et les *vasa vasorum* de l'adventice deviennent indispensables pour assurer les apports de l'O₂ et des nutriments.

L'innervation se fait à l'aide des fibres nerveuses de la paroi vasculaire: les *nervi vasorum*, dépendant du système autonome. Les fibres vasomotrices contrôlent le calibre vasculaire. La plupart sont sympathiques et provoquent une vasoconstriction. Certaines artères contiennent néanmoins des fibres parasympathiques, vasodilatatrices. Il existe également des fibres sensorielles, innervant différents types de récepteurs, dont les barorécepteurs, les chémorécepteurs, ... La plupart des terminaisons nerveuses s'arrêtent à la jonction média-adventice (Dadoune, 1990).

1.3. Les artères de large calibre ou artères élastiques

Les artères peuvent être classées en fonction de leur diamètre. Par diamètre croissant, on peut distinguer les artéριοles alimentant les tissus, les artères de petit et moyen calibre (artères musculaires acheminant et distribuant le sang vers les tissus) et les artères de large calibre ou artères élastiques. Ce sont ces dernières qui sont principalement impliquées dans l'athérosclérose.

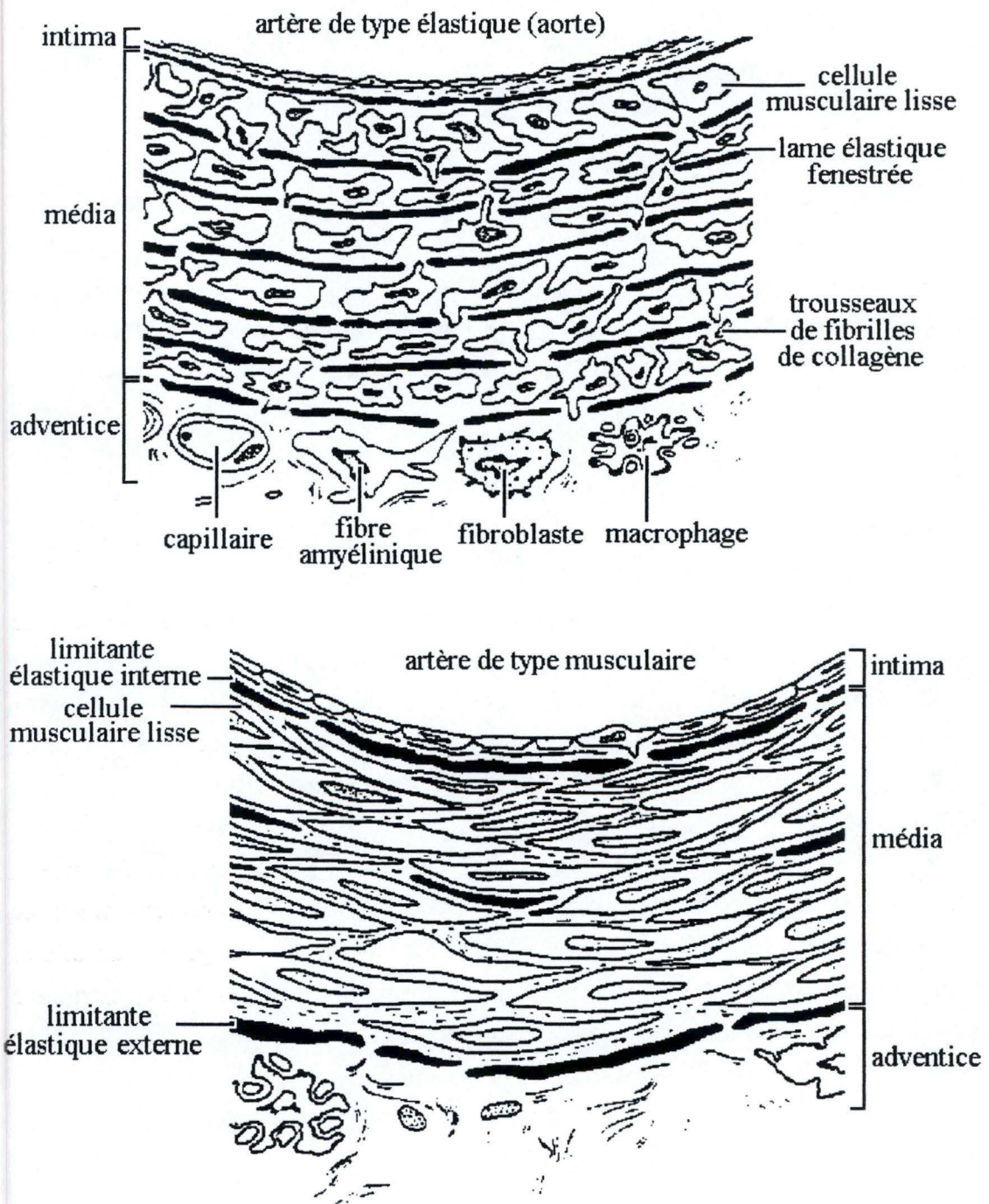


Fig. 5 Schémas d'une artère de type élastique et de type musculaire (d'après Dadoune, 1990).

Les artères de large calibre sont aussi appelées artères de transport ou conductrices car leur rôle principal est de véhiculer le sang. Elles comportent l'aorte et ses branches de division les plus volumineuses (Dadoune, 1990).

L'intima est épaisse et bordée par des cellules endothéliales, qui reposent sur une lame basale. La couche conjonctive sous-endothéliale est épaisse. Les fibres conjonctives se disposent selon une orientation longitudinale et jouent un rôle important dans le libre mouvement de l'endothélium durant les contractions et les dilatations rythmiques des vaisseaux. La limitante élastique interne n'est pas toujours visible car elle est souvent confondue avec les lames élastiques de la tunique suivante, contrairement aux artères musculaires (Fig 5).

La média est constituée d'une série de lames élastiques fenestrées et disposées concentriquement. Elles alternent avec de fines couches de cellules musculaires lisses circulaires ainsi que des fibres de collagène et d'élastine baignant dans une matrice extracellulaire de protéoglycanes.

L'adventice ne possède pas de limitante élastique externe. Elle est bien développée et contient des fibres de collagène et des fibres élastiques.

Après avoir rappelé la structure des artères, et en particulier celle des artères élastiques, principalement affectées dans l'athérosclérose, nous passons rapidement en revue les monocytes/macrophages, cellules majoritairement à l'origine des cellules spumeuses. Ces dernières, bourrées de lipides, s'accumulent au niveau de la strie lipidique.

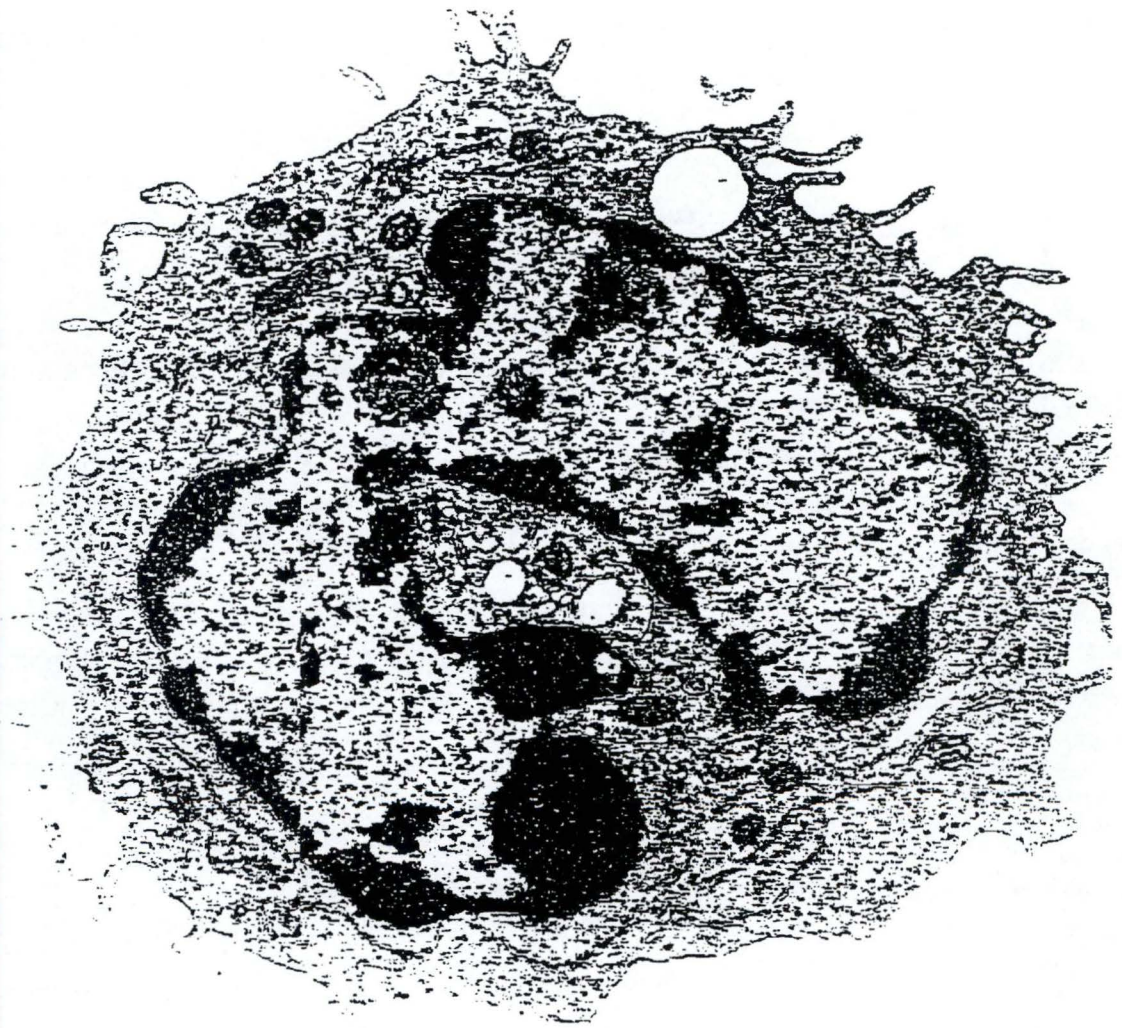


Fig. 6 Micrographie électronique d'un monocyte (d'après Fawcett, 1994).

2. Les monocytes/macrophages

Les monocytes sont les plus grandes cellules sanguines. En suspension, ces cellules sont sphériques et mesurent 9 à 18 μm de diamètre. Elles représentent 3 à 8% des leucocytes de la circulation. Leur noyau est réniforme et il joint parfois les côtés opposés de la cellule, donnant à celle-ci un aspect caractéristique en drapeau. Le cytoplasme contient quelques granules azurophiles et les organites, en microscopie électronique, apparaissent peu développés. (Fawcett, 1994) (Fig 6).

2.1. Le développement de la lignée monocyttaire en macrophages *in vivo*

Les monocytes proviennent de la moelle osseuse. Matures, ils sont au nombre d'environ 7.10^9 monocytes dans la moelle osseuse d'un homme adulte et d'environ 2.10^9 dans le sang où leur temps de demi-vie est estimé à trois jours. Leur taux de production par jour est donc d'environ 1.10^9 (Wyngaarden and Smith, 1982).

La première cellule précurseur engagée dans la lignée monocyttaire est la cellule CFU-GM (*colony forming unit, granulocyte-monocyte*). Ces CFU-GM donneront d'une part les CFU-G (*colony forming unit, granulocyte*) dont dérivent les granulocytes neutrophiles et d'autre part les CFU-M (*colony forming unit, monocyte*) dont dérivent les monocytes (Fig 7). Des facteurs de croissance hématopoiétiques de nature glycoprotéique, les *colony stimulating factors* (CSF) provoquent la différenciation de la cellule souche CFU-M en monoblaste qui se différencie ensuite en promonocyte, premier stade morphologiquement identifiable de cette lignée. Les facteurs contribuant au développement de cette lignée sont le G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), le GM-CSF (*granulocyte-macrophage stimulating factor*) et l'interleukine 3 (ou multi CSF).

Les promonocytes se différencient ensuite en monocytes. Après 24 heures dans la moelle osseuse, ceux-ci gagnent la circulation. Ils n'ont pas de fonction bien définie, ils servent surtout de réserve de cellules circulantes.

Ces cellules sont alors capables de traverser la paroi vasculaire pour migrer vers les tissus où ils se différencient en macrophages tissulaires. Ces derniers sont extrêmement hétérogènes tant du point de vue structurel que fonctionnel. Ils regroupent des cellules aussi différentes que les cellules de Kupffer du foie, les ostéoclastes des os,

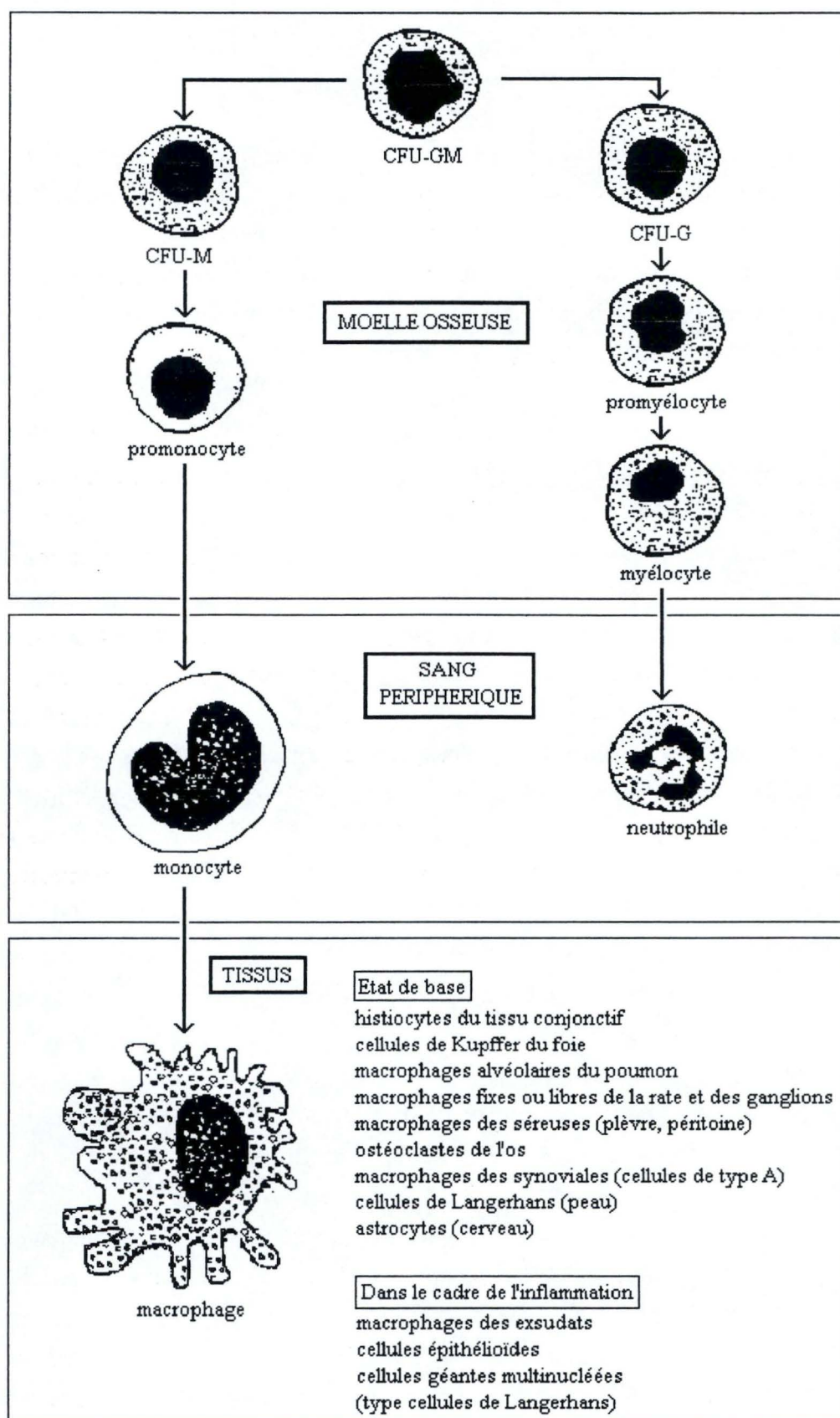


Fig. 7 Développement des lignées monocyttaire et granulocytaire neutrophile.

les cellules de Langerhans de la peau ou les macrophages alvéolaires du poumon. En outre, dans un contexte inflammatoire chronique, les macrophages peuvent adopter des morphologies très particulières (cellules épithéloïdes, cellules géantes, ...)

La durée de vie du macrophage tissulaire, hormis lors des phénomènes infectieux ou inflammatoires, est de quelques mois. Les macrophages tissulaires ne reviennent apparemment pas vers la circulation générale et meurent dans les tissus sauf lorsqu'ils transportent des antigènes, ils sont alors entraînés par la lymphe vers les ganglions lymphatiques (Assim, 1991).

Comme toutes les cellules immunitaires, les monocytes/macrophages ont été bien caractérisés en ce qui concerne leurs antigènes et leurs glycoprotéines de surface. Signalons en particulier la présence d'un grand nombre de récepteurs. Les macrophages possèdent des récepteurs pour les immunoglobulines, pour le complément et pour de nombreuses cytokines. Ces dernières jouent un rôle fondamental dans l'activation des macrophages et dans leur action cytotoxique. Ils peuvent être activés eux-mêmes par des substances d'origine microbienne (lipopolysaccharides ou LPS, par exemple) ou par certains acteurs de l'immunité. Ils possèdent également des récepteurs hormonaux et des récepteurs pour des facteurs chimiotactiques comme le C5a.

Enfin, les monocytes possèdent le récepteur aux LDL natives et au cours de leur différenciation en macrophages, ils vont acquérir un récepteur supplémentaire, le récepteur *scavenger* reconnaissant des LDL modifiées dont il sera question au paragraphe 4.5.2.A.

2.2. Différenciation des monocytes *in vitro*

2.2.1. Processus de différenciation

Le processus de différenciation des monocytes en macrophages peut être également initié *in vitro* en favorisant l'adhérence des monocytes sur des supports définis. De fortes variations dans la morphologie de la cellule sont observées durant le processus de différenciation. Lorsque les monocytes commencent à adhérer au verre ou aux surfaces plastiques, ils paraissent arrondis. Après quelques jours, la majorité de ces cellules s'aplatissent et s'étalent. Leur taille augmente par l'allongement de leur cytoplasme et le nombre de granules et d'inclusions lipidiques croît (Dougherty and Bride, 1989).

Lignée cellulaire	Pathologie	Source	Type de cellule prédominante en culture
KG-1	leucémie érythrocytique progressant en une leucémie myéloïde aiguë indifférenciée	moelle osseuse	myéloblaste
HL-60	leucémie myéloïde aiguë	cellules mononucléées du sang périphérique	promyélocyte
M20	leucémie myéloïde aiguë	cellules mononucléées du sang périphérique	myéloblaste promyélocyte
ML-1 / ML-3	leucémie myéloïde aiguë	cellules mononucléées du sang périphérique	myéloblaste
RC-2A	leucémie myélomonocytaire aiguë	cellules mononucléées du sang périphérique	myéloblaste
JOSK-1	leucémie myélomonocytaire aiguë	cellules mononucléées du sang périphérique	monoblaste
THP-1	leucémie monocytique aiguë	cellules mononucléées du sang périphérique	monocytoïde
U937	lymphome histiocytique	effusion pleurale	monocytoïde

Tableau 1 Lignées cellulaires myéloïdes humaines (d'après Lyons et Ashman, 1991).

La différenciation des monocytes *in vitro* présente deux caractéristiques majeures. Tout d'abord, le processus de différenciation dépend de la présence de sérum humain. D'autres sources de sérum comme le sérum de cheval ou le sérum foetal de veau limite la maturation en macrophages (Dougherty and Bride, 1989). Ensuite, le substrat d'adhésion paraît jouer un rôle important dans l'initiation de cette différenciation. La nature de la surface sur laquelle les cellules adhèrent est importante et l'interaction avec les protéines de la matrice extracellulaires semble influencer le taux et la direction de différenciation (Kaplan and Gaudernack, 1982).

Grâce aux techniques d'isolation et de purification, il a été démontré que les monocytes provenant des cellules souches hématopoiétiques de la moelle osseuse ont besoin du *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) (Stanley, 1985). Celui-ci est indispensable à la prolifération et à la différenciation des cellules de la lignée myéloïde. Les monocytes et les macrophages produisent eux-mêmes le M-CSF (Rambaldi and al., 1987) mais pas de manière constitutive. Différents stimuli, comme l'adhérence à des substrats solides, induisent la synthèse de mRNA pour le M-CSF chez les monocytes. Les cellules sécrètent également des quantités significatives de M-CSF lorsqu'elles sont stimulées avec des agents solubles tels que des LPS (lipopolysaccharides) ou du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Ralph, 1989).

2.2.2. Les lignées monocytaires

Signalons qu'il existe une série de lignées monocytaires, utilisées comme modèles en culture de monocytes/macrophages, telles que les cellules U937, HL60, THP-1,...(Tableau 1). La plupart de ces lignées de cellules sont d'origine leucémique et présentent donc certaines anomalies. Enfin, elles ne sont pas toutes au même stade dans le développement de la lignée monocyttaire (Lyons and Ashman, 1989).

Comme les monocytes purifiés à partir du sang, on peut également les différencier en cellules de type macrophagique par l'adjonction par exemple d'esters de phorbol, tels que le PMA. L'induction de la différenciation ne correspond pas toujours à l'acquisition de toutes les caractéristiques d'une cellule macrophagique normale. De plus, les cellules leucémiques comme les cellules de lignées qui en dérivent, présentent souvent des défauts dans leur différenciation en macrophages. Par exemple, lorsqu'on incube les cellules HL-60 avec du G-CSF ou du GM-CSF, leur différenciation ne se produit pas.

Néanmoins, si on tient compte de ces limitations, les lignées cellulaires procurent une source abondante de matériel valable dans l'étude de la différenciation et

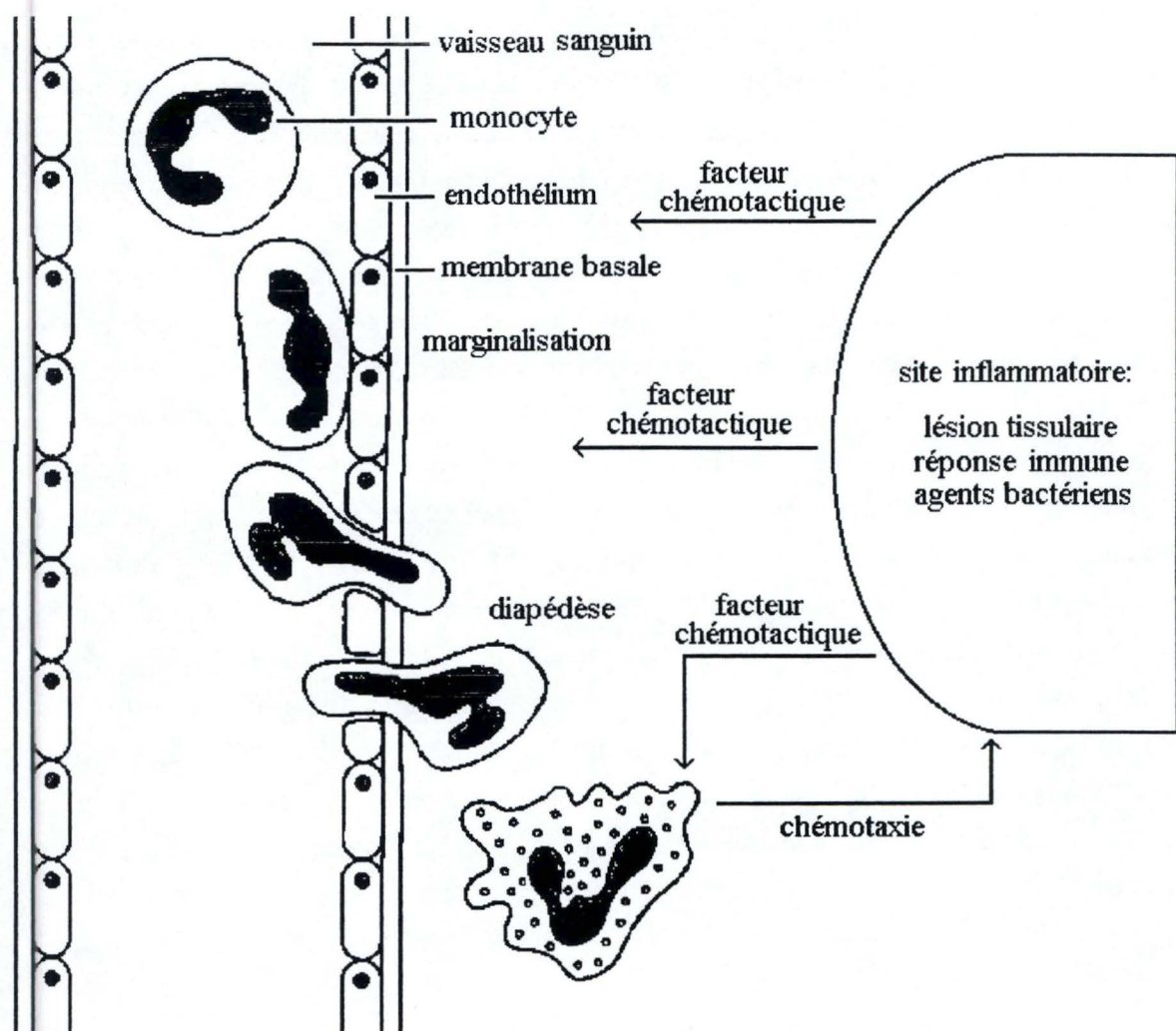


Fig. 8 Chimotaxie au niveau tissulaire (d'après Roitt, 1993).

des fonctions des monocytes/macrophages. Ils sont également un outil performant pour la caractérisation des monokines et des récepteurs car ils se prêtent bien au clonage des gènes correspondants. Ils sont aussi fréquemment utilisés dans l'étude de la transduction du signal et des mécanismes intracellulaires en réponse à diverses cytokines (Lyons and Ashman, 1989).

Enfin, elles sont fréquemment utilisées comme modèle de macrophage lorsque l'on veut étudier les interactions cellulaires et leurs implications dans certains processus pathologiques. Dans le cas de l'athérosclérose, les cellules humaines THP-1 différenciées ou non en macrophages ont fait l'objet de nombreux travaux, ainsi que les macrophages murins J774.

2.3. Les fonctions principales des macrophages

2.4.1. La chimotaxie

2.4.1.A. Au niveau tissulaire

Lors d'un stimulus inflammatoire, la mobilisation des monocytes circulants débute par leur adhérence grâce à des protéines spécifiques de liaison, à l'endothélium vasculaire. Ensuite, ils vont développer des contacts multiples en s'aplatissant sur l'endothélium. La diapédèse et la migration à travers la membrane basale du vaisseau leur permet de remonter le gradient de concentration en médiateurs inflammatoires (Fig 8). Les stimuli inflammatoires ou les facteurs chimotactiques sont des signaux chimiques qui émanent de réactions immunologiques ou de blessures tissulaires et qui attirent et activent les cellules phagocytaires avoisinantes.

Le corps humain produit un bon nombre de facteurs chimotactiques très hétérogènes par leur nature, passant de petits peptides et de lipides à des protéines proches de 100 kD. Il existe des facteurs chimotactiques exogènes, humoraux (C5a), cellulaires, cytokiniques (IL-8, interleukine 8) et lipidiques (par exemple, leucotriènes, PAF(*platelet activating factor*), LDL).

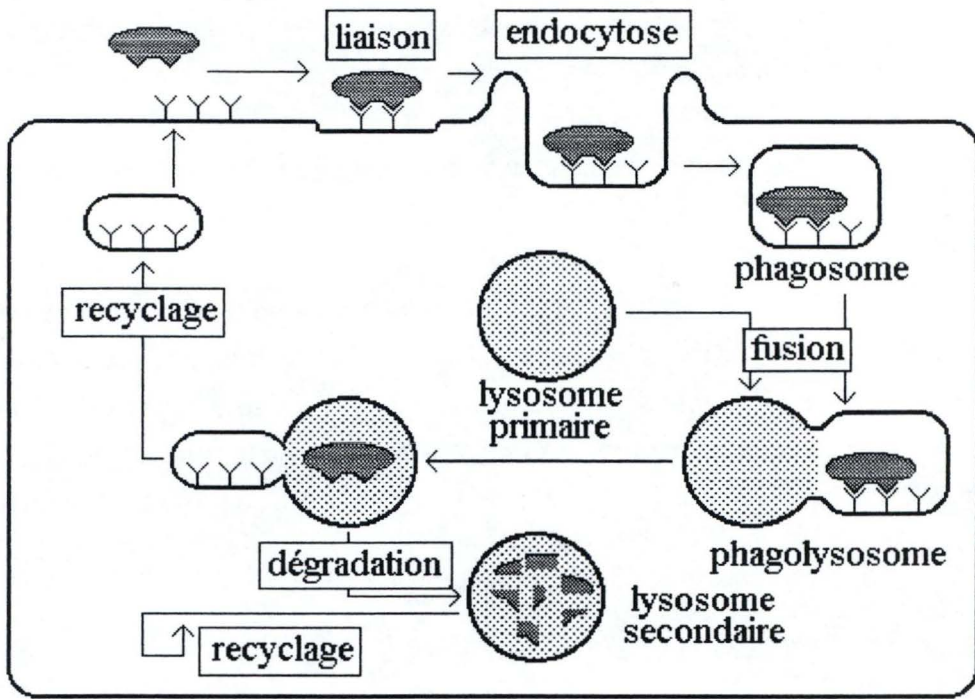


Fig. 9 Phagocytose par un macrophage.

2.4.1.B. Au niveau cellulaire

Les monocytes circulants sont sphériques mais dès qu'ils sont exposés à un stimulus chimotactique, ces cellules adoptent une configuration triangulaire ou "polarisée". Ces changements de forme ont lieu en même temps qu'une augmentation de la quantité d'actine filamenteuse et que la redistribution de sa forme diffuse en un réseau localisé d'un côté de la cellule. Dans un gradient chimotactique, les cellules étendent ce côté de manière à former un prolongement (Howard and Oresajo, 1985). Certains sites de liaison à la surface, incluant les récepteurs Fc et des facteurs chimotactiques, s'organisent afin de former une région déterminée sur le prolongement. Durant la migration, ces récepteurs paraissent être balayés vers l'arrière du lamellipode où ils sont internalisés.

2.4.2. La phagocytose

Elle est définie comme l'ingestion (endocytose) de particules. Elle peut être arbitrairement scindée en quatre étapes (Fig 9). La première étape, le chimotactisme, est caractérisée par le déplacement du macrophage vers les zones de haute concentration en facteurs chimotactiques, c'est-à-dire vers la source de substances à phagocyter. Ensuite, la seconde étape consiste en l'adhérence des macrophages à la particule à ingérer, grâce à une série de récepteurs de membrane.

Après l'adhérence, a lieu l'endocytose au cours de laquelle une expansion cytoplasmique englobe progressivement la particule. Celle-ci se trouve finalement incluse dans un phagosome, vacuole constituée par une portion de membrane. La dernière étape est la fusion du phagosome avec un lysosome, vésicule riche en enzymes lytiques. Cette fusion va entraîner la destruction de la particule par des mécanismes très variés: mécanismes enzymatiques, formation d'eau oxygénée et de radicaux libres.

2.4.3. Autres fonctions

Le macrophage est cytotoxique lorsqu'on lui présente des cellules recouvertes d'anticorps (réaction ADCC, *antibody dependant cell-mediated cytotoxicity*), des cellules tumorales ou des cellules allogéniques. De plus, lorsqu'il est activé, il peut produire de nombreuses substances:

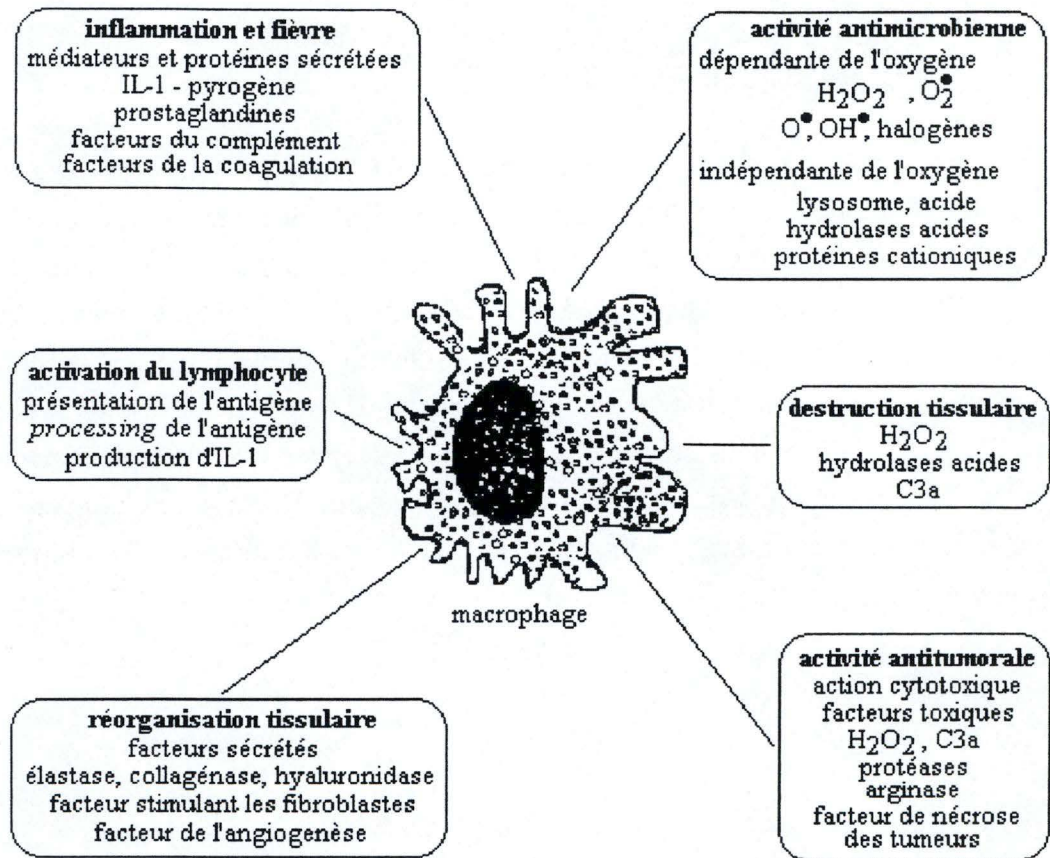


Fig. 10 Rôle central des macrophages dans l'inflammation (d'après Roitt, 1993).

- des enzymes: activateurs du plasminogène, collagénase, protéases cytotolytiques, des hydrolases acides,...
- des protéines plasmatiques: fractions du complément, facteurs de coagulation, fibronectine, inhibiteurs de la trypsine, apolipoprotéines E...
- des glycoprotéines comme l'IFN α et β , le TNF α , l'érythropoïétine, le GM-CSF, l'interleukine 6, le TGF β (*transforming growth factor β*)

Enfin, il intervient dans la réponse immunitaire. Après avoir ingéré l'antigène, il le dégrade et présente des fragments antigéniques à sa surface afin qu'ils soient reconnus par un lymphocyte T. Les macrophages exercent des fonction stimulantes aussi bien qu'inhibitrices sur les réponses immunitaires cellulaires et humorales. (Assim, 1991) (Fig 10).

	chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
poids moléculaire x 10⁻⁶	> 4 x 10 ²	5 - 6	2,3	0,18 - 0,36
densité	< 1,006	0,95 - 1,006	1,006 - 1,063	1,063 - 1,210
composition chimique (%)				
tricylglycérols	85	50	10	4
cholestérol libre	1	7	8	2
esters de cholestérol	3	12	37	15
phospholipides	9	18	20	24
protéines	2	10	23	55
principales apoprotéines	A-I B C	B C-I C-II C-III E	B	A-I A-II

Tableau 2 Les quatre classes de lipoprotéines plasmatiques et leurs caractéristiques (d'après Rawn, 1990)

3. Les lipoprotéines de faible densité

Au niveau biochimique, le développement de l'athérosclérose est fortement lié au métabolisme du cholestérol et à son transport. Les lipoprotéines plasmatiques constituent le mode de transport du cholestérol (estérifié ou non) et des triglycérides entre les différents tissus. Un déséquilibre entre apport alimentaire et production de cholestérol par rapport à sa distribution et à son utilisation tissulaire peut provoquer son accumulation dans des tissus conduisant aux lésions vasculaires dégénératives (Hennen, 1993).

3.1. Le métabolisme du cholestérol et son transport

Le cholestérol est insoluble dans l'eau, il n'est donc pas présent en temps que tel dans le flux sanguin. Ainsi, avant de passer dans le sang, il doit subir quelques modifications et s'associer à des protéines, les apolipoprotéines. Ces molécules porteuses forment avec le cholestérol et les triglycérides principalement, les lipoprotéines. Le cholestérol n'a pas le même effet physiologique selon la composition du complexe lipoprotéinique qui le transporte. Les apolipoprotéines interviennent aussi dans le mécanisme de reconnaissance des lipoprotéines par les récepteurs des cellules de l'organisme. Elles orientent donc le métabolisme du cholestérol (Fruchart, 1992).

On classe généralement les lipoprotéines en quatre classes selon leur densité (Tableau 2):

- les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*high density lipoprotein*)
- les lipoprotéines de faible densité ou LDL
- les lipoprotéines de très faible densité ou VLDL (*very low density lipoprotein*)
- les chylomicrons, particules lipoprotéiniques de très grande taille et de très faible densité.

Les HDL et VLDL sont synthétisés par le foie, et dans une moindre mesure par l'intestin. Les LDL dérivent des VLDL. Les chylomicrons trouvent leur origine dans l'intestin et constituent les vésicules principales de transport des triglycérides. Les LDL véhiculent principalement le cholestérol et ses esters tandis que les HDL transportent principalement les phospholipides. Mais toutes ces lipoprotéines présentent la même architecture de base: un noyau central formé de triglycérides et d'esters de cholestérol et une gaine faite de phospholipides, de cholestérol et d'apolipoprotéines périphériques (par exemple l'apolipoprotéine C) et structurales (par exemple l'apolipoprotéine E).

Apoprotéines	Poids moléculaires	Fonctions	Concentrations plasmatiques	Sites de synthèse	de la fraction protéique		
					VLDL %	LDL %	HDL %
Apo AI	23 300	<ul style="list-style-type: none"> • activateur LCAT • permet efflux du cholestérol 	1,10 à 2 g/l	foie intestin	4		67
Apo AII	17 000	structuration des HDL	0,4 g/l	foie intestin			22
Apo AIV	45 000	permet efflux du cholestérol	0,15 g/l	intestin			
Apo B100	540 000	<ul style="list-style-type: none"> • sécrétion VLDL • ligand du récepteur LDL 	0,6 à 1,40 g/l	foie	35	90	
Apo B48	275 000	sécrétion chylomicrons	0,03 à 0,05 g/l	intestin			
Apo CI	7 000	activateur LCAT (in vitro)	0,04 à 0,06 g/l	foie	40		5-9
Apo CII	8 900	activateur LPL	0,03 à 0,05 g/l	foie			
Apo CIII	8 700	inhibiteur LPL	0,12 à 0,14 g/l	foie			
Apo D	33 000	métabolisme des esters du cholestérol	0,06 à 0,07 g/l	gonades rein foie placenta intestin			
Apo E	38 000	ligand du récepteur LDL et du récepteur IDL	0,03 à 0,05 g/l	foie intestin surrénales macrophages	13		

Tableau 3 Caractéristiques majeures des principales apolipoprotéines (d'après Solera, 1993).

LCAT = lécithine cholestéryl acyl transférase

LPL = lipoprotéine lipase

IDL = *intermediate density lipoprotein*
(étape intermédiaire entre VLDL et LDL)

Les caractéristiques majeures des apolipoprotéines sont reprises dans le tableau 3, avec en particulier leurs sites de synthèse et le pourcentage de la fraction protéique dans les VLDL, les LDL et les HDL. L'apolipoprotéine B est l'apolipoprotéine des lipoprotéines athérogènes, les LDL et les VLDL. Tandis que l'apolipoprotéine A₁ est la principale apolipoprotéine des lipoprotéines "protectrices" de l'athérome, les HDL.

Lorsqu'on envisage le métabolisme des lipoprotéines, il faut considérer deux voies différentes: la voie exogène, prenant son origine dans l'intestin à partir des lipides alimentaires et la voie endogène, démarrant à partir du foie (Fig 11).

3.1.1. Le transport des lipides endogènes et exogènes

La synthèse endogène de triglycérides est réalisée à partir du glucose dans le foie. Les adipocytes peuvent aussi libérer des acides gras libres. Ceux-ci, transportés par l'albumine du sérum jusqu'au foie, participent également à la synthèse endogène des triglycérides. Enfin, le cholestérol peut être synthétisé à partir de l'acétyl CoA à raison de 800 mg/jour.

Les apports lipidiques exogènes sont d'origine végétale (riches en acides gras insaturés) et animale (riches en acides gras saturés). Cet apport représente environ 200 mg/jour. Dans le tube digestif, les sels biliaires vont fixer une colipase activatrice sur la lipase pancréatique. Cette dernière, activée, va dégrader les lipides alimentaires afin d'obtenir des acides gras, du glycérol, des monoglycérides et des diglycérides qui seront absorbés par la muqueuse intestinale.

3.1.2. Les chylomicrons et les VLDL

Arrivé dans l'intestin, le cholestérol alimentaire est capté par les entérocytes où il est estérifié grâce à une enzyme, l'acétyl CoA acyl transférase (ACAT) (Fruchart, 1992 et Havel, 1991). Après son estérification, il s'enveloppe dans un manteau contenant des phospholipides, des triglycérides et des apolipoprotéines afin de former des chylomicrons capables de circuler dans le sang et la lymphe (O'Brien, 1994).

Une faible partie des VLDL (20 %) est également synthétisée par l'intestin à partir des lipides exogènes. L'autre partie (80 %) est synthétisée par le foie avec les triglycérides d'origine endogène.

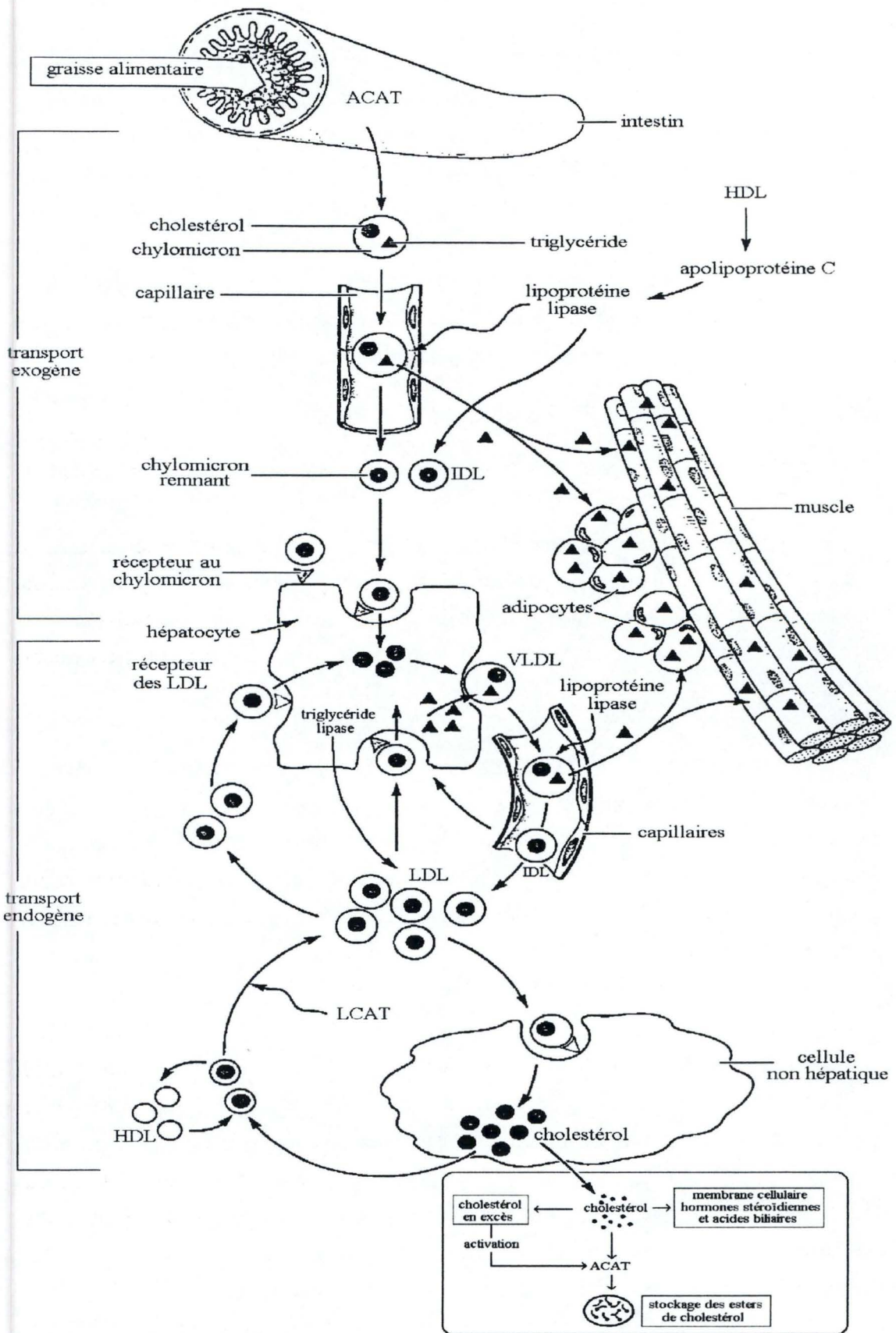


Fig. 11 Transport des lipides endogènes et exogènes (d'après Rubin, 1994).

Ces deux types de lipoprotéines d'origine intestinale vont ensuite être transportées dans la lymphe puis le sang. Au niveau de l'endothélium des capillaires, leurs triglycérides vont être dégradés en acides gras et en glycérol grâce à la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme est activée par l'apolipoprotéine C cédée précédemment par les HDL. Les acides gras ainsi libérés peuvent soit s'oxyder et libérer de l'énergie pour les différents tissus, soit être stockés par les adipocytes sous forme de triglycérides.

Après l'action de la LPL, les chylomicrons sont transformés en particules résiduelles, fantômes ou "remnants" et les VLDL en lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL, *intermediate density lipoprotein*). Les chylomicrons « remnants » bien qu'ils aient perdu environ 80 % de leurs triglycérides, sont toujours reconnus directement par le récepteur à apolipoprotéine B/E du foie et sont dégradés. 50 % des IDL continuent de subir l'action de la LPL, et se transforment en LDL, tandis que les 50 % restants sont reconnus par le récepteur du foie. Dans les hépatocytes, les IDL subissent alors une transformation sous l'action de la triglycéride lipase hépatique. Les esters de cholestérol et les triglycérides sont alors sécrétés par les hépatocytes sous forme de VLDL, en présence d'apolipoprotéine B. Les VLDL sont donc les précurseurs des IDL, et les IDL, les précurseurs des LDL.

3.1.3. Le métabolisme des LDL

Les LDL proviennent donc principalement des VLDL, via l'étape intermédiaire des IDL. Donc, une particule de VLDL donnent une particule de LDL. Mais, le foie semble aussi capable d'en produire une certaine quantité.

Les LDL ainsi formées circulent dans le sang vers les tissus périphériques et le foie. Elles sont alors reconnues par le récepteur à apolipoprotéine B/E et endocytées. Après leur dégradation, le cholestérol libre et les acides aminés de l'apolipoprotéine B peuvent être recyclés. Le cholestérol libre (Fig 11) peut être utilisé pour la synthèse de membranes ou d'hormones stéroïdiennes, stocké sous forme d'ester grâce à l'ACAT ou peut inhiber l'enzyme régulatrice de la synthèse de cholestérol ainsi que la synthèse du cholestérol.

Certaines LDL ne sont pas captées par les récepteurs à apolipoprotéine B/E car elles sont modifiées chimiquement. Elles sont alors endocytées par la voie du récepteur "scavenger" des macrophages. Ce récepteur, contrairement au récepteur normal, n'est pas régulé par le taux de cholestérol. Le cholestérol s'accumule donc en excès dans les

macrophages se transformant alors en cellules spumeuses. Nous verrons ce point plus en détail ultérieurement.

3.1.4. Le métabolisme des HDL

Les HDL plasmatiques peuvent être originaires de l'intestin et du foie ou formées à partir de chylomicrons et de VLDL.

Les HDL sécrétées par les hépatocytes et libérées dans la circulation sont dites "naissantes". Elle ne contiennent pas de cholestérol estérifié et se présente sous forme de disque. Après s'être enrichit petit à petit de cholestérol et de phospholipides, le disque se transforme en sphère.

Ces HDL sphériques continuent de recevoir du cholestérol et l'estérifie grâce à leur lécithin cholestéryl acyl transférase (LCAT). Elles se transforment alors en HDL de plus grande taille et de densité plus légère car plus riches en triglycérides. Cette nouvelle HDL transporte les stérides vers le foie ou vers les autres lipoprotéines, les VLDL et les LDL (Solera, 1993).

Ces HDL ont diverses fonctions. Tout d'abord, elles interviennent dans la lipolyse des chylomicrons et des VLDL en leur donnant l'apolipoprotéine C. Ensuite, elles jouent un rôle anti-athérogénique car 20 à 30 % des HDL totales épurent l'excès de cholestérol grâce à leur "transport inverse de cholestérol". Celui-ci s'organise en quatre étapes.

- récupérer l'excès de cholestérol libre dans les tissus périphériques.
- permettre l'estérification du cholestérol libre par la LCAT afin de libérer les sites périphériques de la lipoprotéine. Après estérification, le cholestérol ester devenu hydrophobe, forme le noyau des HDL.
- échanger ce stéride ainsi formé contre des triglycérides des LDL et des VLDL grâce à sa protéine de transfert (CETP, *cholesteryl ester transfer protein*).
- rapporter au foie le cholestérol des tissus non échangé avec les triglycérides des LDL.

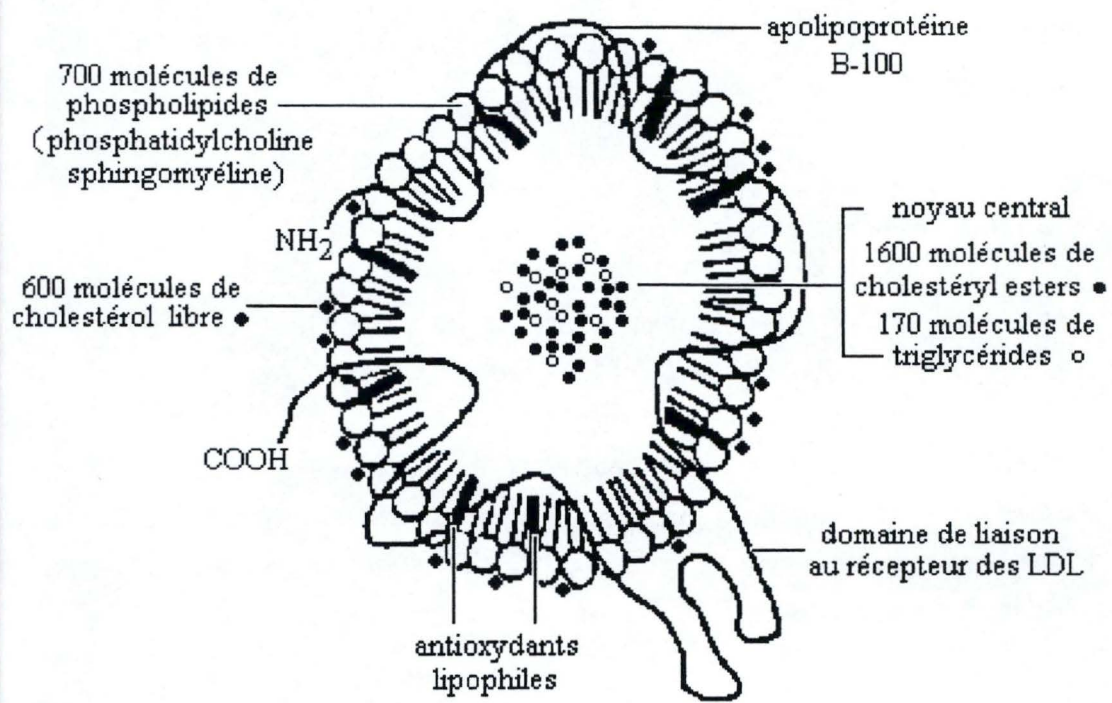


Fig. 12 Représentation schématique de la particule LDL (d'après Cox et Cohen, 1996).

3.2. Description de la particule LDL

3.2.1. Définition

Les LDL humaines représentent une population de lipoprotéines pouvant être isolées par ultracentrifugation à une densité d'environ 1,019 à 1,063 g/ml. Ce sont des particules sphériques dont le diamètre varie entre 19 et 25 nm et dont le poids moléculaire se trouve entre 1,8 et 2,8 million (Esterbauer et al., 1992). La figure 12 illustre schématiquement la particule de LDL.

3.2.2. Contenu lipidique

Chaque particule de LDL est composée d'un noyau lipidique central, qui est constitué d'environ 1600 molécules de cholestéryl esters et de 170 molécules de triglycérides. Ce noyau est entouré d'une monocouche composée d'une part d'environ 600 molécules de cholestérol libre et d'autre part, d'environ 700 molécules phospholipidiques. La plupart de ces phospholipides se trouvent sous forme de phosphatidylcholine, le reste étant constitué de sphingomyéline et de lysophosphatidylcholine (LPC). La partie polaire des phospholipides est localisée à la surface et contribue à la solubilité des LDL en phase aqueuse.

3.2.3. Contenu protéique

La monocouche lipidique périphérique contient également une et une seule énorme protéine, l'apolipoprotéine B100 qui comme une pieuvre, englobe la particule de LDL (Esterbauer et al., 1992). Des études conformationnelles de la protéine par spectroscopie en infra-rouge ont été réalisées durant les années 60 (Gotto, 1988). Les motifs structuraux responsables de l'association de l'apolipoprotéine B100 avec les lipides sont complexes. Avec ces 4536 acides aminés, l'apolipoprotéine B100 mature possède plusieurs feuilletts β ayant des surfaces hydrophobes et hydrophyles et des petites hélices α amphipathiques. Basé sur des mesures biophysiques, un modèle d'association de l'apolipoprotéine B100 avec les lipides a été proposé (Fig12) (Davis, 1991).

L'apolipoprotéine B100 est aussi glycosylée (mannose, galactose, glucosamine et acide sialique). Le contenu total en carbohydrates peut atteindre jusqu'à 8 à 10% du poids total de l'apolipoprotéine B100 (Esterbauer et al.,1992).

L'apolipoprotéine B100 est indispensable à l'assemblage et à la sécrétion des lipoprotéines riches en triacylglycérol (VLDL et LDL) ainsi qu'à la reconnaissance de ces lipoprotéines par des récepteurs membranaires des cellules, en vue de leur endocytose. Les récepteurs reconnaissent aussi l'apolipoprotéine E. On parle souvent de récepteurs B/E (Fig 13).

3.2.4. Caractéristiques biochimiques

La composition globale des LDL, c'est-à-dire le contenu en phospholipides, triglycérides, cholestérol libre, cholestérol estérifié (Fig 14) et protéines (apolipoprotéine B100), est relativement constante (Tableau 4). Signalons également que l'on peut exprimer la composition des LDL de diverses manières:

- soit par mg de LDL total
- soit par mg de protéine de LDL
- soit par mg de cholestérol total de LDL

Enfin, il est important de noter que des différences existent dans la détermination de la composition des LDL en fonction des différents laboratoires. En effet, les LDL varient d'un individu à l'autre et chaque laboratoire possède son propre donneur de LDL. Par exemple, le contenu des LDL en acides gras polyinsaturés (PUFAs) et leur distribution peut varier considérablement d'un individu à l'autre. Suivant le contenu en PUFAs et en acides gras saturés, les LDL s'oxyderont de manière plus ou moins importante. Ces variations sont dues d'une part à des différences héréditaires et d'autre part à des régimes alimentaires en graisses distincts (Esterbauer et al.,1992).

Par exemple, le contenu en acide linoléique varie de 1200 à 2400 nmol/mg de protéines de LDL selon les individus. On sait également qu'un régime alimentaire riche en acides oléiques entraîne chez le lapin l'enrichissement des LDL en acide oléique, ce qui rend les LDL plus résistants à l'oxydation (Esterbauer, 1992).

	phospholipides ^c	triglycérides	cholestérol libre	cholestéryls esters	protéine
Esterbauer et al. n = 6	21,7 ± 1,9	3,7 ± 1,0	9,4 ± 0,6	41,4 ± 1,4	23,7 ± 2,0
Ylä-Herttuala et al. n = 4	20,3 ± 2,5	6,2 ± 0,8	9,8 ± 0,9	40,0 ± 4,9	23,8 ± 3,6
Hoff et al. n = 1	30,2	11,3	10,1	48,4	20,0
Sattler et al. n = 5	22,0 ± 2,0	6,2 ± 2,6	8,8 ± 1,2	43,2 ± 4,4	19,9 ± 2,0
Lagner et al. n = 3	23,6 ± 0,8	3,0 ± 1,0	10,7 ± 0,8	39,6 ± 1,8	22,6 ± 0,8
Steinbrecher et al. n = 4 ^b	17,8 ± 2,0	5,0 ± 2,0	8,6 ± 1,1	37,1 ± 2,6	(22,0)
Barenge et al. n = 3 ^b	20,6 ± 1,1	5,6 ± 2,7	9,8 ± 2,5	45,5 ± 4,5	(22,0)
moyenne	22,3 ± 3,9	5,9 ± 2,7	9,6 ± 0,7	42,2 ± 3,8	22,0 ± 1,9

Tableau 4 Composition chimique des LDL humaines (d'après Esterbauer, 1992)

Les valeurs sont données en % de poids; ^an est le nombre de sujets étudiés.

^a Le calcul est basé sur le poids moléculaires moyen des phospholipides (778), des triglycérides (880), du cholestérol libre (383), des esters de cholestérol (648). Pour calculer la composition en mg de lipides / mg de protéines LDL, il faut multiplier les données en % de poids, comme indiqué dans le tableau, par 0,0454. Le contenu moyen en cholestérol total (cholestérol libre + cholestéryl ester) est de 34,7 %.

^b Les auteurs ont rapporté le cholestérol libre, les cholestéryls esters et le cholestérol total en mg de lipides / mg de protéines et les phospholipides en $\mu\text{mol P}$ / mg de protéines. Pour le calcul du % en poids, le contenu en protéines des LDL était supposé être 22,0 %.

^c Les phospholipides sont constitués de 62 à 66 % de phosphatidylcholine, de 24 à 28 % de sphingomyéline, de 7 à 7,4 % de LPC et de 2,3 % d'autres.

4. Origines de l'athérosclérose

Les événements cellulaires principalement impliqués dans le développement des lésions athéromateuses sont résumés à la Fig 15. Cette séquence a été observée dans les lésions humaines apparaissant spontanément et dans les lésions animales induites par une alimentation riche en cholestérol ou chez des animaux génétiquement prédisposés. Ces événements évoquent ceux observés lors d'une réponse inflammatoire, bien que le macrophage se différencie en une cellule tout à fait particulière, la cellule spumeuse. En outre, de par sa localisation au niveau de la paroi artérielle, la lésion tissulaire peut entraîner des complications, dont la rupture de la paroi artérielle, avec formation d'un thrombus.

4.1. Le processus déclencheur: les hypothèses

L'athérosclérose provient d'un dysfonctionnement à multiples facettes. Deux grandes hypothèses s'affrontent à propos du mécanisme déclencheur de l'athérosclérose: le dysfonctionnement de l'endothélium et le dépôt de lipides au niveau des artères.

4.1.1. le dysfonctionnement de l'endothélium

La première hypothèse fut proposée par Ross qui, sur base de suppositions faites par Virchow en 1856, formula une première idée suivant laquelle l'athérosclérose débute par une série d'événements initiés par une blessure endothéliale, ce qui aboutirait localement à un dysfonctionnement de l'endothélium (Ross, 1986). Néanmoins, cette hypothèse de "réponse à une blessure endothéliale" suivant laquelle une desquamation endothéliale précède le développement de la lésion a été aujourd'hui modulée et affinée en une "réponse face à un dysfonctionnement endothélial": l'endothélium recouvrant la lésion peut être morphologiquement intact, mais fonctionnellement altéré (Wayne Alexander, 1995).

En effet, comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.1., l'endothélium vasculaire forme une interface biologique entre le sang circulant et tous les autres tissus et organes. De ce fait, par sa situation stratégique, il régule localement la circulation sanguine afin de conserver une certaine homéostasie du système. Cependant, lorsque l'endothélium n'arrive pas à s'adapter à certains changements provoqués par différents stimuli pathologiques, des altérations fonctionnelles peuvent avoir lieu entre des cellules ou des

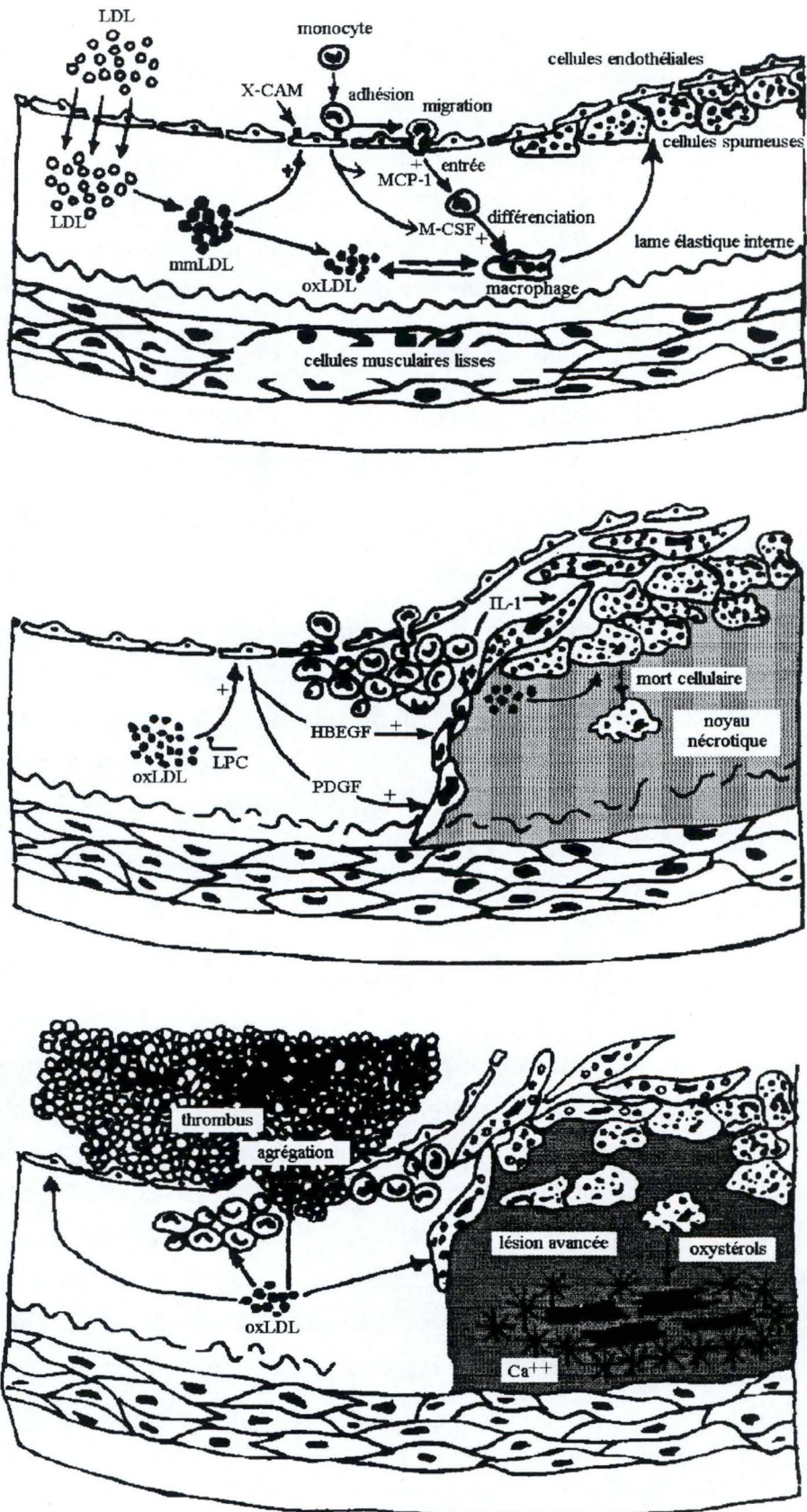


Fig. 15 Séquence des évènements se déroulant durant l'athérogenèse et rôle des LDL oxydés dans ce processus (d'après Berliner et Heinecke, 1996).

composants macromoléculaires de la circulation sanguine et le mur artériel. Ces altérations incluent un défaut dans la perméabilité aux lipoprotéines plasmatiques, une augmentation dans la production de cytokines et de facteurs de croissance, un déséquilibre entre les activités coagulantes et fibrinolytiques et une adhésion prononcée des leucocytes à l'endothélium suite à la dérégulation de l'expression des protéines membranaires d'adhésion.

Ces manifestations rassemblées sous le nom de dysfonctionnement endothélial, jouent un rôle important dans l'initiation, la progression et les complications cliniques de la maladie (Gimbrone et al.,1993).

4.1.2. Le dépôt lipidique

D'autres chercheurs se penchent plutôt du côté de la deuxième hypothèse selon laquelle un dépôt de lipides dans la partie subendothéliale de l'intima suite à leur accumulation dans le plasma déclencherait l'athérogénèse. En effet, l'endothélium artériel est une barrière imparfaite au transport des lipoprotéines. Ces dernières peuvent alors entrer à un débit régulier dans l'intima via des vésicules de transport des cellules endothéliales (Simionescu et al.,1983).

Lorsque la concentration plasmatique en LDL augmente, un plus grand nombre de LDL traversent l'endothélium et s'accumulent dans l'intima où ils sont piégés par la matrice extracellulaire de la subendothéliale (Navab et al., 1996). Cette association des LDL avec la matrice extracellulaire explique d'ailleurs que la concentration en apolipoprotéine B puisse être nettement plus élevée dans la paroi artérielle que dans le plasma. Partiellement oxydées, probablement au niveau de leur partie lipidique, elles induisent le recrutement des monocytes circulants et leur différenciation en macrophages dans la subendothéliale. Fortement oxydées, elles contribuent à la formation de cellules spumeuses à partir de macrophages.

Cette deuxième hypothèse n'exclut pas que des changements à la surface du mur artériel ne puissent accélérer l'entrée des LDL dans l'intima. Nous pouvons donc conclure que les deux hypothèses ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Le dysfonctionnement de l'endothélium et le dépôt de lipides sont tous les deux impliqués dans le déclenchement de la maladie. Les deux phénomènes se renforcent l'un et l'autre et accélèrent ainsi le processus pathologique lié à l'athérogénèse (Fig 16). On sait également depuis longtemps qu'il existe des facteurs de risques favorisant l'athérogénèse.

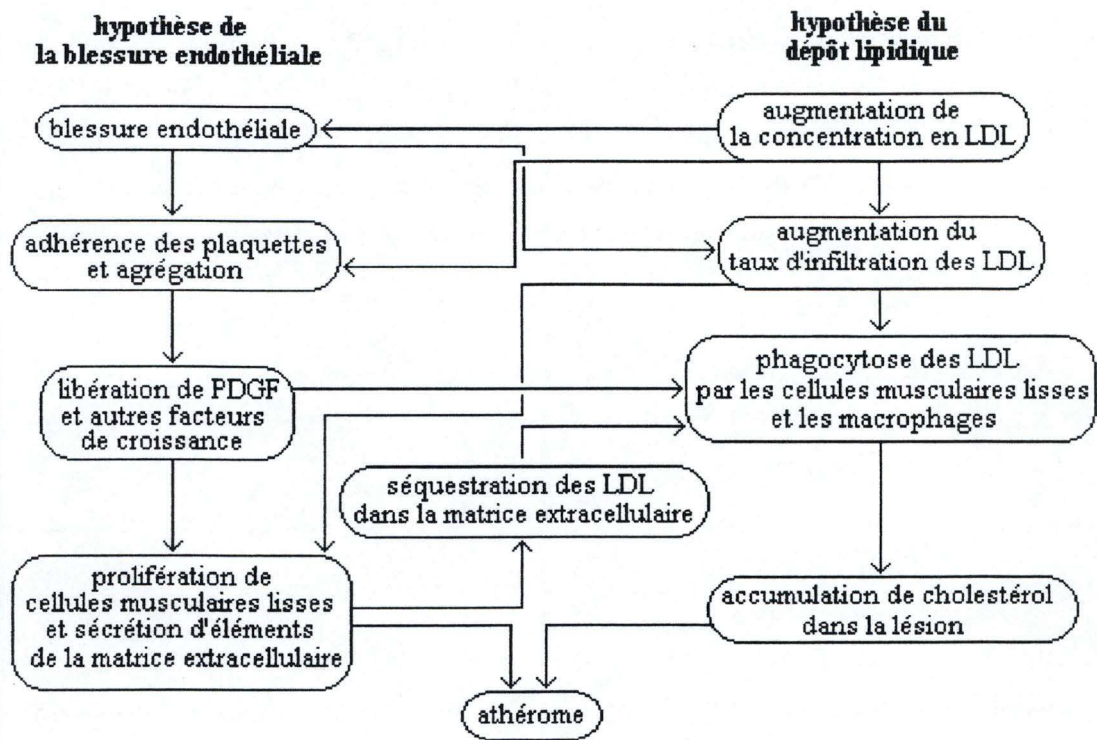


Fig. 16 Interactions entre la blessure endothéliale et le dépôt lipidique dans l'athérosclérose (d'après Havel, 1991).

4.2.Facteurs de risques

L'athérosclérose apparaît comme une maladie de civilisation. La mortalité par athérosclérose varie beaucoup suivant les pays. Elle est, par exemple, onze fois plus importante aux Etats-Unis qu'au Japon et elle touche presque exclusivement les pays riches et industrialisés. Un grand nombre de facteurs peuvent accélérer ou déclencher le développement de cette maladie.

Chez les individus dont le métabolisme lipidique n'est pas altéré, les risques majeurs de mortalité liée à l'infarctus du myocarde, aboutissement catastrophique de l'athérosclérose, se situent chez les hommes à partir de l'âge de 70 ans et chez les femmes au-delà de 80 ans.

Nous voyons donc que le sexe joue aussi son rôle. Les risques sont trois à quatre fois plus élevés chez les hommes que chez les femmes. En effet, les HDL responsables, rappelons-le, du transport inverse du cholestérol, ont un taux qui reste constant chez les deux sexes jusqu'à la puberté. Ensuite, une diminution rapide des HDL liée à l'augmentation d'androgènes, est observée chez les hommes. Ce taux de HDL ne diminue qu'après la ménopause chez les femmes. Le taux de mortalité due à des maladies coronariennes chez les femmes âgées de 65 à 74 ans est comparable à celui des hommes âgés de 55 à 64 ans (Hazzard,1989).

L'hypertension peut induire un dysfonctionnement de l'endothélium qui va augmenter sa perméabilité aux macromolécules (Hazzard,1989) et ses propriétés d'adhérence vis-à-vis des cellules sanguines (O'Brien and Chait, 1994). 30 à 70% des hypertendus souffrent d'athérosclérose.

Le diabète est également un facteur de risque. De hautes concentrations en insuline stimule la prolifération des cellules musculaires lisses et la production de la matrice extracellulaire (O'Brien and Chait, 1994). Le glucose favorise aussi l'oxydation des LDL par les ions métalliques (Berliner and Heinecke, 1996).

L'environnement, le mode de vie des individus et en particulier les habitudes alimentaires, jouent aussi une grande influence. Les régimes alimentaires riches en acides gras polyinsaturés (huile de soja) sont plus favorables au développement de la maladie que des régimes comprenant des acides gras monoinsaturés (huile d'olive), ces derniers étant plus résistants à l'oxydation (Mabile et al.,1995). Le café, par son effet

molécules	défauts	manifestations cliniques
apolipoprotéines défectueuses		
ApoA _I _{Milano}	changement acide aminé (Arg ₁₇₃ → Cys)	HDL réduit
ApoAI + déficience ApoCII famille 1	réarrangement des gènes ApoAI et ApoCIII	absence virtuelle de HDL athérosclérose sévère
ApoAI + déficience ApoCII famille 2	inconnu	absence virtuelle de HDL athérosclérose sévère
ApoB-100 et absence ApoB-48	inconnu	ataxie défauts de vision anémie hémolytique
absence ApoB-100	inconnu	ataxie légère défaut d'absorption
déficience ApoCII	défauts structurels en ApoCII	type I hyperlipidémie hypertriglycéridémie sévère
variants ApoE ₃	ApoE ₂ (Arg ₁₅₈ → Cys) ApoE ₂ (Arg ₁₄₅ → Cys) ApoE ₂ (Lys ₁₄₆ → Cys)	type III hyperlipidémie cholestérol et triglycérides plasmiqes élevés affections cardiovasculaires précoces
enzymes défectueuses		
déficience apolipoprotéine lipase	inconnu	type I hyperlipidémie hypertriglycéridémie
déficience en lipase hépatique	inconnu	type IV hyperlipidémie légère hausse de IDL et HDL
lécithine: déficience en cholestérol acyltransférase	inconnu	opacité de la cornée légère hypertriglycéridémie taux de HDL réduits
récepteur défectueux		
récepteur LDL	récepteur absent ou défectueux	type II hyperlipidémie sévere hausse de LDL athérosclérose précoce

Tableau 5 Défauts moléculaires chez les patients atteints de dyslipoprotéinémie (d'après Rubin, 1994).

anti-fibrinolytique peut aussi augmenter les risques de développement de l'athérosclérose.

La nicotine accélère le pouls et augmente la tension artérielle. La fumée de cigarette peut aussi altérer l'intégrité de la barrière endothéliale ce qui augmente sa perméabilité (Hazzard, 1989). Elle accentue également l'adhésion des plaquettes et élève le niveau de concentration des LDL suite à une diminution de la concentration en HDL (O'Brien and Chait, 1994).

Divers autres facteurs environnementaux comme la sédentarité, le stress, le type de profession, le climat peuvent encore accentuer l'incidence de la maladie.

4.3. Désordres héréditaires du métabolisme lipidique et athérosclérose

On sait depuis longtemps qu'il existe dans certaines familles une prédisposition aux ischémies cardiaques. On a pu établir pour certaines d'entre elles, une base génétique. (Tableau 5)

Nous n'entrerons pas dans les détails de ces dyslipoprotéïnémies. Cependant, on peut résumer les anomalies génétiques les plus importantes comme suit:

- les anomalies de l'apolipoprotéine E entraîne une accumulation de chylomicrons et de VLDL dans le plasma, ce qui provoque une hyperlipidémie et des maladies cardiovasculaires précoces.
- les anomalies du récepteur aux LDL au niveau des hépatocytes entraîne une accumulation plasmatique de ces LDL dans le plasma. Cette maladie est appelée l'hypercholestérolémie familiale.
- les anomalies de l'apolipoprotéine A_I entraîne une réduction des HDL, ce qui aboutit également à une athérosclérose sévère, vu que les HDL sont anti-athérogéniques.

4.4. Athérogénèse et LDL oxydées

Lorsque le taux de LDL s'élève dans le plasma et atteint des concentrations de 160 à 180 mg/dl (Witztum and Steinberg, 1991) ou lorsque l'endothélium altéré devient

plus perméable, les LDL le traversent plus facilement et s'accumulent en plus grand nombre dans l'intima. Se trouvant alors dans un milieu plus oxydant ou dans des microdomaines dépourvus d'antioxydants, les LDL s'oxydent et jouent alors un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose.

4.4.1. Séquestration des LDL dans l'intima

Lorsque les LDL traversent la couche endothéliale d'une artère élastique, elles se retrouvent dans la couche sous-endothéliale dépourvue de capillaires et de vaisseaux lymphatiques. En outre, à l'interface entre l'intima et la média, la lame élastique interne constituant une barrière imperméable aux particules de LDL.

De plus, ces LDL se retrouvent séquestrés dans la matrice extracellulaire (Scheider, 1991). En effet, ils peuvent interagir avec les charges négatives des glycoaminoglycanes et se retrouver ainsi dans des microdomaines à l'abri des antioxydants. *In vitro*, des expériences ont montré que les LDL pouvaient se lier aux chondroïtines sulfate et aux protéoglycanes de la paroi artérielle humaine. Ces liaisons réduisent leur stabilité et exposent les segments riches en lysine et en arginine de l'apolipoprotéine B (Esterbauer et al., 1992). Nous verrons que ce détail a son importance dans les processus d'oxydation des LDL, dans les paragraphes qui suivent.

4.4.2. Oxydation des LDL in vivo

Dans l'intima, les LDL séquestrées au niveau de la subendothéliale ne sont plus protégées par des antioxydants plasmatiques. Elles subissent alors un processus d'oxydation. Il y aurait d'abord des LDL moyennement oxydées (*minimally* ou *mildly modified LDL* ou mmLDL) et pour finir des LDL fortement oxydées (*highly oxidized LDL* ou oxLDL). Les mmLDL ne seraient affectées qu'au niveau de la fraction lipidique et sont donc toujours reconnues par le récepteur des LDL natives. Les oxLDL sont modifiées au niveau de l'apolipoprotéine et leurs lipides ont subi un processus de décomposition plus avancé. Elles ne sont plus reconnues par le récepteur aux LDL natives mais par d'autres récepteurs, dits *scavenger* ou éboueurs, dont nous parlerons dans le paragraphe 4.5.2.A.

Si ce scénario est généralement accepté à l'heure actuelle, il n'en demeure pas moins vrai que les mécanismes moléculaires d'oxydation impliqués restent controversés. On suspecte une production continue des dérivés actifs de l'oxygène dans la paroi artérielle, suite à l'activité d'une série d'enzymes (cyclooxygénases, lipoxygénases, NO

synthase, cyt P450,...) présentes dans les cellules endothéliales, mais aussi dans les autres cellules associées à l'intima. La respiration mitochondriale pourrait également contribuer à cette production continue de dérivés actifs de l'oxygène.

Enfin, la particule de LDL est un assemblage très complexe, hétérogène, de composition variable d'un individu à l'autre et est fonction de l'alimentation et du vécu de chacun. Un des défis majeurs de la recherche sur l'athérogénèse est donc d'identifier les molécules actives, apparues dans les LDL dites oxydées et qui sont responsables d'effets biologiques.

Nous constatons donc qu'*in vivo*, les mécanismes moléculaires d'oxydation des LDL restent largement méconnus. Par contre, il est également possible d'oxyder artificiellement les LDL. Ces LDL oxydées seraient beaucoup mieux caractérisées.

4.4.3.Mécanisme d'oxydation des LDL in vitro

In vitro, les LDL peuvent s'oxyder par différents moyens. L'oxydation peut par exemple être induite en incubant les LDL avec certaines cellules comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et même les fibroblastes. Elle peut être également déclenchée par l'incubation des LDL avec des ions superoxydes, des thiols, des myéloperoxydases (Chait and Heinecke, 1994) et avec du glucose (Berliner and Heinecke, 1996).

La méthode la plus classique d'oxydation des LDL consiste à les incuber pendant huit heures avec des ions Cu^{++} (50 à 100 μM). Les ions Cu^{++} catalysent la peroxydation lipidique au niveau des LDL. Les détails des mécanismes d'oxydation ne sont pas encore clairement établis. L'oxydation directe des lipides par le cuivre libre ou complexé n'a pas encore été démontrée. Néanmoins, certains auteurs ont proposé une peroxydation analogue aux réactions menant à la réduction d' H_2O_2 . Cette hypothèse n'est valable que si les ions métalliques se trouvent sous forme réduite. Il apparaît dès lors que la peroxydation des lipides avec le cuivre n'est effective qu'en présence d'agents capables de convertir le cuivre sous sa forme réduite.

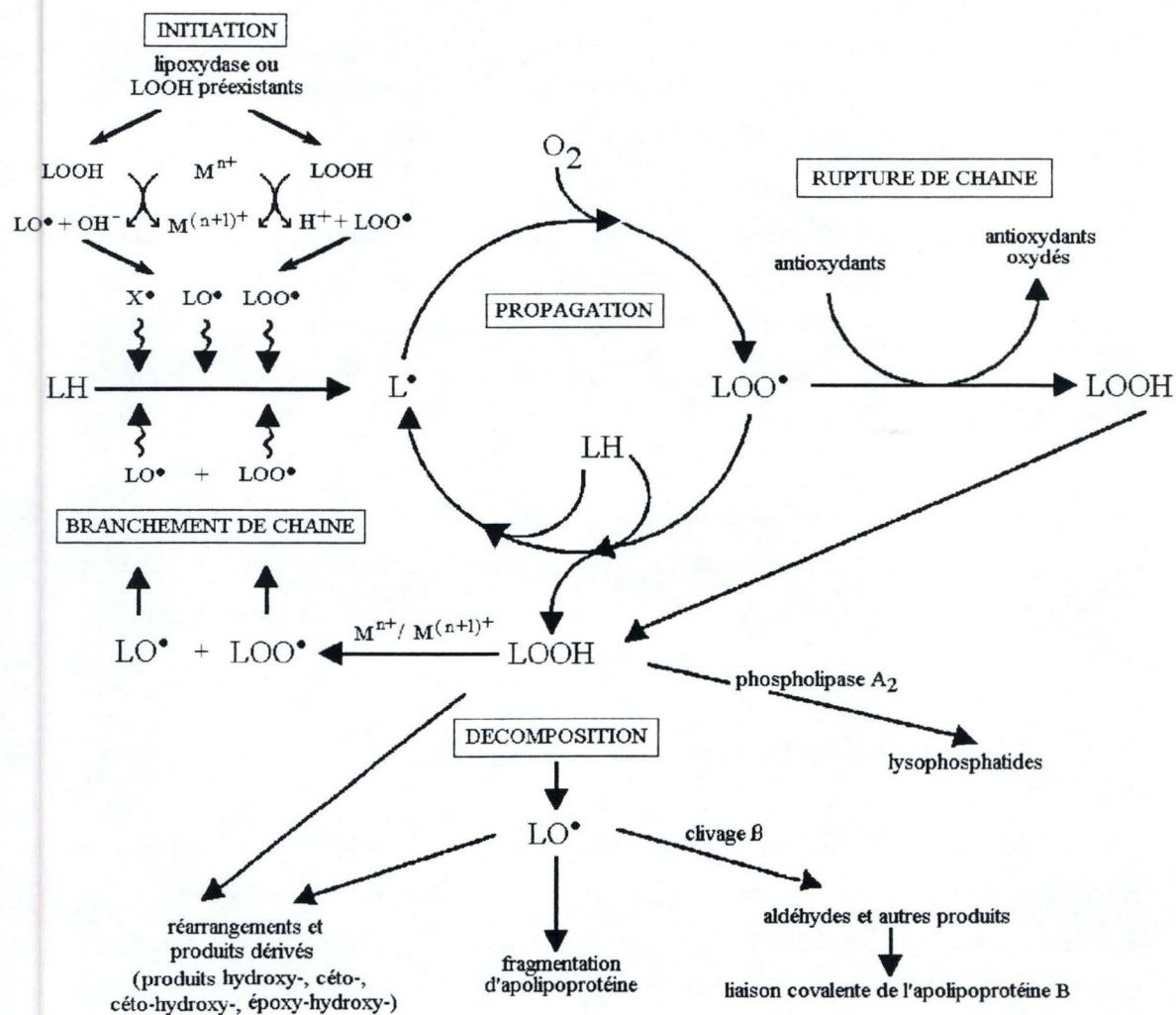


Fig. 17 Evènements majeurs survenant lors de l'oxydation des LDL (d'après Esterbauer, 1992).

LH^\bullet = lipide contenant un PUFA
(par exemple cholestéryl linoléate).

X = radical réactif capable d'extraire un atome d'hydrogène de LH.

L^\bullet = radical lipidique centré sur le carbone,
(par exemple - CH = CH - CH = CH - \bullet CH-)

LO^\bullet et LOO^\bullet = radicaux peroxy lipidiques.

LOOH = hydroperoxydes lipidiques

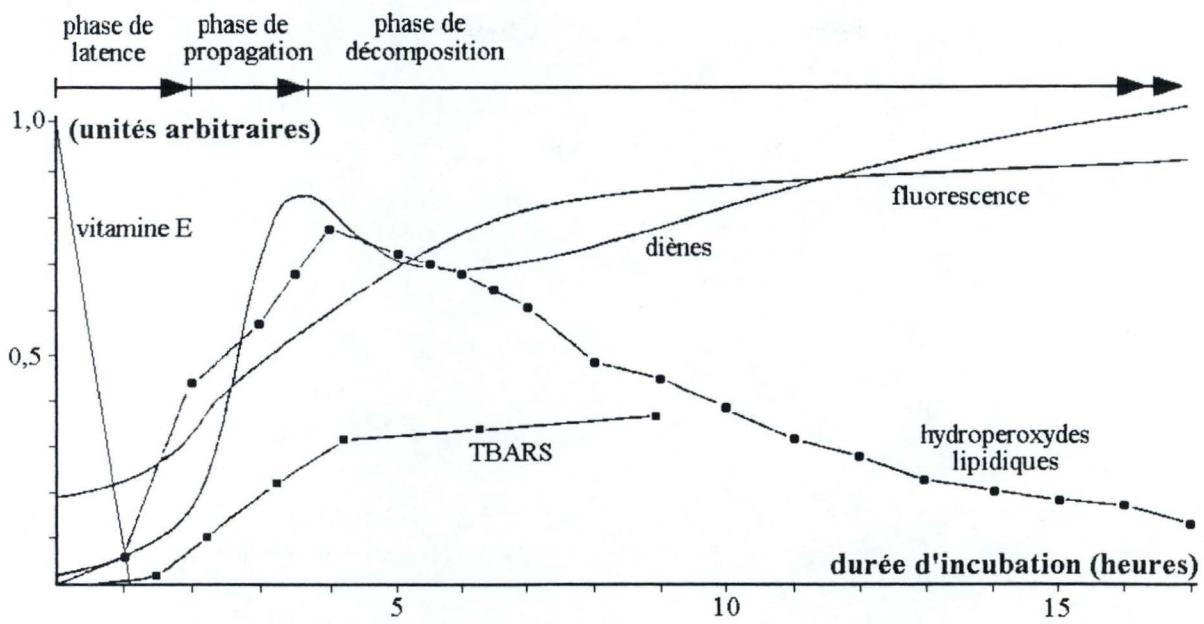
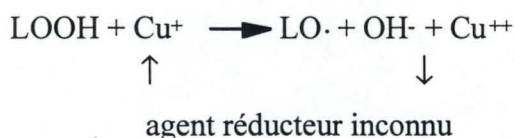


Fig. 18 Cinétique de l'oxydation des LDL par l'ion cuivrique, mesurée par la perte en vitamine E, en hydroperoxydes lipidiques, en diènes conjugués et en TBARS (d'après Esterbauer, 1992).

En tenant compte de la présence d'hydroperoxydes lipidiques préformés (LOOH) et d'un agent réducteur, l'étape principale de l'oxydation des LDL par le cuivre peut être formulée comme suit:



Le radical LO· va pouvoir initier la peroxydation lipidique par la suite. Cette réaction n'est cependant pas favorable thermodynamiquement.

L'étude du mécanisme d'oxydation induite par les cellules en présence de cuivre mais aussi de fer présente certaines difficultés car le système est complexe. Les cellules peuvent produire une série de réactifs d'oxydo-réduction pouvant réagir soit directement avec les LDL soit, ce qui est plus probable, en réduisant certains métaux présents, facilitant ainsi la peroxydation lipidique en chaîne, suivie de la décomposition lipidique. Certaines études montrent que, par exemple, l'activité de la 15-lipoxygénase peut contribuer à la formation des peroxydes.

Il est clair cependant que l'oxydation des LDL est accélérée de manière significative par les ions métalliques et que le processus peut être inhibé par des agents chélateurs comme l'EDTA, en présence ou en absence de cellules (Esterbauer et al., 1992).

La cinétique de l'oxydation des LDL par le cuivre est actuellement bien décrite. Elle peut être divisée en trois phases consécutives (Figs 17 et 18): la phase de latence, la phase de propagation et la phase de décomposition. Il est important de noter que les LDL de chaque sujet possèdent leurs caractéristiques cinétiques propres et donc que des variations peuvent se présenter d'un échantillon à l'autre.

Durant la phase de latence, les LDL perdent progressivement leurs antioxydants, la vitamine E disparaît en premier et le β-carotène en dernier. Une peroxydation lipidique minimale est observée (Esterbauer et al., 1992) (Fig 18).

Lorsque les LDL sont enfin dépourvus d'antioxydants, ils sont "à la merci de l'oxygène" et la phase de propagation est lancée: une série de réactions autocatalytiques de peroxydation lipidique a lieu. Le taux de peroxydation s'élève exponentiellement pour atteindre un maximum où trois molécules d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH) sont obtenues à partir d'une particule de LDL par minute. Cette phase de propagation est

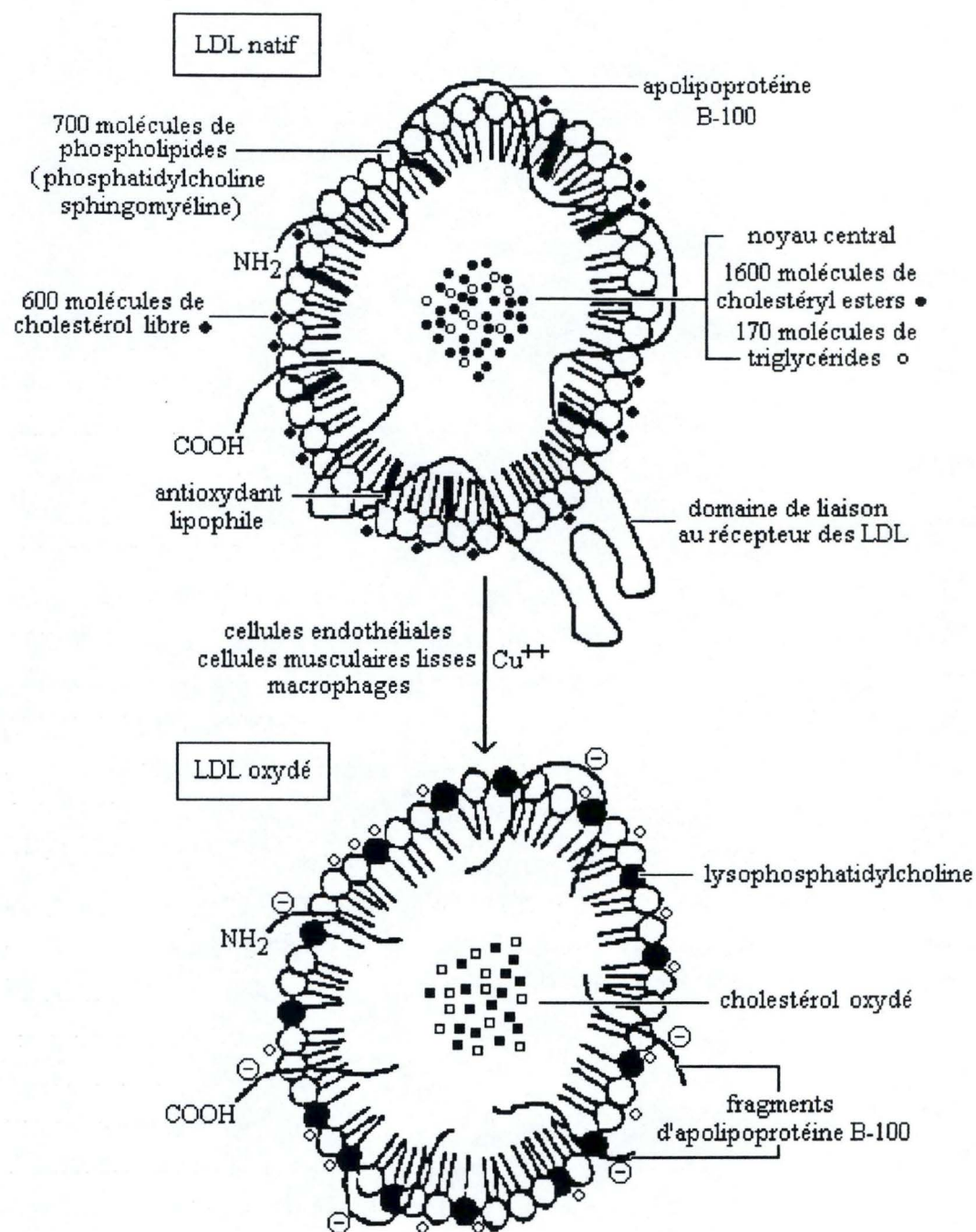


Fig. 19 Conversion d'une LDL native en une LDL fortement oxydée (d'après Cox et Cohen, 1996).

	LDL natives		LDL oxydées
	nmol/mg protéine LDL moyenne	mol/mol moyenne	
phospholipides totaux	1300 ± 227	700	pas de changement significatif de phospholipides diminution à 65-55 % augmentation à 250-300 % pas de changement significatif
phosphatidylcholine	818	450	
lysophosphatidylcholine	145	80	
sphingomyéline	336	185	
trigycérides	304 ± 140	170	diminution à 76-52 %
cholestérol libre	1130 ± 82	600	diminution à 90 % ou augmentation à 150 % selon les auteurs
cholestéryl esters	2960 ± 220	1600	diminution à 48 %
cholestérol total	4090	2200	diminution à 78-60 %
acides gras libres	48	26	augmentation à 70 %
oxystérols	0	0	augmentation à 33 µg/mg ou 120-140 µg/mg de protéines selon les auteurs
oxodiènes	non détectable		sévère augmentation
diènes conjugués	non détectable		sévère augmentation à 190-350 mol/mol de LDL
LOOH iodométrique	18,6 ± 9,4	10	évère augmentation à 190-550 mol/mol de LDL
LOOH définis	non détectable		augmentation
hydroxy et hydroperoxy 18:2	non détectable		sévère augmentation à 30-200 mol/mol de LDL
hydroxy et hydroperoxy 20:4	non détectable		augmentation 20 mol/mol de LDL
substances pseudo-prostanoïdes	non détectable		matériel réagissant avec des anticorps contre les PGE ₂

Tableau 6 Composition lipidique des LDL natives et oxydées (d'après Esterbauer, 1992)
Sans autre indication, les valeurs pour les LDL natives sont fournies dans la
table 1 de l'article Esterbauer, 1992. Les valeurs pour les LDL oxydées
proviennent d'autres sources citées dans ce même article.

catalysée par les ions cuivre de la manière suivante: les ions Cu^{++} catalysent la décomposition des quelques molécules d'hydroperoxyde généré pendant la phase de latence en radicaux lipidiques ($\text{LO}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$). Ceux-ci à leur tour initient de nouvelles séries de réactions radicalaires comme indiqué dans la figure 17. La structure exacte des radicaux lipidiques à ce stade n'est pas connue; de plus, les hydroperoxydes générés dans la particule de LDL pendant la phase de propagation sont des molécules intermédiaires labiles. C'est lors du début de cette phase que les LDL sont dites moyennement oxydées.

La diminution des hydroperoxydes et celle transitoire des diènes conjugués (Fig 18) signent la transition de la phase de propagation à la phase de décomposition, car ils indiquent clairement la décomposition des hydroperoxydes lipidiques en radicaux $\text{LO}\cdot$ qui affectent directement ou indirectement la partie protéinique et la partie lipidique.

Ainsi, ces radicaux $\text{LO}\cdot$ déclenchent la fragmentation de l'apolipoprotéine B et la décomposition des LOOH en aldéhydes (Jürgens et al., 1987). Ces aldéhydes sont l'équivalent de messagers secondaires toxiques, altérant à leur tour l'apolipoprotéine B. Ils sont lipophiles et restent donc associés à la particule LDL, excepté le malondialdéhyde (MDA) qui, hydrophile, est libéré dans la phase aqueuse.

Ces aldéhydes se lient de manière covalente aux résidus NH_2 des lysines de l'apolipoprotéine B. Cette liaison engendre la perte des charges positives correspondantes suite à la formation de bases de Schiff ($\text{R-CHO} + \text{protéine-NH}_3^+ \rightarrow \text{R-CH=N-protéines} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$) et un changement dans sa conformation (Esterbauer et al., 1992; Zhang et al, 1993)(Fig 19). Ce changement ne leur permet plus d'être reconnus par le récepteur aux LDL mais par un autre récepteur, le récepteur éboueur ou *scavenger* (Jialal and Devaraj, 1996). La phase de décomposition altère également profondément la fraction lipidique des LDL comme l'indique le tableau 6. Ces LDL sont dites fortement oxydées (oxLDL). Elles acquièrent des propriétés nouvelles qui jouent un rôle essentiel dans l'athérosclérose.

Les LDL oxydées ne sont donc pas une entité simple et homogène mais bien des particules contenant des produits hétérogènes tels que des acides gras oxydés et leurs débris, des stérols oxydés, des phospholipides oxydés. En termes pratiques, cela signifie que les produits formés lors d'une oxydation de LDL *in vitro* peuvent varier fortement d'une préparation à l'autre. Ces différences peuvent dépendre du type de cellules utilisé pour l'initiation de l'oxydation, du système d'oxydation choisi, de la composition du milieu, des conditions expérimentales et de l'origine des LDL natives. Les LDL oxydées seront bien souvent différentes d'un laboratoire à l'autre ce qui engendre bien souvent

Facteurs intrinsèques aux LDL
<ol style="list-style-type: none"> 1. Composition en acides gras (particulièrement acides gras polyinsaturés) 2. Contenu en antioxydants endogènes (β-carotène, vitamine E, ubiquinol-10) 3. Contenu en antioxydants exogènes (probucol) 4. Activité de la phospholipase A₂ 5. Dimensions des particules 6. Propriétés inhérentes à l'apolipoprotéine B-100 7. Localisation des acides gras (à la surface des phospholipides ou dans le noyau de triglycérides ou de cholestéryls esters)
Facteurs extrinsèques aux LDL
<ol style="list-style-type: none"> 1. Variations potentielles dans l'activité de pro-oxydants cellulaires (variation génétique dans l'expression de l'activité de la 15-lipoxygénase ou sécrétion cellulaire de l'anion superoxyde) 2. Concentrations des composants pro-oxydants du plasma et des liquides extracellulaires (traces d'ions métalliques) 3. Concentrations des composants antioxydants du plasma et des liquides extracellulaires (ascorbate, urate) 4. Concentrations d'autres facteurs influençant l'oxydation des LDL (par exemple HDL) 5. Facteurs influençant la durée de temps de séquestration des LDL dans l'intima (facteurs qui augmentent la liaison comme la Lp[a])

Tableau 7 Facteurs pouvant affecter l'oxydation des LDL in vivo (d'après Witztum et Steinberg, 1991)

des conflits lors de la comparaison des résultats (Witztum, 1993; Witztum and Steinberg, 1991).

4.4.4. Arguments en faveur de la présence de LDL oxydées *in vivo*

Premièrement, les LDL extraites de lésions athérosclérotiques ont montré des propriétés chimiques et biologiques comparables à celles attribuées aux LDL oxydées *in vitro*. Ainsi, Piotrowski et ses collaborateurs ont trouvé en 1990 que des extraits lipidiques issus de tissu aortique athérosclérotique humain contiennent des fluochromes qui ont une absorbance maximale à 435 nm, longueur d'onde indicative de la présence de produits issus de peroxydation lipidique.

Kanazawa et ses collaborateurs (1987) ont séparé les lipides des lésions par chromatographie sur couche mince et ont trouvé un spot inconnu qui serait probablement celui des formes oxydées des cholestéryl esters, non présentes dans les LDL natives.

Ledwozym et ses collaborateurs (1986) ont déterminé pour la première fois les TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) des extraits de paroi artérielle humaine de patients souffrant d'athérosclérose. Ces TBARS réagissent avec l'acide thiobarbiturique et la quantité de produits formés peuvent être estimés par lecture au spectrophotomètre. Ils ont trouvé que ces lésions contiennent deux fois plus de TBARS que pour des extraits venant de sujets normaux.

Deuxièmement, il est possible d'obtenir des anticorps poly- et monoclonaux contre les LDL modifiées *in vitro*, qu'elles soient acétylées ou oxydées par diverses méthodes (malondialdéhyde ou MDA, hydroxynonéal ou HNE, myéloperoxydase,). Ces anticorps reconnaissent *in vivo* des sites antigéniques présents dans les lésions athérosclérotiques, certes avancées. Ce marquage est absent dans les tissus sains (Esterbauer, 1992).

Troisièmement, il existe spontanément chez les patients des auto-anticorps capables de reconnaître des LDL oxydées artificiellement par différentes méthodes (MDA, HNE,...). On a constaté qu'il existe une corrélation entre la quantité de ces auto-anticorps et la progression de l'athérosclérose au niveau de la carotide.

Enfin, le tableau 7 nous montre qu'il existe néanmoins une grande variété de facteurs pouvant influencer l'oxydation des LDL *in vivo*, qu'ils soient intrinsèques ou

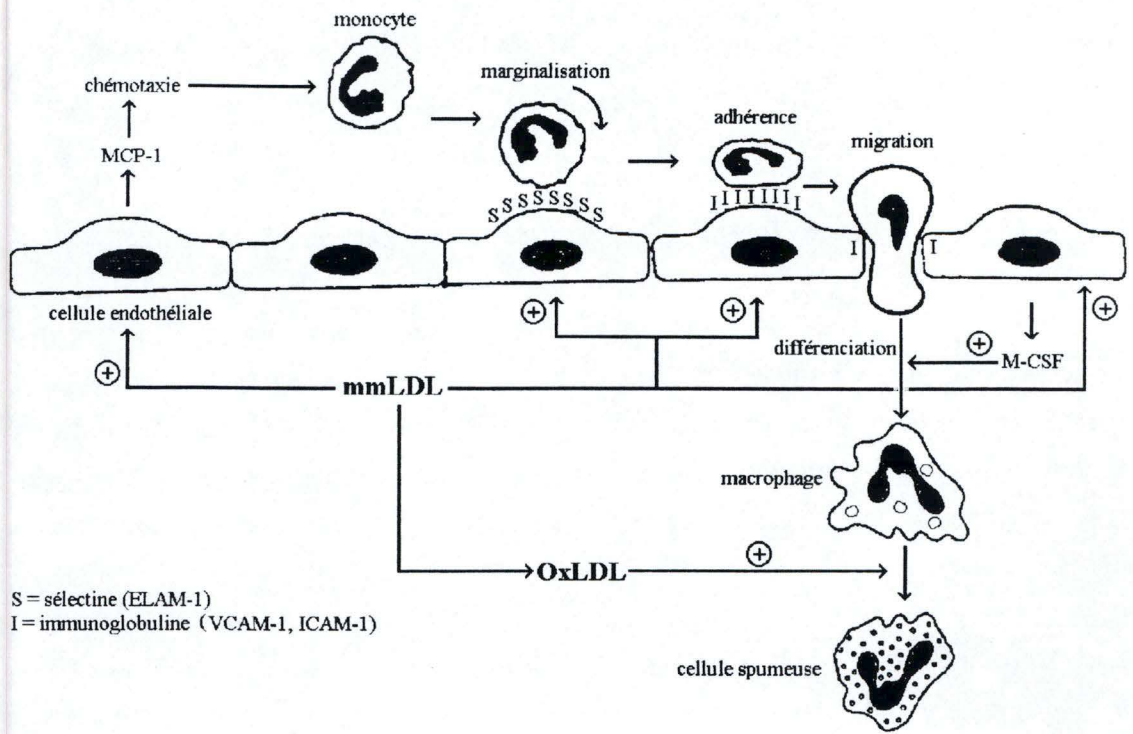


Fig. 20 Effets biologiques des LDL oxydées sur les monocytes et les macrophages (d'après O'Brien et Chait, 1994).

extrinsèques aux LDL, ce qui explique que les LDL sont beaucoup plus difficiles à définir *in vivo*.

4.5. Effets biologiques des LDL oxydées sur les monocytes et les macrophages

Non seulement les LDL oxydées sont biochimiquement très différentes des LDL natives, mais on leur attribue de plus en plus d'effets biologiques. Ainsi, les LDL oxydées influencent le métabolisme des monocytes/macrophages à deux stades différents (Fig 20):

- Faiblement oxydées, elles s'avèrent chémotactiques pour les monocytes, qui s'accumulent dans l'intima et elles induisent ensuite la différenciation de ces monocytes en macrophages.
- Fortement oxydées, elles sont internalisées massivement par les macrophages qui, bourrés de lipides, deviennent les cellules spumeuses.

Nous allons aborder ces deux points plus en détail.

4.5.1. Recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages

4.5.1.A. Effets des LDL oxydées sur les monocytes

Des études *in vitro* et *in vivo* indiquent que les LDL oxydées peuvent favoriser le recrutement des monocytes. Ce rôle chémotactique est essentiel pour la suite des événements et implique trois étapes: le "rolling", l'activation des leucocytes et leur adhésion aux molécules responsables de leur migration à travers l'endothélium (Berliner and Heinecke, 1996).

CHEMOTACTISME

En 1985, Gerrity et ses collaborateurs expliquent que l'hypercholestérolémie favorise l'adhésion des monocytes, mais le rôle spécifique des LDL reste obscur.

En 1987, Quinn et ses collaborateurs ont montré sur base d'expériences *in vitro* que les LDL modifiées de manière oxydative, et non les LDL natives, sont des facteurs chémotactiques puissants pour les monocytes.

<i>IN VIVO</i>			
Fonction de la protéine surexprimée	Protéine sur-exprimée	Pathologie	Référence
chémotactisme pour les monocytes	MCP-1	athérosclérose chez l'homme	Yla-Herttuala, 1991
molécules d'adhérence cellules endothéliales/ leucocytes	ICAM-1	athérosclérose chez l'homme	Printseva et al., 1992
	ICAM-1	athérosclérose chez l'homme	Poston et al., 1992
	VCAM-1	modèle d'athérosclérose spontanée chez le lapin hypercholestérolémique	Cybulski and Gimbrone, 1991
	VCAM-1	athérosclérose induite chez le lapin après un régime athérogénique	Li et al., 1993
	ELAM-1 ICAM-1	athérosclérose chez l'homme	van der Wal et al., 1992
facteurs de différenciation de la lignée monocyttaire	M-CSF	athérosclérose induite chez le lapin après un régime athérogénique	Rajavashisth et al., 1990
	M-CSF	athérosclérose chez l'homme	Clinton et al, 1992

Tableau 8 Etudes *in vivo* de la présence de certains facteurs chémotactiques, d'adhérence ou de différenciation dans les lésions athérosclérotiques.

IN VITRO

effets des LDL oxydées/modifiées sur l'expression de différentes protéines et sur les taux en AMPc

	type de LDL oxydée / modifiée	cellules cibles	conditions d'incubation	facteur étudié	auteurs
chémotactisme des monocytes	mmLDL	cellules endothéliales de l'aorte humaine	20 à 30 µg/ml de mmLDL durant 16 h	↑ MCP-1 (mRNA)	Cushing et al., 1990
	mmLDL	cellules musculaires lisses de l'aorte humaine	20 µg/ml de mmLDL durant 18 h	↑ MCP-1 (protéine)	Cushing et al., 1990
	mmLDL oxydées par du Fe ⁺⁺	cellules endothéliales de <ul style="list-style-type: none"> • l'aorte de lapin • aorte humaine • valve de l'aorte humaine 	125 µg/ml durant 4 h	↑ MCP-1 (mRNA)	Parhami et al., 1993
molécules d'adhérence cellules endothéliales/leucocytes	LPC	cellules endothéliales de l'aorte de lapin		↑ VCAM-1 (protéine et mRNA) ICAM-1 (protéine et mRNA)	Kume et al., 1992
	LPC	cellules endothéliales de l'artère iliaque de l'homme		↑ VCAM-1 (mRNA) ICAM-1 (mRNA)	Kume et al., 1992
	LPC	cellules endothéliales de veines ombilicales		↑ ICAM-1 (mRNA)	Kume et al., 1992
	LPC et LDL oxydées	cellules endothéliales de l'aorte de lapin		↑ VCAM-1	Kume et al., 1992
facteurs de différenciation de la lignée monocyttaire	mmLDL	cellules endothéliales de l'aorte humaine	20 µg/ml de mmLDL durant 18 h	↑ M-CSF (protéine)	Cushing et al., 1990
	mmLDL incubation brève avec du Fe ⁺⁺	cellules endothéliales de l'aorte humaine ou du lapin	20 µg/ml de mmLDL durant 4 h	↑ GM-CSF (mRNA) G-CSF (mRNA)	Rajavashisth et al., 1990
	mmLDL oxydées par du Fe ⁺⁺	cellules endothéliales de <ul style="list-style-type: none"> • l'aorte de lapin • aorte humaine • valve de l'aorte humaine 	125 µg/ml durant 4 h	↑ M-CSF (mRNA)	Parhami et al., 1993
autres facteurs exprimés	LDL oxydée (250 µg/ml) avec du Cu(OAc) ₂ (5 µmol/ml) durant 24 h	J774	25 à 100 µg/ml durant 20 à 22 h	↓ NO synthase (mRNA) (activité)	Yang, 1994
	LDLox acétate cuprique (10 µmol/l) durant 20 à 24 h	THP-1	24 h	↑ IL-8 (protéine)	Terkeltaub, 1994
	MDA-LDL	THP-1	24 h	↓ IL-8	Terkeltaub, 1994
messagers secondaires	mmLDL oxydées par du Fe ⁺⁺	cellules endothéliales de l'aorte de lapin	125 µg/ml durant 2 h	↑ cAMP	Parhami et al., 1993
	MDA-LDL	cellules endothéliales de l'aorte de lapin	125 µg/ml durant 2 h	↓ cAMP	Parhami et al., 1993
	LDL oxydées par du cuivre	cellules endothéliales de l'aorte de lapin	125 µg/ml durant 2 h	↓ cAMP	Parhami et al., 1993
	LPC	cellules endothéliales de l'aorte de lapin	100 µM durant 2 h	↓ cAMP	Parhami et al., 1993

Tableau 9 Etudes *in vitro* des effets des LDL oxydées et de la lysophosphatidylcholine (LPC) sur l'expression de diverses protéines impliquées dans le recrutement et la différenciation des monocytes et sur la quantité intracellulaire d'AMPc

Ensuite, ces études ont été approfondies et il s'est avéré que non seulement les LDL oxydées sont elles-mêmes chimiotactiques mais elles induisent aussi l'expression de facteurs jouant un rôle dans le recrutement des monocytes (MCP-1, *macrophage chemotactic protein 1*).

ADHESION

En 1990, Berliner et ces collaborateurs démontrent que les LDL faiblement oxydées stimulent les interactions cellules endothéliales-monocytes. Après leur recrutement, lorsque les monocytes arrivent au niveau de l'endothélium recouvrant la lésion athérosclérotique, ils vont interagir avec des molécules d'adhésion présentes en grand nombre au niveau de la lésion. Parmi elles, deux molécules sont détectées principalement à proximité de la lésion athéromateuse, la molécule ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et la molécule VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*). Les leucocytes vont alors s'activer et migrer à l'aide des intégrines entre deux cellules endothéliales pour aboutir dans l'intima (O'Brien and Chait, 1994).

DIFFERENCIATION

Lorsque les monocytes arrivent dans l'intima, les LDL oxydées vont jouer un rôle actif dans la différenciation de ces monocytes en macrophages. Il faut noter que paradoxalement, ces mmLDL qui étaient chimiotactiques pour les monocytes humains circulants, auront une action totalement inverse sur ces macrophages. En effet, ils vont inhiber leur mobilité (Quinn et al. 1987).

4.5.1.B. Bases moléculaires

Les différents effets des LDL oxydées sur les monocytes que nous venons de passer en revue rapidement, se traduisent au niveau moléculaire par l'induction de l'expression de divers protéines. Différents auteurs ont effectivement constaté qu'il existait plusieurs protéines dont l'expression augmentait dans les lésions athérosclérotiques par rapport à celle constatée dans les parois artérielles saines. Tandis que d'autres se sont intéressés à l'induction de leur expression par certaines cellules *in vitro* en présence de LDL oxydées ou de lipides présents dans les LDL oxydées tels que la lysophosphatidylcholine. Ces études sont résumées dans les tableaux 8 (*in vivo*) et 9 (*in vitro*) et concernent non seulement les monocytes/macrophages, mais aussi les cellules endothéliales. Ces tableaux ne donnent pas la liste exhaustive de tous les

travaux menés, mais illustrent les principaux résultats pour lesquels il existe un certain consensus, tout en soulignant la diversité des conditions expérimentales (type de LDL modifiées, concentrations des LDL, cellules cibles, temps d'incubation, ...)

On peut remarquer d'une manière générale que les mmLDL activent la transcription de gènes de molécules chimiotactiques et de différenciation et la LPC active celles de gènes de molécules d'adhésion. Les LDL oxydées ont également un effet sur des messagers secondaires comme l'AMPc et sur d'autres molécules comme la NO synthase, enzyme synthétisant l'oxyde nitrique qui est un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation des plaquettes et de l'adhésion des monocytes. La synthèse de l'interleukine 8, facteur chimiotactique pour les lymphocytes est également activée par les LDL oxydées. Enfin, on constate que dans un modèle expérimental cellulaire donné, les effets peuvent diverger, selon le type d'oxydation de LDL, comme dans le cas de l'AMPc.

4.5.2. Formation de cellules spumeuses

Les LDL entrant dans l'intima peuvent prendre trois chemins différents. Tout d'abord, elles peuvent se lier à leurs récepteurs des cellules musculaires lisses et être dégradées. Deuxièmement, elles peuvent retourner dans la circulation sanguine en retraversant l'endothélium. Enfin, comme nous l'avons déjà signalé, elles peuvent s'oxyder et jouer un rôle fondamental dans le développement de la lésion athérosclérotique. Les mmLDL peuvent en effet induire l'expression et la sécrétion par les macrophages, de molécules chimiotactiques, de facteurs de différenciation et d'autres molécules inflammatoires.

Quant aux LDL fortement oxydées (oxLDL), elles ont subi des changements conformationnels au niveau de l'apolipoprotéine B100 qui ne leur permettent plus d'être reconnues par leur récepteur (cfr 4.4.3.). Mais elles acquièrent la possibilité de se lier à un autre récepteur, le récepteur éboueur ou *scavenger* rencontré à la surface des cellules macrophagiques. L'endocytose via le récepteur *scavenger* mène à la formation de cellules spumeuses.

4.5.2.A. Les récepteurs scavenger des macrophages

En 1979, Goldstein et ses collaborateurs découvrent que des récepteurs macrophagiques peuvent endocyter *in vitro* des LDL humaines acétylées préalablement par réaction avec un anhydride acétique, pour former des acétyl-LDL. Lorsqu'ils incubent des LDL natives marquées par l'¹²⁵I en présence de macrophages, ceux-ci n'en

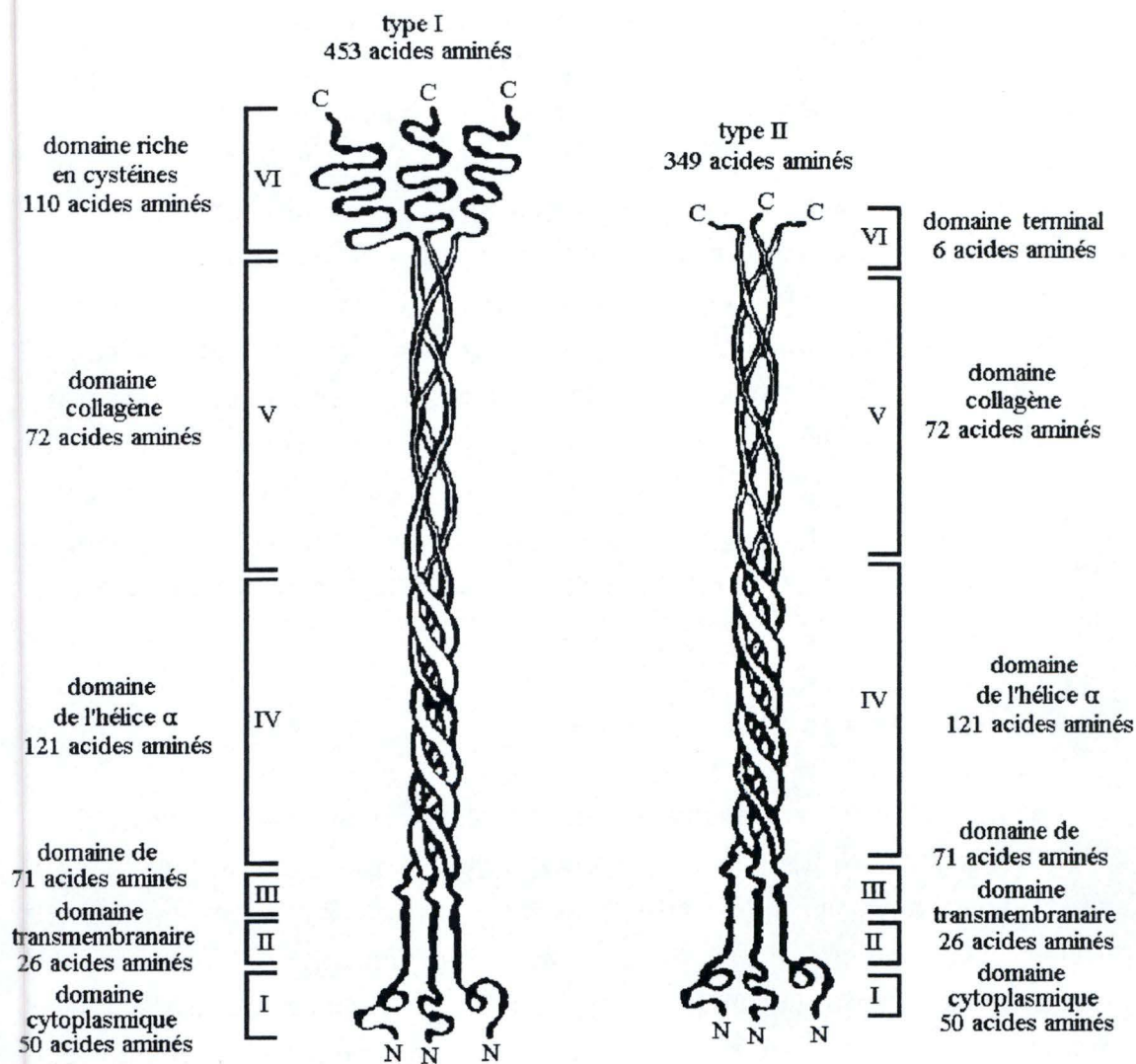


Fig. 21 Deux formes du récepteur *scavenger* et leurs domaines (d'après Freeman, 1994).

internalisent qu'une petite quantité et n'augmentent pas leur contenu cellulaire en cholestérol. Par contre, les LDL modifiées par acétylation sont prises avidement par les macrophages qui les accumulent dans leur cytoplasme.

Des études ultérieures ont montré que les LDL modifiées biochimiquement par d'autres méthodes (LDL maleylées, succinylées, glycosylées et fortement oxydées) étaient également internalisées par ce récepteur appelé dès lors récepteur scavenger. Signalons que ce récepteur scavenger lie également des ligands non lipoprotéiniques, telles que protéines modifiées, polysaccharides, polynucléotides,...La présence de charges négatives sur les ligands semble importante dans la reconnaissance par le récepteur.

Il existe deux formes de récepteur scavenger, le type I et le type II (Fig 21). Chaque type de récepteur est un trimère constitué de trois sous-unités identiques. Les deux types de sous-unités possèdent un long domaine C-terminal extracellulaire, un court domaine transmembranaire (26 acides aminés) le domaine II, et une queue cytoplasmique à l'extrémité N-terminale de 50 acides aminés (ou domaine I). Le domaine extracellulaire, composé de quatre domaines conservés, appelés domaines III à VI, le domaine VI étant un domaine riche en cystéines. Ce domaine est pratiquement inexistant chez le récepteur de type II (Geng et al.,1995).

La fonction de la queue cytoplasmique, par analogie avec d'autres récepteurs responsables de l'endocytose, contient des signaux qui, lors de la liaison du récepteur avec son ligand, engendrent leur dégradation lysosomiale.

Le récepteur scavenger ne possède pas la séquence NPVY (Asn-Pro-Val-Tyr) responsable de la reconnaissance des LDL natives avec leur récepteur. Par contre, le domaine de type collagène (Fig 21), suite à des expériences de mutagenèse dirigée, s'est révélé être le meilleur candidat pour la liaison du ligand.

L'expression du récepteur scavenger est associée à l'état de différenciation du monocyte en macrophage et est modulée par des cytokines. Les monocytes circulants expriment très peu les deux isoformes tandis que leur différenciation en macrophages est associée avec une augmentation de l'expression du récepteur scavenger et particulièrement de l'isoforme I.

Néanmoins, cette isoforme est régulée négativement lors de l'activation du macrophage par l'interféron γ . Le $\text{TNF}\alpha$ (*tumor necrosis factor* α) et les endotoxines qui activent également les macrophages, diminuent aussi l'expression du récepteur scavenger. Ainsi, il existe une relation directe entre la différenciation du macrophage et

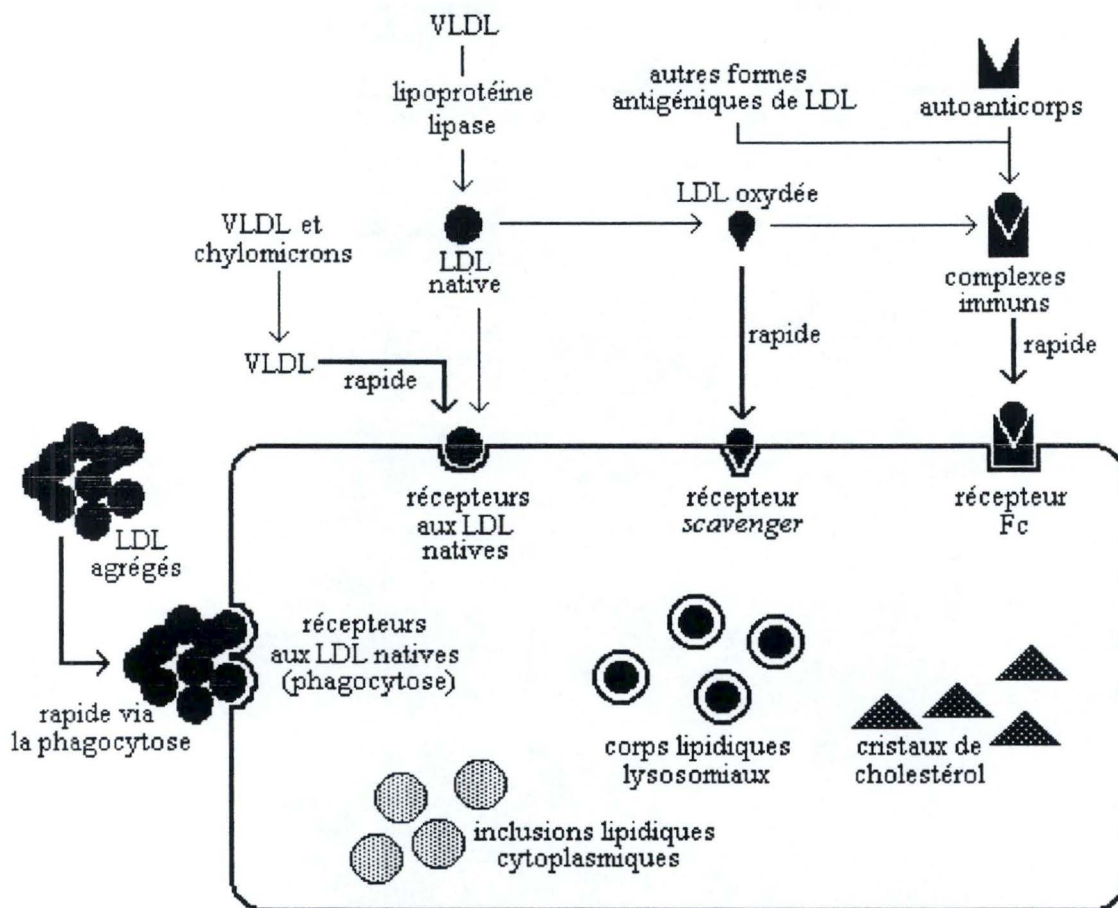


Fig. 22 Ensemble des mécanismes menant à la formation des cellules spumeuses. Signalons que le récepteur scavenger reconnaît également d'autres LDL modifiées (LDL acétylées, ...) (d'après Steinberg et Witztum, 1990).

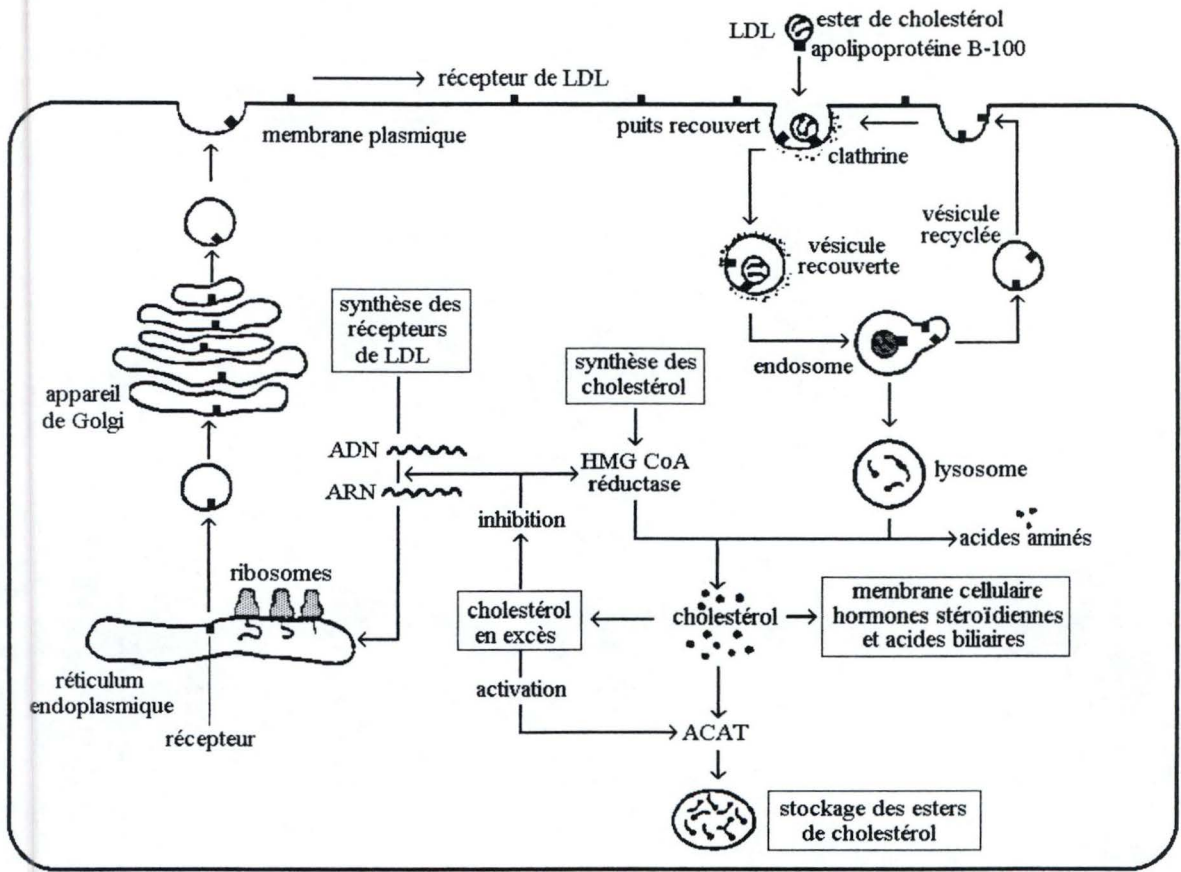


Fig. 23 Régulation de la concentration en cholestérol intracellulaire lors de la captation de LDL natives par les récepteurs B/E (d'après Solera, 1993).

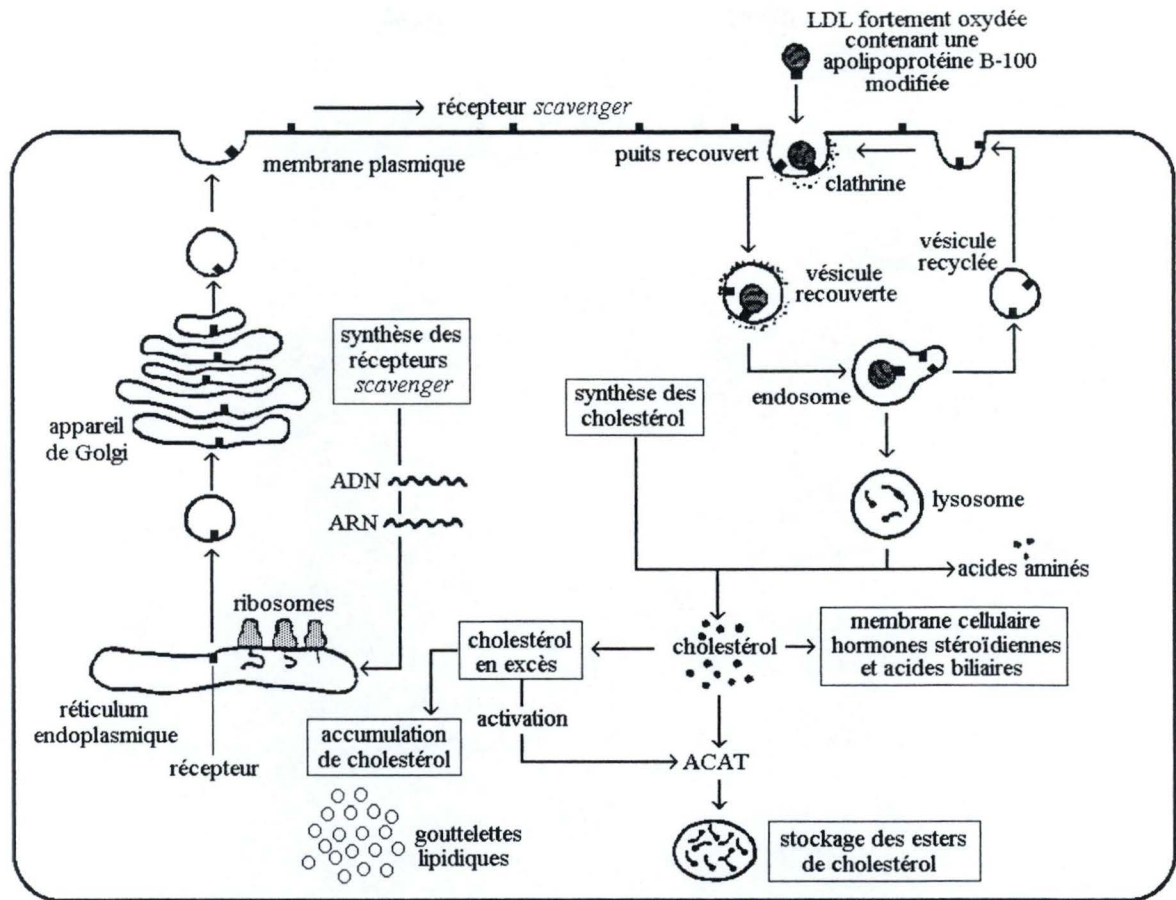


Fig. 24 Absence de la régulation de la concentration du cholestérol intracellulaire lors de la captation de LDL fortement oxydées par les récepteurs *scavenger* (d'après Solera, 1993).

l'expression des récepteurs scavenger, mais on constate que cette expression diminue lorsque le macrophage s'active (Freeman, 1994; Geng, 1995).

4.5.2.B. Mécanismes menant à la formation de cellules spumeuses

Les mécanismes menant à la formation de cellules spumeuses sont résumés à la Fig 22. Nous allons les passer rapidement en revue. La formation des cellules spumeuses résulte de l'accumulation intracellulaire des LDL, et ce via trois systèmes de récepteurs différents: les récepteurs scavenger, mais aussi les récepteurs aux LDL natives et les récepteurs Fc.

Les récepteurs des LDL natives sont régulés par le cholestérol libre dans la cellule. En effet, lorsque le cholestérol se trouve en quantité suffisante dans la cellule, par *feed-back* négatif, il est capable en inhibant l'expression du récepteur aux LDL d'empêcher sa propre entrée (Fig 23).

Le récepteur scavenger, par contre, ne possède pas ce mécanisme de *feed-back* négatif (Fig 24). Le cholestérol va donc s'accumuler dans la cellule jusqu'à ce qu'elle meure d'indigestion. Ces cellules sont appelées cellules spumeuses car, observées au microscope électronique, elles présentent un cytoplasme rempli de gouttelettes lipidiques (Klinkner, 1995). Il existe trois différents types de dépôt lipidique cellulaire: les inclusions lipidiques cytoplasmiques, les corps lipidiques lysosomiaux et les cristaux de cholestérol.

Les LDL ont tendance à s'agréger assez rapidement, en tout cas *in vitro*. Ces agrégats formés sont phagocytés intensivement par les récepteurs aux LDL natives.

Enfin, les LDL oxydées sont immunogènes et peuvent former des complexes immuns avec les autoanticorps dirigés contre eux. Ces complexes immuns sont rapidement internalisés par le macrophage via le récepteur Fc (Steinberg and Witztum, 1990).

4.6. Contribution des cellules musculaires lisses, prolifération et synthèse de la matrice extracellulaire

Lors de la formation de la plaque fibreuse, les LDL oxydées et la lysophosphatidylcholine issue de leur oxydation, stimulent les cellules endothéliales, les

cellules musculaires lisses et les monocytes à produire des facteurs chimiotactiques et des facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses. Ces facteurs vont entraîner une migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima (Berliner and Heinecke, 1996) et leur prolifération (Ross, 1986), caractéristiques des lésions athérosclérotiques.

Ces facteurs contrôlant ces processus sont le PDGF (*platelet derived growth factor*), le FGF (*fibroblast growth factor*), l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α (*tumor necrosis factor*) et le HB-EGF (*heparin binding epidermal growth factor*) (Berliner and Heinecke, 1996). Signalons toutefois que la présence de ces cytokines dans les lésions ne garantit pas leur activité. En effet, certaines peuvent se lier sous forme inactive à la matrice extracellulaire. Ainsi, la matrice joue en quelque sorte un rôle régulateur de la prolifération (Ross, 1993).

Les cellules musculaires lisses en grand nombre dans l'intima vont synthétiser une quantité de constituants de la matrice extracellulaire. Cette synthèse de molécules est accentuée par le TNF α et l'IL-1, trouvés tous les deux dans l'intima des lésions athéromateuses (Berliner and Heinecke, 1996).

Parallèlement à cette prolifération de cellules musculaires lisses et à cette accumulation de molécules de la matrice extracellulaire, des petits noyaux lipidiques sont formés. En effet, certaines LDL modifiées échappent à l'endocytose et forment un noyau extracellulaire de cholestérol séquestré dans l'intima. Une partie de ce noyau provient aussi des lipides issus des cellules spumeuses (Scheider, 1991).

4.7. Complications liées aux lésions avancées

La formation du noyau nécrotique et la calcification caractérisent la phase avancée de la lésion. Cette lésion apparaît à partir de l'âge de 40 ans et est aussi nommée athérome. Le noyau est formé d'une accumulation dense de lipides extracellulaires occupant une large région de l'intima et issue de la fusion des petits noyaux lipidiques extracellulaires. Ce noyau de nécrose épaissit le mur artériel et est généralement assez large pour être visible à l'oeil nu (Stary et al., 1995).

La mortalité des cellules spumeuses macrophagiques à l'intérieur du noyau est importante et son explication n'est pas éclaircie. Il est fort possible qu'elles meurent par apoptose ou nécrose. En effet, dans le noyau nécrotique, la concentration en calcium est fort élevée et peut induire la nécrose ou l'apoptose (Berliner and Heinecke, 1996).

Un foyer de calcification peut se développer à proximité du noyau nécrotique. Une série d'études récentes sur la calcification vasculaire suggère qu'il s'agit d'un processus similaire à la formation d'os calcifiés chez les ostéoblastes. Les vésicules membranaires libérées lors de l'apoptose et probablement aussi des lipides oxydés pourraient contribuer à cette calcification (Berliner and Heinecke, 1996).

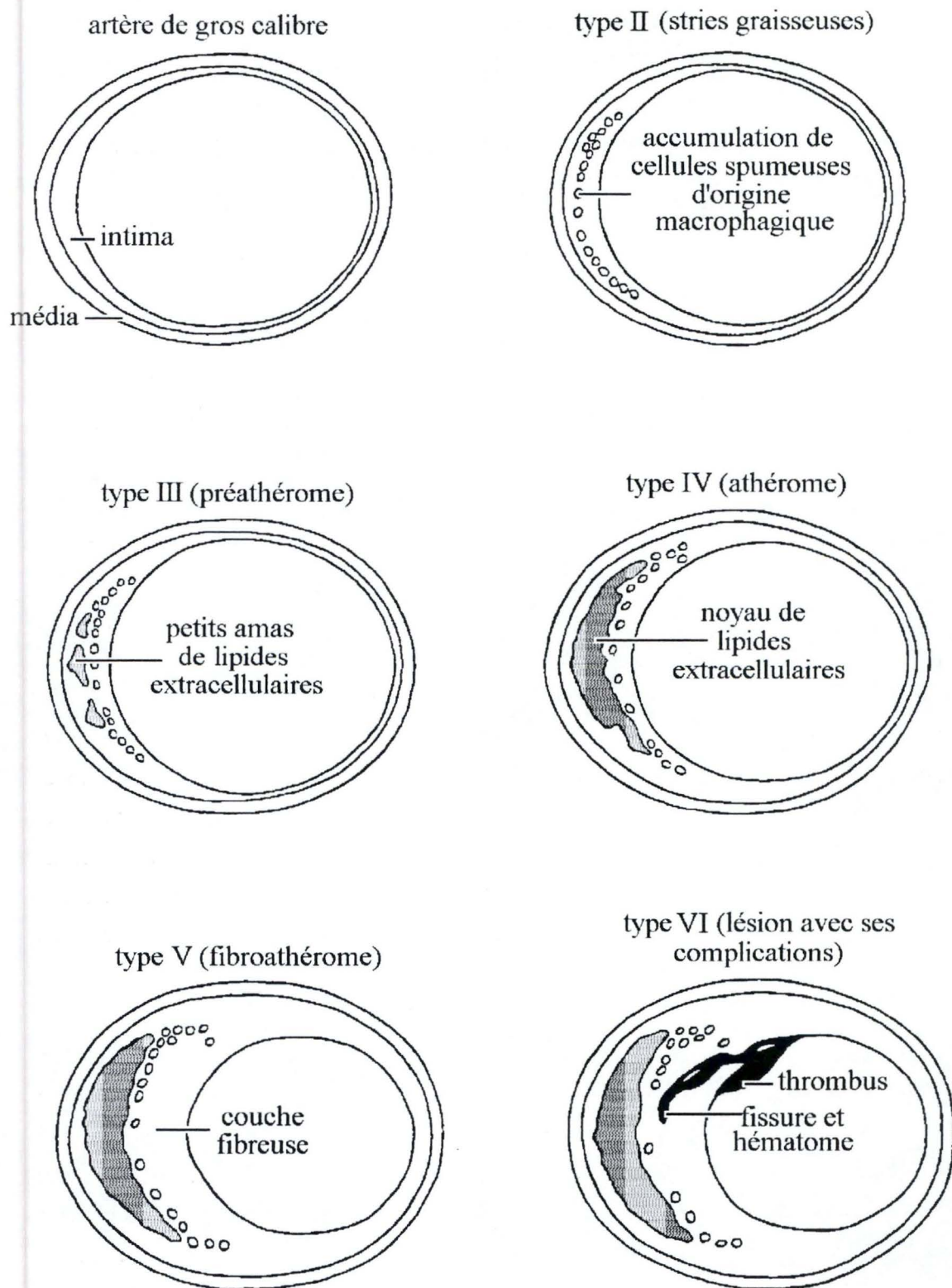


Fig. 25 Classification schématique des différentes lésions athérosclérotiques (d'après Stary, 1995).

5. Evolution des lésions athérosclérotiques

L'évolution et la progression des lésions athérosclérotiques ont pu être classifiées en différents types suivant les changements morphologiques et histologiques de l'intima (Fig 25).

La lésion de type I également appelée lésion initiale est caractérisée par la formation de quelques cellules spumeuses isolées dans l'intima. Ensuite, une forte accumulation de lipides intracellulaires mène à la formation de stries graisseuses ou lésion de type II. La lésion intermédiaire ou de type III contient des petits amas de lipides extracellulaires.

Ces trois premiers types de lésion sont rassemblés sous le nom de lésions précoces et ne se manifestent pas cliniquement. Tandis que les trois types suivants, regroupés sous le nom de lésions avancées, sont souvent liés à des événements cliniques.

Lorsque les petits amas lipidiques fusionnent pour former un noyau extracellulaire, la lésion est dite de type IV et est aussi appelée athérome. Ensuite, un fibroathérome se développe. Cette lésion de type V est caractérisée par le noyau et la formation d'une couche fibrotique. Mais, elle peut se présenter aussi sous forme de multiples noyaux lipidiques et de couches fibrotiques. Cette lésion de type V présente également souvent des foyers de calcification. A ce stade, la lumière artérielle rétrécit fortement.

Enfin, le dernier type de lésion (lésion liée à des complications ou lésion de type VI) est caractérisé par la formation d'un thrombus suite à une rupture de la plaque athéromateuse ou à une blessure endothéliale. En effet, la plaque peut se rompre à certains endroits fragilisés par des foyers de calcification (Demer et al., 1994) ou par une dégradation de la matrice extracellulaire par certaines enzymes activées par les LDL oxydées (Berliner et al., 1995) ou encore par une forte infiltration monocytaire à certains endroits (Woolf, 1992). La blessure endothéliale est provoquée par toute une série de substances toxiques libérées durant l'oxydation des LDL ou par les cellules environnantes (Steinberg, 1988).

6. Rôle hypothétique du facteur NF-kappa B dans l'athérosclérose

6.1. Biologie du facteur NF-κB

Nous avons vu au paragraphe 4.5.1.B. que les LDL oxydées activent dans les cellules endothéliales ainsi que dans d'autres types cellulaires, une variété de gènes impliqués dans l'inflammation, mais le lien entre les LDL oxydées et la transcription spécifique de certains gènes est loin d'être élucidé.

En général, ces gènes sont activés via des facteurs de transcription qui, se liant au site augmenteur ("enhancer") de la région promotrice du gène, activent sa transcription. Le mécanisme par lequel les LDL partiellement oxydées activent les gènes est encore inconnu mais les stress oxydatifs interviendraient dans cette activation et des études avec des inhibiteurs de synthèse protéique indiquent que l'activation de ces gènes par les mmLDL ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines (Andalibi et al., 1993). Donc, les mmLDL activeraient des facteurs de transcription préexistants.

Un facteur de transcription qui est activé par les stress oxydatifs et qui semble impliqué dans la régulation de la transcription de plusieurs gènes de l'inflammation, notamment de l'IL-6, est le facteur NF-κB (Baeuerle and Henkel, 1994). De plus, on retrouve un site de liaison pour ce facteur de transcription dans le promoteur des gènes de certaines molécules d'adhésion comme VCAM-1 (Wayne Alexander, 1995), de molécules chimiotactiques comme MCP-1 et de molécules jouant un rôle dans la différenciation des monocytes en macrophages comme le M-CSF (Rajavashisth, 1995).

Ce facteur n'est probablement pas le seul intervenant dans l'activation cellulaire induite par les LDL oxydées. En effet, des études ont montré une augmentation de l'activité du facteur de transcription AP-1 suite à une activation cellulaire par les LDL oxydées (Bork, 1992). Une séquence de liaison pour AP-1 est également présente dans le promoteur du gène ICAM-1. Un autre facteur de transcription, CREB est activé par les LDL oxydées via l'augmentation de la concentration intracytosolique en AMPc (Parhami, 1993). L'expression d'ELAM-1 dépend également de ce facteur de transcription (Whitley, 1994). Néanmoins, dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi de nous focaliser sur le facteur NF-κB afin de mieux comprendre son rôle dans l'athérosclérose, les données à ce sujet restent peu nombreuses et controversées.

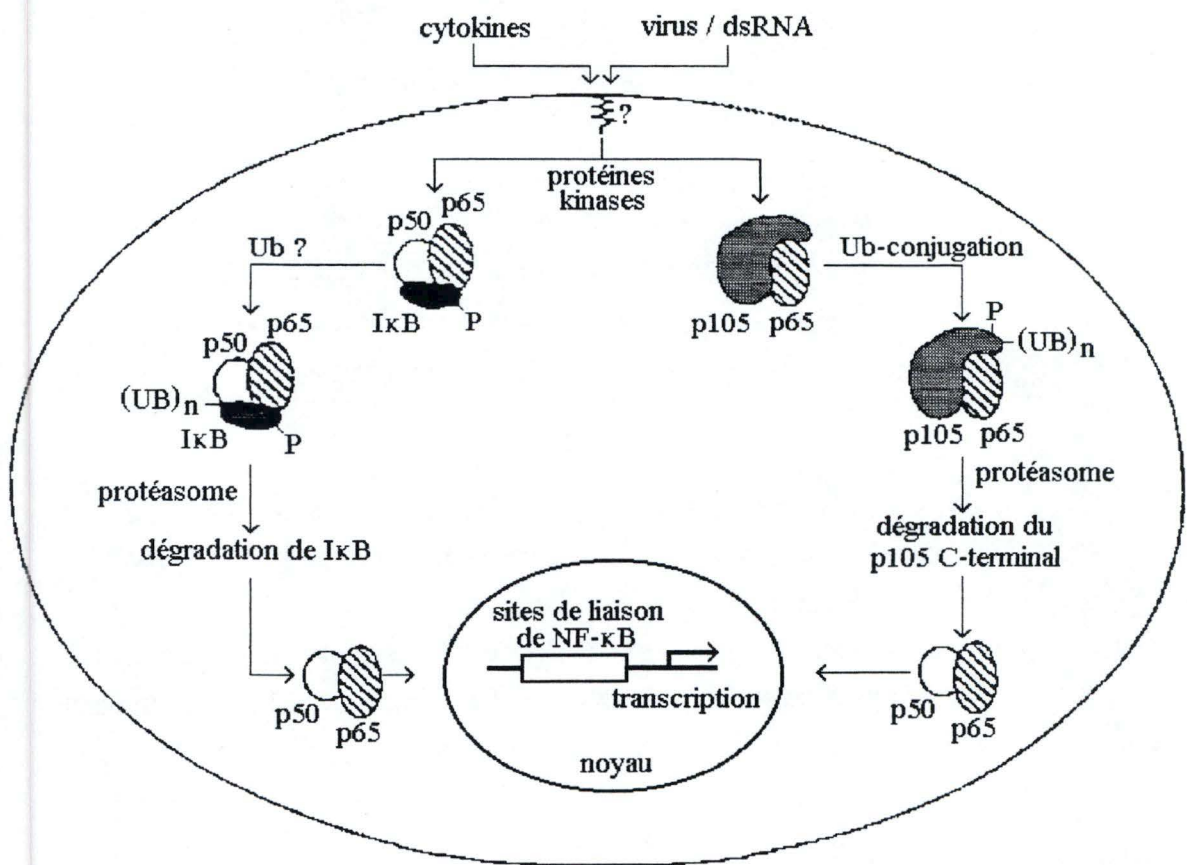


Fig. 26 Les deux complexes NF-κB / inhibiteur et leur activation (d'après Palombella, 1994).

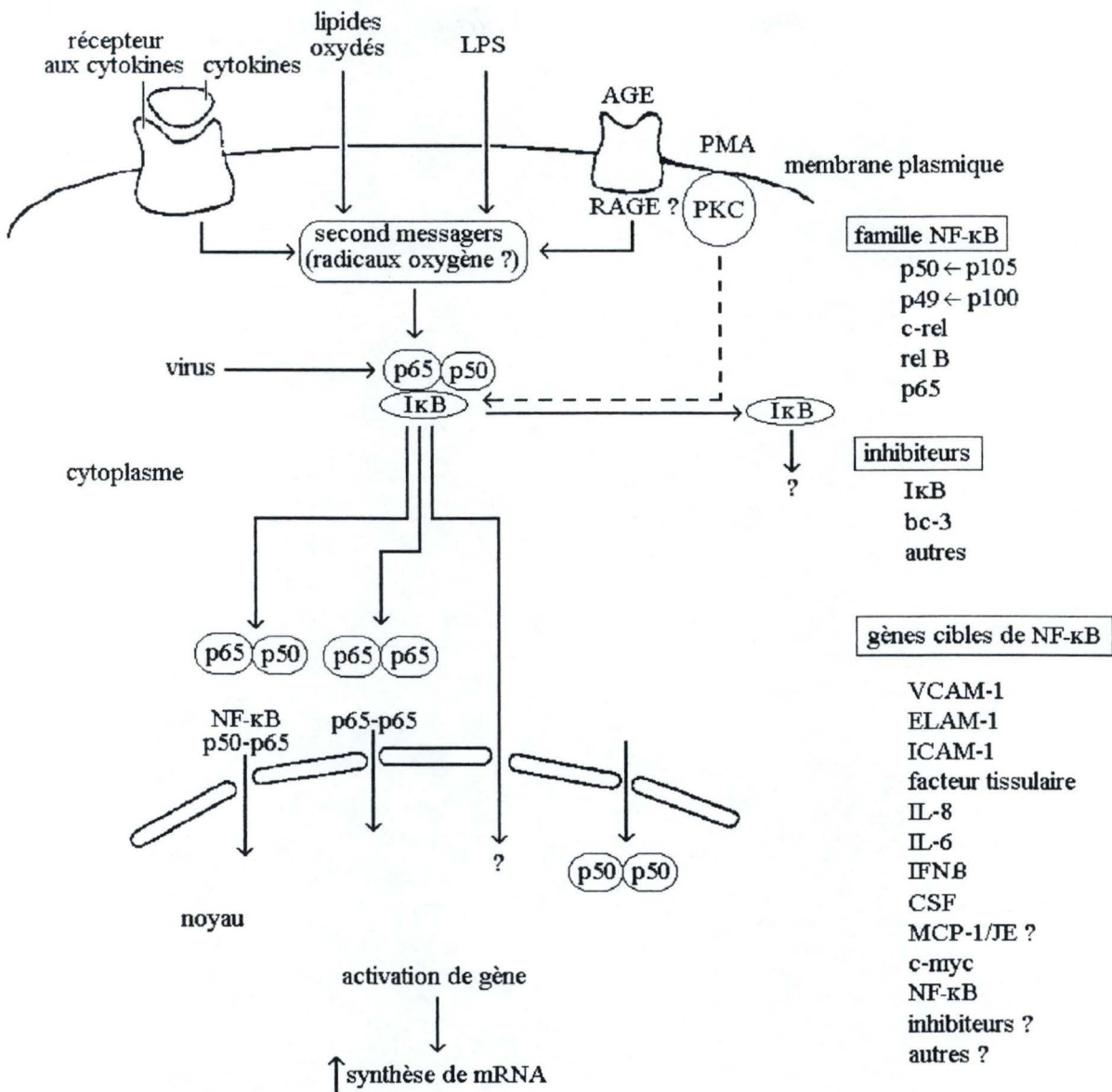


Fig. 27 Régulation du facteur NF-κB: ses activateurs, ses inhibiteurs et ses gènes cibles (d'après Collins, 1993).

6.1. Biologie du facteur NF- κ B

Ce facteur a été mis en évidence pour la première fois dans les lymphocytes B par Sen et Baltimore (Sen et Baltimore, 1986). Ils ont démontré que lorsque ce facteur se fixe sur une séquence cis située entre le segment J et le segment C, il active l'expression de ces gènes codant pour les chaînes kappa des immunoglobulines. Les auteurs ont ainsi nommé ce nouveau facteur de transcription "*nuclear factor kappa B*". Par la suite, des expériences ont révélé que ce facteur était présent dans de nombreux types cellulaires et qu'il active une série d'autres gènes.

6.1.1. Description sous sa forme inactive

Le facteur de transcription NF- κ B est localisé dans le cytoplasme sous une forme inactive et peut principalement se trouver sous deux formes (Fig 26). La première est constituée d'un dimère p50 et p65 correspondant respectivement à deux polypeptides de 50 et 65 kDa, et d'une sous-unité inhibitrice I κ B. La seconde comprend un dimère p65/p105, où la protéine p105 jouant le rôle d'inhibiteur, est le précurseur de p50.

Les différentes sous-unités de ces deux types de dimères font partie de la famille Rel/NF- κ B. Ces protéines comprennent une région de 300 acides aminés appelée *Rel Homology region* (RHR) impliquée dans la dimérisation des protéines, l'interaction avec I κ B, la migration vers le noyau et la liaison avec l'ADN (Siebenlist et al, 1994).

Dans la famille Rel/NF- κ B, deux groupes sont à distinguer. D'une part, les protéines synthétisées sous forme de précurseurs et devenant matures par protéolyse suite à des signaux extracellulaires. Ce groupe comprend les protéines p50 et p52 avec leurs précurseurs respectifs p105 et p100. D'autre part, les protéines p65, c-Rel et v-Rel, Rel B et les protéines de drosophile dorsal et Dif font partie du second groupe et n'ont pas de précurseurs (Thanos et Maniatis, 1995).

Il peut donc se former différents complexes entre les protéines de cette famille menant à la formation d'homo- et d'hétérodimères. Néanmoins, c'est l'hétérodimère p50/p65 qui est trouvé le plus fréquemment, lié à I κ B dans le cytoplasme (Fig 27) (Grimm et Baeuerle, 1993).

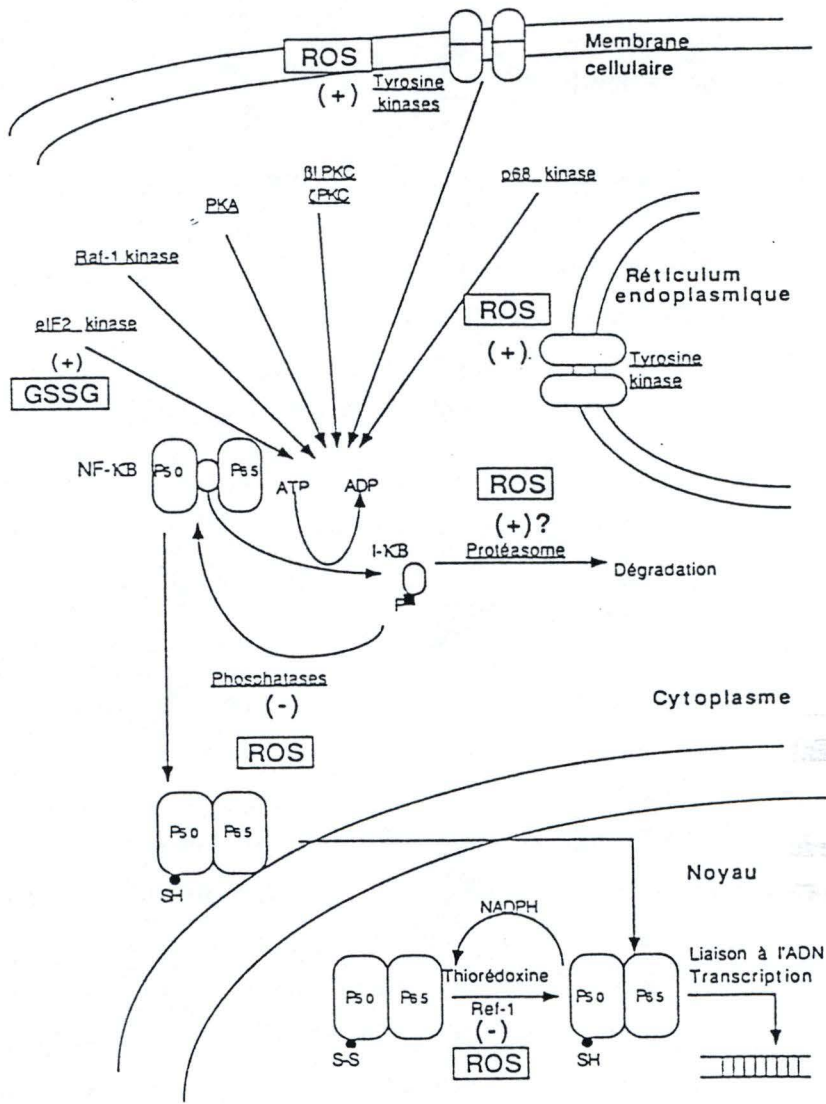


Fig. 28 Les kinases qui seraient candidates pour phosphoryler la sous-unité inhibitrice IκB (d'après Raes et al., 1995)

6.1.2. Activation de NF- κ B

Une phosphorylation et une protéolyse de I κ B ou du précurseur p105 doivent avoir lieu afin de rendre le facteur NF- κ B actif (Henkel et al., 1993). Les stimuli qui activent NF- κ B sont très diversifiés mais certains d'entre eux possèdent des points communs notamment celui de générer des dérivés actifs de l'O₂ (*reactive oxygen intermediates*, ROI) dans les cellules.

En effet, les esters de phorbol comme le PMA, les ionophores de calcium et les rayons UV (Devary et al., 1993), sont utilisés en laboratoire afin d'activer la facteur de transcription NF- κ B.

Des facteurs plus physiologiques comme le TNF α , l'IL-1 (Hiscott et al., 1989), les LPS et des infections virales (Osborn et al., 1989) induisent aussi l'activation du facteur NF- κ B. Enfin, les ROI eux-mêmes peuvent aussi l'activer.

La nature de ces ROI a été étudiée à l'aide d'antioxydants neutralisants. Il semble que le peroxyde d'hydrogène joue un rôle dans l'activation (Schreck et al., 1991). Mais cette activation par le H₂O₂ semble dépendre fortement du type cellulaire et même du clone de cellules étudié (Schreck et Baeuerle, 1994). Les rapports GSH/GSSG, qui peuvent varier d'un type de cellule à l'autre, jouent également un rôle important. Renard et ses collaborateurs (sous presse) ont montré qu'une modulation de la glutathion peroxydase, affectait directement l'activité de NF- κ B, dans les fibroblastes humains stimulés à l'IL-1.

Les conditions oxydantes semblent donc activer le facteur NF- κ B. Cette activation induit par un mécanisme encore inconnu la phosphorylation des sous-unités I κ B et p105. Certaines kinases comme la PKA, la PKC, la RAF 1 kinase, l'eIF2 kinase seraient candidates pour les phosphoryler (Fig 28) (Ghosh et Baltimore, 1990).

Lorsqu'elle est phosphorylée, I κ B est rapidement ubiquitinée. Reconnue alors par le protéasome, elle est dégradée. D'autre part, p105 est protéolysé par son extrémité carboxy-terminale pour générer une sous-unité p50 (Palombella et al., 1994). Par la dégradation d'I κ B et de p105, une région comprenant le signal d'importation nucléaire (NLS) localisé dans le RHR est démasquée au niveau des facteurs dimérisés p50/ p65 (Grimm et Baeuerle, 1993). Grâce au domaine NLS devenus accessibles, les dimères vont pouvoir migrer vers le noyau.

type de LDL oxydée / modifiée	cellules cibles	conditions de stimulation	facteur de transcription étudié	effets ↗↘	auteurs
LDL oxydée avec 5 μ M/l de CuSO ₄ durant 15 h	cellules musculaires lisses humaines	50 μ g/ml 4 h	NF- κ B	↘	Mikko, 1995
LDL oxydée avec 5 μ M/l de CuSO ₄ durant 15 h	cellules musculaires lisses humaines	50 μ g/ml 4 h	AP-1	↗	Mikko, 1995
LPC	cellules musculaires lisses humaines	5 μ g/ml 2 h	NF- κ B	↗ faible	Mikko, 1995
LPC	cellules musculaires lisses humaines	20 μ g/ml 2 h	NF- κ B	↗ faible	Mikko, 1995
LDL fortement oxydées par 10 μ M de CuSO ₄ durant 4 jours	macrophages	15 μ g/ml 0 à 8 h	NF- κ B	↘	Schakelford, 1995
mmLDL	L-cells	200 μ g/ml 6 h	NF- κ B	↗	Rajavashisth, 1995
mmLDL	BAEC	200 μ g/ml 6 h	NF- κ B	↗	Rajavashisth, 1995
LDL oxydées avec du CuSO ₄ 5 μ M durant 2 à 24 h	cellule endothéliale de veine saphène humaine	50 μ g/ml 6 h	NF- κ B	↗	Peng et al., 1995
LDL oxydées avec du CuSO ₄ 5 μ M durant 2 à 24 h	cellule endothéliale de veine saphène humaine	50 μ g/ml 6 h	NF- κ B	↗	Peng et al., 1995

Tableau 10 Effets des LDL diversément oxydées et de la LPC sur l'activation de NF- κ B dans divers modèles cellulaires *in vitro*

Au niveau de l'ADN, le facteur NF- κ B se dirige vers sa séquence cible 5'-GGGACTTCC-3' (Sen et Baltimore, 1986) et est capable de stimuler la transcription des gènes possédant cette séquence cible dans leur promoteur (gènes de cytokines, d'immunoglobulines, de molécules d'adhésion,...) (Baeuerle et Henkel, 1994).

6.2. NF- κ B et l'athérogénèse

En 1993, Andalibi et ses collaborateurs ont démontré que lorsqu'ils soumettent des souris C57BL/6 à un régime athérogène ou quand ils leur injectent des mmLDL, ils observent *in vivo* une augmentation de l'expression de M-CSF dans le foie et dans la circulation ainsi qu'une augmentation de l'activité de NF- κ B dans le foie. Ces auteurs émirent donc l'hypothèse du rôle possible de NF- κ B dans l'athérogenèse. Depuis, plusieurs équipes ont essayé de vérifier cette hypothèse en utilisant des modèles *in vitro*.

Ces expériences ont été réalisées *in vitro* en incubant des LDL oxydées ou des dérivés de leur oxydation, avec différentes cellules. Après un temps bien défini d'incubation, l'activation ou l'inhibition du facteur de transcription a été analysée. Le tableau 10 rassemble ces travaux.

Nous pouvons remarquer que les conditions de stimulation et de préparation des LDL ainsi que les cellules cibles sont très variables d'un laboratoire à l'autre, ce qui rend les comparaisons malaisées. Néanmoins, nous voyons que d'une manière générale, les mmLDL activent le facteur de transcription NF- κ B tandis que les LDL fortement oxydées l'inhibent, bien qu'il n'existe pas encore d'unanimité à ce sujet, vu le nombre réduit de travaux réalisés jusqu'à présent.

7. Objectifs du mémoire

Le rôle des facteurs de transcription dans l'athérogenèse n'est étudié que depuis quelques années. Les expériences réalisées *in vitro* ou *in vivo* dans ce domaine sont encore peu nombreuses et nous constatons déjà que les résultats entre les différents laboratoires étudiant l'athérogenèse sont fort controversés. Chaque laboratoire possède son propre modèle cellulaire et ses propres préparations de LDL.

Ces résultats contradictoires entre laboratoires proviennent en partie du fait que le matériel utilisé, c'est-à-dire les LDL sont très difficile à manipuler (contamination, agrégation rapide,...), à préparer de manière reproductible et à caractériser biochimiquement. Des différences minimales dans la préparation de LDL peuvent engendrer des effets biologiques totalement différents de ces LDL sur les cellules. Or, nous avons pu voir dans les tableaux 9 et 10 récapitulatifs, que chaque laboratoire procède différemment pour préparer les LDL. De plus, les LDL sont extraites de donneurs différents et nous avons vu que les caractéristiques des LDL (cinétique de l'oxydation, par exemple), peuvent varier d'un individu à l'autre.

Vu ces résultats forts contestés et comme l'étude *in vitro* des facteurs de transcription dans l'athérogenèse fait l'objet d'un nouveau projet dans notre laboratoire, le but de ce travail sera d'abord de choisir les modèles cellulaires adéquats pour l'étude de l'athérogenèse *in vitro* et ensuite, de stimuler ceux-ci avec différentes préparations de LDL préalablement caractérisées au niveau de leur partie lipidique et protéique.

Nous avons décidé dans ce travail de comprendre le rôle des monocytes/macrophages dans l'athérogenèse lorsque ceux-ci sont mis en présence de différentes préparations de LDL car, comme nous l'avons vu précédemment, ces cellules jouent un rôle certain dans les premiers stades du développement de la maladie. Pour ce faire, nous avons choisi une lignée cellulaire humaine (THP-1) et une autre murine (J774). Nous étudierons leur rôle au niveau de l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B, facteur se trouvant dans le promoteur de nombreux gènes surexprimés dans les lésions précoces de la maladie et au niveau de la libération d'IL-6, cytokine dont le gène possède une séquence cible pour NF- κ B dans son promoteur.

Afin de vérifier si ces cellules sont des modèles adéquats, nous les avons testées à deux niveaux différents. Nous allons tout d'abord voir si ces cellules sont capables de se transformer en cellules spumeuses comme dans le cas *in vivo* de la pathogénie. Ensuite, nous vérifierons si le facteur de transcription NF- κ B peut être activé dans ces cellules et si elles sont capables de produire de l'IL-6. Pour ce faire, nous testerons deux

molécules reconnues comme étant activatrices du facteur NF- κ B et productrices de la libération d'IL-6, à savoir l'IL-1 β et les LPS.

Après ces expériences préliminaires, nous testerons les effets que peuvent avoir les différentes préparations de LDL sur les monocytes/macrophages. Ces LDL sont soit des LDL natives, c'est-à-dire non modifiées, soit des LDL modifiées dans la partie protéique par du malondialdéhyde, soit des LDL modifiées et dans la partie protéique et dans la partie lipidique suite à une forte oxydation par du Cu⁺⁺. Ces différentes préparations de LDL nous ont été fournies par la KUL et ont été préalablement caractérisées au niveau de leur partie protéique et lipidique par diverses méthodes.

Nous testerons d'abord l'effet de ces LDL sur les monocytes/macrophages non stimulés afin de découvrir si elles provoquent à elles seules une activation ou une inhibition de l'activation du facteur NF- κ B et de la libération de cytokines.

Ensuite, nous testerons ces LDL sur des monocytes/macrophages stimulés par des LPS afin d'étudier leur effet activateur ou inhibiteur sur les cellules stimulées avec des LPS.

Enfin, nous étudierons l'effet de ces LDL sur la libération, par les macrophages, de M-CSF, facteur impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages.

Ce travail devrait donc nous permettre de voir dans quelle mesure des LDL modifiées uniquement au niveau de la partie protéique exercent des effets biologiques différents de ceux induits par des LDL oxydées et au niveau de la partie lipidique et au niveau de la partie protéique.

*MATERIELS
et METHODES*

1. Culture de cellules

La lignée cellulaire des monocytes THP-1 utilisée lors de nos expériences nous a été fournie par le *Center for Vascular Molecular Biology* (KUL, Leuven). Ces cellules se trouvent en suspension dans le milieu.

Nous utilisons également la lignée cellulaire macrophagique J774 (également fournie par la KUL). Ce sont des cellules murines qui adhèrent au fond des boîtes de culture.

1.1. Matériels

- RPMI 1640: (Gibco) utilisé comme milieu de culture
- RPMI + 10% S : milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco)
- Milieu HAM utilisé comme milieu de rinçage
- RPMI+BSA: milieu RPMI contenant 0,1% d'albumine sérique bovine (Sigma Chemicals Co,USA)
- bleu de trypan (Sigma Chemicals Co,USA)
- T75: boîte de culture de 75 cm² (Corning pour les J774 ou Greiner pour les THP-1)
- racloir stérile (Nunc, Roskilde, Danemark)

1.2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm². Le milieu RPMI+10%S utilisé pour le repiquage est préchauffé à 37°C dans l'étuve, et les ustensiles employés ont été préalablement stérilisés à 180 °C pendant huit heures.

1.2.1. Comptage

Les macrophages J774 adhérents à la boîte sont détachés à l'aide d'un racloir stérile. Puis, la suspension cellulaire est transvasée dans un tube stérile de 50 ml (Sarstedt, Allemagne).

La suspension cellulaire contenant les monocytes THP-1 est directement transvasée dans un tube stérile de 50 ml.

Ensuite, les deux lignées suivent le même protocole suivant. Un volume de 200 μ l de la suspension cellulaire est prélevé et 200 μ l de bleu de trypan y sont ajoutés. Ce colorant nous permet de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes. Les cellules vivantes restent claires car elles sont imperméables au colorant tandis que les cellules mortes, perméables au colorant, prennent une couleur bleue. Le comptage des cellules se fait à l'aide d'une chambre de Neubauer.

1.2.2. Repiquage

Le maintien de la lignée se déroule comme suit. Le repiquage est réalisé dès que la boîte contient $10 \cdot 10^6$ cellules. La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm pendant 10 minutes, à la centrifugeuse (International Equipment Company). Le surnageant est décanté et le culot de cellules est resuspendu dans un volume de milieu tel que la concentration soit de 10^6 cellules/ml. Ensuite, $3 \cdot 10^6$ ou $4,5 \cdot 10^6$ ml de cette suspension sont placées dans les boîtes T75. Le volume est porté à 15 ml avec du milieu de culture. Les boîtes sont alors placées dans un incubateur à 5 % de CO_2 . Au taux de reproduction de 1,5 / 24 heures, les $10 \cdot 10^6$ cellules sont obtenues en 2 jours à partir de $4,5 \cdot 10^6$ cellules et en 3 jours à partir de $3 \cdot 10^6$ cellules. Les boîtes sont alors de nouveau prêtes à être repiquées.

1.2.3. Congélation - décongélation

1.2.3.A. Matériels

- Milieu de culture RPMI
- Milieu de culture RPMI + 20% S: milieu RPMI auquel on a ajouté 20% de sérum de veau foetal.
- DMSO + 8%: Diméthyl sulfoxyde auquel on a ajouté 8% de sérum de veau foetal.
- Ampoule stérile de 1,8 ml (Cryotubes, Nunc, Roskilde, Danemark)
- Milieu de culture RPMI+10% S
- Boîtes de cultures T75

1.2.3.B. Congélation

Lorsque les cellules atteignent une densité de $10 \cdot 10^6$ cellules/T75, elles sont récoltées dans un tube stérile de 50 ml et centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans 0,2 ml de milieu RPMI + 20%. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans une ampoule à congélation. Juste avant la congélation, 0,2 ml de DMSO + 8%S sont ajoutés aux cellules. Les ampoules sont alors directement placées dans un congélateur à -70°C . Eventuellement, ces ampoules peuvent être transférées ultérieurement dans de l'azote liquide.

1.2.3.C Décongélation

L'ampoule contenant les cellules congelées est placée dans un berlin rempli d'eau à 40°C . Une fois les cellules décongelées, l'ampoule est centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm (centrifugeuse de table Hettich, Allemagne). Après avoir décanté le surnageant, le culot est resuspendu dans 15 ml de milieu RPMI + 10%S et le tout est transvasé dans une boîte T75 qui sera placée dans un incubateur à 5 % de CO_2 . Le lendemain, la suspension cellulaire est récoltée dans un tube stérile de 50 ml et centrifugée 10 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et 15 ml de RPMI + 10% S frais sont ajoutés aux cellules. Enfin, la suspension cellulaire est transvasée dans une nouvelle T75 qui sera placée dans un incubateur à 10% de CO_2 . Dès que les cellules se trouvent à une densité de $10 \cdot 10^6$ cellules/T75, elles sont repiquées (voir point 1.2.2.).

2. Test de toxicité

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé des molécules dont il est important de vérifier la non-toxicité sur notre modèle cellulaire.

Des tests de toxicité sont réalisés grâce à la méthode au bromure d'éthidium et à l'acridine orange.

2.1. Matériels

La solution de coloration comprend 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma E-8751, Chemical Co, USA) et 15 mg d'acridine orange (Sigma, Chemicals Co, USA) dissous dans 1 ml d'éthanol à 95% et 49 ml d'eau. Cette solution stock est aliquotée en fractions de 1 ml et stockée à -20°C. Nous l'utilisons diluée 100 fois dans du PBS (Phosphate buffer saline, tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9%, porté à pH 7,4): elle se conserve un mois à 4°C.

2.2. Méthode

Comme l'ont décrit Parks et al (1979), cette méthode se base sur deux colorants fluorescents nucléaires : l'acridine orange et le bromure d'éthidium. L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore leur noyau en vert fluorescent. Par contre, le bromure d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, mais colore en orange le noyau des cellules mortes.

Ce test de cytotoxicité peut s'effectuer sur des cellules en suspension ou sur des cellules adhérentes.

2.2.1. Coloration des cellules en suspension

Une goutte de la suspension cellulaire est prélevée et déposée sur une lame porte-objet. Ensuite, au même endroit, une goutte de la solution de coloration est ajoutée. Le tout est recouvert d'une lamelle couvre-objet et observé immédiatement (au bout d'une dizaine de minutes, privées de milieu les cellules commencent à s'adhérer) au microscope à fluorescence (Dialux 21, Leitz). Le comptage différentiel s'effectue sur environ 500 cellules.

Les résultats sont exprimés comme suit :

$$\% \text{ de survie} = \frac{\text{Nombre de cellules vertes}}{\text{Nombre de cellules vertes} + \text{nombre de cellules oranges}} \times 100$$

2.2.2. Coloration des cellules adhérentes

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey, USA). Le nombre de cellules par boîte de pétri dépend de l'expérience réalisée. Après un temps d'incubation défini en fonction de l'expérience, le milieu est décanté et deux gouttes de la solution de coloration sont déposées dans le fond de la boîte. Ensuite une lamelle couvre-objet y est ajoutée. La boîte de Pétri est alors observée au microscope à fluorescence. Nous réalisons un comptage différentiel (cellules vertes et cellules oranges séparément) sur un total de d'environ 500 cellules se trouvant sous la lamelle couvre-objet.

3. Dosages de protéines

3.1. La méthode Bradford

3.1.1. Matériels

- colorant (BIO-RAD, USA)
- échantillon de protéines
- cuvettes en verre

3.1.2. Méthode

Le dosage de protéines s'effectue comme suit : pour chaque échantillon à doser, environ 4 % du volume total d'extrait protéique est dilué dans 3,2 ml d'eau distillée. Le tout est réparti dans 3 tubes à raison de 0,8 ml par tube. On ajoute, de minute en minute, 0,2 ml de colorant, puis on lit l'absorbance à 595 nm après exactement 5 minutes de coloration. La cuvette en verre doit être rincée à l'éthanol ou à l'acétone, puis à l'eau entre chaque lecture.

Les valeurs de densités optiques sont converties en μg de protéines grâce à une droite d'étalonnage allant de 2,5 à 7,5 μg de SAB (sérum albumine bovine).

3.2. La méthode au Folin

3.2.1. Principe

Les protéines du tapis cellulaires seront dosées par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les protéines sont dénaturées par le NaOH et exposent de cette façon leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleu est mesurée à 660 nm au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

3.2.2. Matériels

- Solution d'étalon protéine (sérum albumine bovine) à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma).

- NaOH 0,5 N et NaOH 1 N (Merck).
- Mixture alcaline (solution A) à préparer juste avant l'emploi :
 - 100 ml Na₂CO₃ 0,19 M (Merck)
 - 1 ml CuSO₄.5H₂O 0,04 M (Merck)
 - 1 ml NaKC₄H₄O₆.1H₂O 0,07 M (Merck)
- Réactif de Folin à diluer deux fois (Merck).

3.2.3. Méthode

Les cellules sont rincées trois fois avec du HBSS. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 0,5 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Parallèlement, on prépare le blanc et l'étalon :

- blanc : 0,2 ml d'eau + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes
- étalon : 0,2 ml d'étalon + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes

Les protéines cellulaires sont resuspendues et deux fractions de 0,2 ml sont récoltées. Le blanc et l'étalon sont gardés tels quels. Ces fractions peuvent soit être dosées directement, soit être congelées à -20°C pour un dosage ultérieur.

Les fractions de protéines cellulaires, le blanc et l'étalon sont décongelés. Pour tous les tubes, toutes les 30 secondes, 2 ml de mixture alcaline sont ajoutés. Celle-ci doit réagir pendant 5 à 15 minutes. Les tubes sont vortexés directement. Ensuite, 0,2 ml de réactif de Folin sont ajoutés en respectant l'ordre des tubes et le temps et vortexés immédiatement après. La densité optique (DO) à 660 nm est lue au spectrophotomètre après 30 minutes.

La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/ml} = 200 \times \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc})}{(\text{DO étalon} - \text{DO blanc})}$$

4.Préparation des LDL

4.1. Isolement des LDL

4.1.1. Matériels

- EDTA (Merck) préparé à une concentration de 100 mg/ml dans de l'eau distillée
- tube d'ultracentrifugation Quick Seal de 3,2 ml (Beckman)
- bromure de potassium (Merck)
- PBS
- Centrifuge Optima TLX (Beckman)
- Seringue de 1ml (Terumo, Leuven, Belgique)
- aiguille de 16 mm (Terumo)
- sac de dialyse (Belgolabo)
- pince de dialyse (Vel, Amsterdam)
- filtre de 0,45 μ m (Millex-HV, Millipore, Gottingen, Allemagne)
- tubes de 15 ml gradués (Sarstedt)

4.1.2. Méthode

Les LDL sont isolées directement à partir d'échantillons de sang humain. Le sang est prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA (1 mg/ml final). Les tubes sont immédiatement agités afin de bien homogénéiser le sang et la solution d'EDTA. L'EDTA est un chélateur de métaux, il est utilisé pour ralentir l'oxydation naturelle des LDL.

Ensuite, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 2000 rpm à 4°C afin de séparer le plasma des éléments figurés sanguins. Le plasma est décanté, aliquoté et stocké à -20°C.

L'isolation proprement dite des LDL à partir du plasma sanguin se fait par centrifugation sur un gradient de densité. La densité du plasma sanguin est portée à 1,24 g/ml à l'aide du bromure de potassium (381,6 mg/ml). Le plasma sanguin ainsi préparé est ajouté dans des tubes d'ultracentrifugation à raison de 1,1 ml de plasma par tubes de 3,2 ml. Ensuite, 2,1 ml de PBS sont ajoutés délicatement de manière à ne pas mélanger les deux phases. La densité du PBS est de 1,006 g/ml. Les tubes sont alors scellés et mis à centrifuger à 100 000 rpm pour une durée de 2 heures à 15°C dans l'ultracentrifugeuse Optima TLX. Les vitesses d'accélération et de décélération sont fixées à 5.

Lorsque la centrifugation est terminée, on observe 4 bandes dans les tubes qui correspondent de bas en haut au plasma, aux HDL, aux LDL et aux VLDL. La fraction de LDL est récoltée à l'aide d'une seringue pourvue d'une aiguille que l'on pique à

travers la paroi du tube au niveau de la bande correspondante. Cette fraction de LDL obtenue est alors dialysée à 4°C pendant toute une nuit contre du PBS contenant 0,01% de EDTA afin d'éliminer l'excès de bromure de potassium.

Quand les LDL ont été dialysées, elles sont filtrées sur un filtre de 0,45 µm et leur concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford. Ces LDL, une fois leur préparation terminée, sont appelées LDL natives ou N-LDL.

4.2. Modification des N-LDL à l'aide du malondialdéhyde

4.2.1. Matériels

- malondialdéhyde (Sigma)
- HCL 12N (Merck)
- NaOH 1N (Merck)
- PBS
- sac de dialyse
- pince à dialyse
- filtre de 45 µm
- tubes de 15 ml
- EDTA préparée à une concentration de 100 mg/ml dans de l'eau distillée

4.2.2. Méthode

Cette technique a pour but de modifier les N-LDL dans leur partie protéique uniquement.

La solution de malondialdéhyde (0,5 M) à utiliser doit être préparée le jour même de la façon suivante: 4,4 ml de malondialdéhyde, 200 µl de HCl 12N et 20,4 ml d'eau distillée sont mélangés délicatement dans un berlin et incubés pendant 10 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée en portant le pH de cette solution à 7,4 avec une solution de NaOH 1N. Ensuite le volume est porté à 50 ml avec de l'eau distillée.

Pour préparer les LDL modifiées au malondialdéhyde (MDA-LDL), il faut mélanger un volume de N-LDL avec un volume de la solution de malondialdéhyde 0,5 M et laisser incuber cette solution pendant 3 heures à 37°C. Une fois l'incubation terminée, les MDA-LDL sont dialysées à 4°C pendant toute une nuit contre du PBS

contenant 0,01% de EDTA afin d'éliminer l'excès de malondialdéhyde. Après dialyse, elles sont passées sur un filtre de 0,45 μm et leur concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

4.3. Modification des N-LDL à l'aide du chlorure de cuivre

4.3.1. Matériel

- chlorure de cuivre préparé à une concentration de 6,4 mM (Merck)
- EDTA préparé aux concentrations de 100 mg/ml et de 0,2 M dans de l'eau distillée
- Oxygène 95% (L'Air liquide)
- PBS
- sac de dialyse
- pince de dialyse
- filtre de 45 μm
- tubes de 15 ml

4.3.2. Méthode

Cette technique a pour but de modifier les N-LDL et dans leur partie lipidique et dans leur partie protéique. Par cette méthode, on obtient des LDL fortement oxydées.

Les N-LDL utilisées dans ce cas doivent avoir été dialysées pendant une nuit à 4°C contre du PBS ne contenant pas d'EDTA. Ces N-LDL sont ensuite mélangées avec une solution de CuCl_2 (10 μM final) et de l'air est insufflé dans cette solution afin d'activer la réaction. La solution est incubée pendant 16 heures à 37°C et la réaction est ensuite arrêtée en ajoutant de l'EDTA (0,2 M final).

Les LDL sont ensuite dialysées à 4°C pendant toute une nuit contre du PBS contenant 0,01% de EDTA afin d'éliminer l'excès de CuCl_2 . Après dialyse, elles sont passées sur un filtre de 0,45 μm et leur concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford.

Ces LDL, une fois leur préparation terminée, sont appelées LDL oxydées ou Ox-LDL.

4.4. Caractérisation biochimique des différentes préparations de LDL

Les préparations de LDL que nous avons testées tout au long de ce travail ont été essentiellement préparées par le Centre de Biologie Moléculaire et Vasculaire (CBMV) de Leuven selon les méthodes présentées aux points 4.1., 4.2. et 4.3.

Afin de s'assurer que ces LDL répondaient bien aux critères que nous attendions, différentes techniques ont été utilisées dans le but de les caractériser biochimiquement. Ces techniques sont:

- L'ELISA par compétition contenant des anticorps dirigés contre les MDA-LDL.
- Le dosage des TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*).
- La migration électrophorétique des LDL sur gel d'agarose.
- Le suivi de l'oxydation des LDL au spectrophotomètre.

A l'exception de l'ELISA par compétition que nous n'avons pas pratiqué nous-mêmes, toutes les techniques ont été réalisées dans le cadre de ce travail. La méthode par ELISA est utilisée de façon régulière par le personnel du CBMV de Leuven.

Cette méthode permet de mettre en évidence une modification de la partie protéique des LDL induite par la malondialdéhyde. Des anticorps spécifiques des MDA-LDL mais qui ne reconnaissent pas les LDL natives ont été développés aux CBMV de Leuven. Les puits d'une boîte multipuits sont recouverts de ces anticorps. Les diverses préparations de LDL sont alors ajoutées en présence de différentes concentrations en anticorps dirigés contre les MDA-LDL afin de réaliser une compétition. Si la préparation de LDL est une préparation de LDL modifiées dans la partie protéique par la malondialdéhyde, celles-ci vont se lier aux anticorps. Ensuite, la quantité de LDL liées aux anticorps peut être déterminée par le système de détection classique de l'ELISA: un seconde anticorps spécifique des MDA-LDL lui-même lié à une biotine pourra réagir avec une streptavidine liée à la peroxydase qui en présence de son substrat produira de la couleur. L'intensité de la couleur produite est directement proportionnelle à la quantité de LDL liées aux anticorps.

Les autres méthodes de caractérisation des LDL ont été effectuées au cours de ce travail et sont présentées dans la suite de ce chapitre.

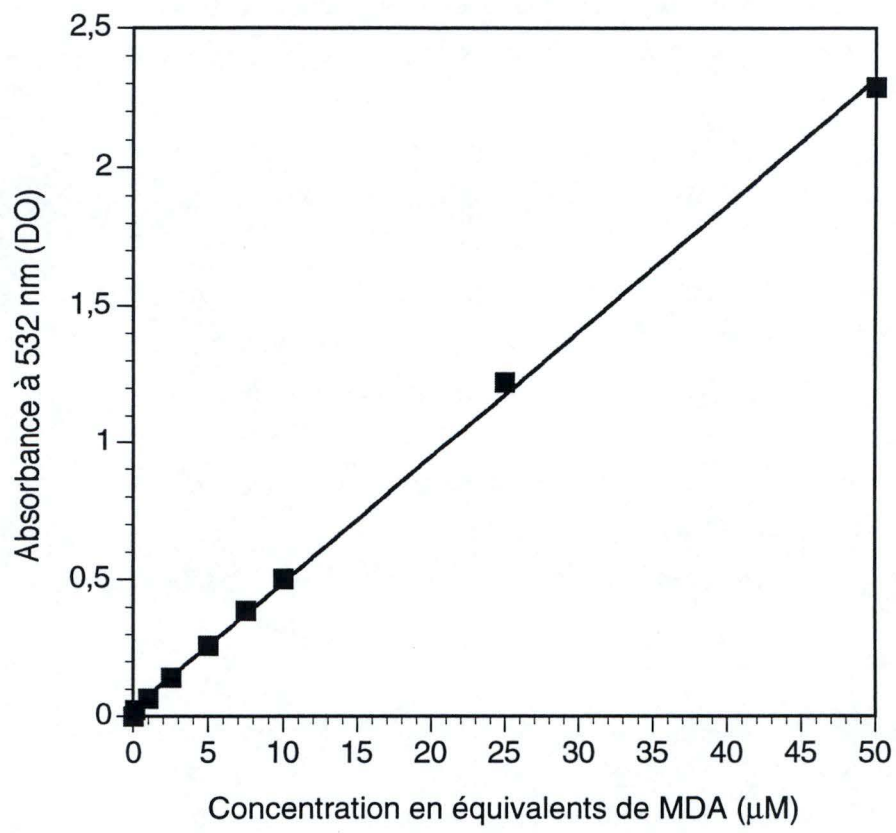


Fig 1 Droite d'étalonnage des TBARS.

4.4.1. Le dosage des TBARS

Cette méthode consiste en une réaction entre une molécule de malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique qui donne lieu à la production d'un pigment rose dont l'absorption maximale se situe entre 532 et 535 nm. L'intensité du pigment est donc directement proportionnelle à la quantité de malondialdéhyde présente.

De manière générale, cette technique est utilisée pour caractériser des LD fortement oxydées. En effet, lors de l'oxydation des LDL, suite aux peroxydations lipidiques qui ont lieu dans les LDL, des aldéhyde sont libérés et vont se lier sur la partie protéique des LDL. Donc, le dosage des TBARS sur ces LDL donne une idée du taux d'oxydation réalisé au sein des LDL.

Cependant, dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé cette technique afin de caractériser les modifications ayant lieu dans la partie protéique des LDL suite à la réaction de l'apolipoprotéine B avec le malondialdéhyde.

4.4.1.A. Matériels

- PBS
- MDA-LDL (préparation au point 4.2.)
- N-LDL (préparation au point 4.1.)
- Acide trichloroacétique (Merck)
- Acide thiobarbiturique (Sigma)
- Malondialdéhyde
- Tubes en verre (Vel)

4.4.1.B. Méthode

Les différentes préparations de LDL sont diluées dans du PBS afin d'obtenir 50 µg de LDL pour un volume final de 600 µl dans des tubes en verre. A cette solution, 600 µl de PBS contenant 150 µg d'acide trichloroacétique et 600 µl de PBS contenant 6,7 mg d'acide thiobarbiturique sont ajoutés. Les tubes sont mis à bouillir durant 30 minutes et ensuite, les solutions sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm (centrifugeuse Hettich de table). Enfin, l'absorbance est lue à 532 nm. Une droite d'étalonnage est réalisée parallèlement avec différentes concentrations en malondialdéhyde (figure 1).

	Equivalents malondialdéhyde (nmoles/mg de LDL)
N-LDL	0
MDA-LDL	840

Tableau 1 Dosage des TBARS sur des N-LDL et des MDA-LDL. Les TBARS sont exprimés en nmoles par μg de LDL

Un résultat typique de ce dosage est présenté au tableau 1. La concentration en malondialdéhyde présente sur les LDL est exprimée en nmoles d'équivalent malondialdéhyde pour 1 mg de LDL. D'une part, nous n'observons aucune présence de malondialdéhyde sur les N-LDL ce qui prouve que les N-LDL sont bien exemptes de toute modification dans la partie protéique. D'autre part, nous observons également que l'incubation de 1 mg de N-LDL avec du malondialdéhyde 0,5 M pendant 3 heures à 37°C entraîne la liaison de 840 nmole de MDA.

4.4.2. La migration électrophorétique des LDL sur gel d'agarose

A la suite d'une modification de la partie protéique des LDL ou d'une oxydation de celles-ci, on observe une diminution des charges positives au sein de l'apolipoprotéine B des LDL.

La méthode présentée ci-dessous permet de séparer les différentes préparations de LDL en fonction de leurs charges respectives.

4.4.2.A. Matériels

- agarose (Biorad, Hercules, CA, USA)
- barbital (Vel)
- barbital sodium (Merck)
- TRIS (Merck)
- Acide borique (Merck)
- EDTA (Merck)
- Sucrose (Tirlemont, Tirlemont, Belgique)
- Bleu de bromophénol (Janssens, Hyde Cheshire, Angleterre)
- Bleu de Coomassie (Phast Gel Blue, Pharmacia)
- Acide acétique (Merck)
- Sulfate d'ammonium (Merck)
- Oil Red O (Aldrich, Milwaukee, WIS, USA)
- Ethanol (BDH, Poole, Angleterre)

4.4.2.B. Méthode

Un gel d'agarose à 0,8 % est préparé dans du TBE. Ce tampon est constitué de Tris (0,09 M), d'acide borique (0,09 M) et d'EDTA (0,002 M). Le tampon

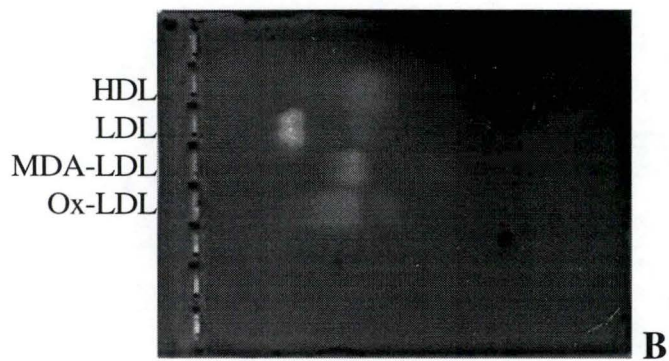
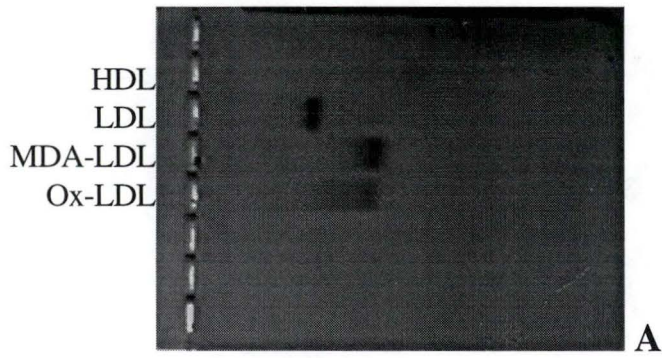


Fig 2

Migration sur gel d'agarose (0,8 %) de différentes préparations de LDL (N-LDL, MDA-LDL, Ox-LDL).

A. Coloration des lipides à l'Oil Red O.

B. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.

d'électrophorèse est composé de barbital (0,01 M) et de barbital sodium (0,05 M). Le pH préconisé pour ce tampon est de 8,6.

Le volume correspondant à 15 µg de LDL est prélevé et mélangé, pour un rapport 3:1, avec une solution de sucrose à 40 % dans du tampon barbital additionné de bleu de bromophénol.

Les échantillons déposés sur le gel d'agarose sont soumis à une tension de 80 V, à 4°C, pendant 1 h 30. Une fois la migration terminée, le gel est fixé dans une solution contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique (figure 2).

Le gel peut être ensuite coloré de deux manières différentes: soit par une coloration des lipides (figure 2A), soit par une coloration des protéines (figure 2B). La coloration lipidique est réalisée pendant 2 à 3 jours sous agitation dans une solution d'Oil Red O préparée dans de l'éthanol à 60 %.

Tandis que lors d'une coloration protéique, nous incubons le gel durant 1 h 30 sous agitation, dans une solution de bleu de Coomassie. Cette solution est préparée en dissolvant une tablette de Phast Gel Blue dans 80 ml de méthanol et en la filtrant ensuite. Lorsque la coloration est terminée, le gel est décoloré pendant une quinzaine de minutes dans la solution de fixation. Enfin, il peut être conservé dans une solution contenant 10 % d'acide acétique.

Les résultats présentés aux figures 2A et 2 B montre des différences quand à la migration des préparations de LDL. On observe que les MDA-LDL ainsi que les Ox-LDL migre plus loin que les N-LDL. En effet, les MDA-LDL et les Ox-LDL ont perdu des charges positives suite à leur modification, elles sont donc plus attirées par la borne positive. Sur ces figures, on peut observer également que la tache correspondant aux MDA-LDL est moins étalée que celle correspondant aux Ox-LDL. Dans le cas des Ox-LDL, on observe un trainée diffuse à l'avant de la tache. Cette trainée est due au fait que les Ox-LDL ne sont pas toutes exactement au même stade d'oxydation à un moment déterminé.

4.4.3. Le suivi de l'oxydation au spectrophotomètre

Au cours de l'oxydation des LDL, on observe une augmentation de la formation des hydroperoxydes, d'acide gras avec des doubles liaisons conjuguées, ces diènes conjugués montrent un maximum d'absorption à 234 nm. Il est donc possible de suivre l'oxydation des LDL au spectrophotomètre. La courbe au cours du temps présente trois phases consécutives, une phase de latence pendant laquelle l'absorption à 234 nm

n'augmente que très légèrement, une phase de propagation qui est caractérisée par une augmentation rapide de l'absorption à 234 nm et une phase de décomposition (Esterbauer *et al.*, 19889).

4.4.3.A. Matériels

- PBS
- CuCl₂ préparé à la concentration 6,4 mM dans de l'eau distillée
- N-LDL (préparation au paragraphe 3.1.2.)
- spectrophotomètre (Spectronic Genesis 2)

4.4.3.B. Méthode

Au préalable, les N-LDL doivent avoir été dialysées pendant 24 heures à 4°C contre du PBS ne contenant pas d'EDTA. Cette étape a pour but d'éliminer l'EDTA présent dans la solution de N-LDL qui empêcherait l'oxydation de celles-ci.

Le spectrophotomètre est réglé sur la longueur d'onde de 234 nm. Une mise à zéro est effectuée à l'aide de deux cuvettes contenant du PBS.

Dans un premier temps, 250 µg de N-LDL sont placés dans une cuvette et le volume est porté à 1 ml avec du PBS. Cette cuvette est appelée "cuvette test". Une seconde cuvette contiendra 1 ml de PBS et sera nommée "cuvette référence". Les deux cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre et l'absorbance est lue à 234 nm pendant 30 minutes. Cette étape permet de vérifier si les N-LDL ne sont pas déjà en phase d'oxydation prononcée. Si l'absorbance de la cuvette test ne varie pas au cours de ces 30 minutes, les N-LDL peuvent être utilisées.

Une fois cette première lecture terminée, un nouvel autozéro est effectué sur la cuvette test afin de ramener la valeur de la densité optique à zéro. Ensuite, du CuCl₂ est ajouté dans la cuvette test ainsi que dans la cuvette référence afin d'obtenir une concentration finale de 1,66 µM de CuCl₂. Les cuvettes sont immédiatement mélangées afin d'homogénéiser la solution et placées dans le spectrophotomètre. Le suivi de l'oxydation des N-LDL se fait à 234 nm pendant plusieurs heures.

Le suivi de l'oxydation des LDL a été réalisé sur deux préparations de LDL différentes. La première préparation a été préparée au CBMV de Leuven. Toutes les expériences de ce travail ont été réalisées avec des préparations de LDL provenant de

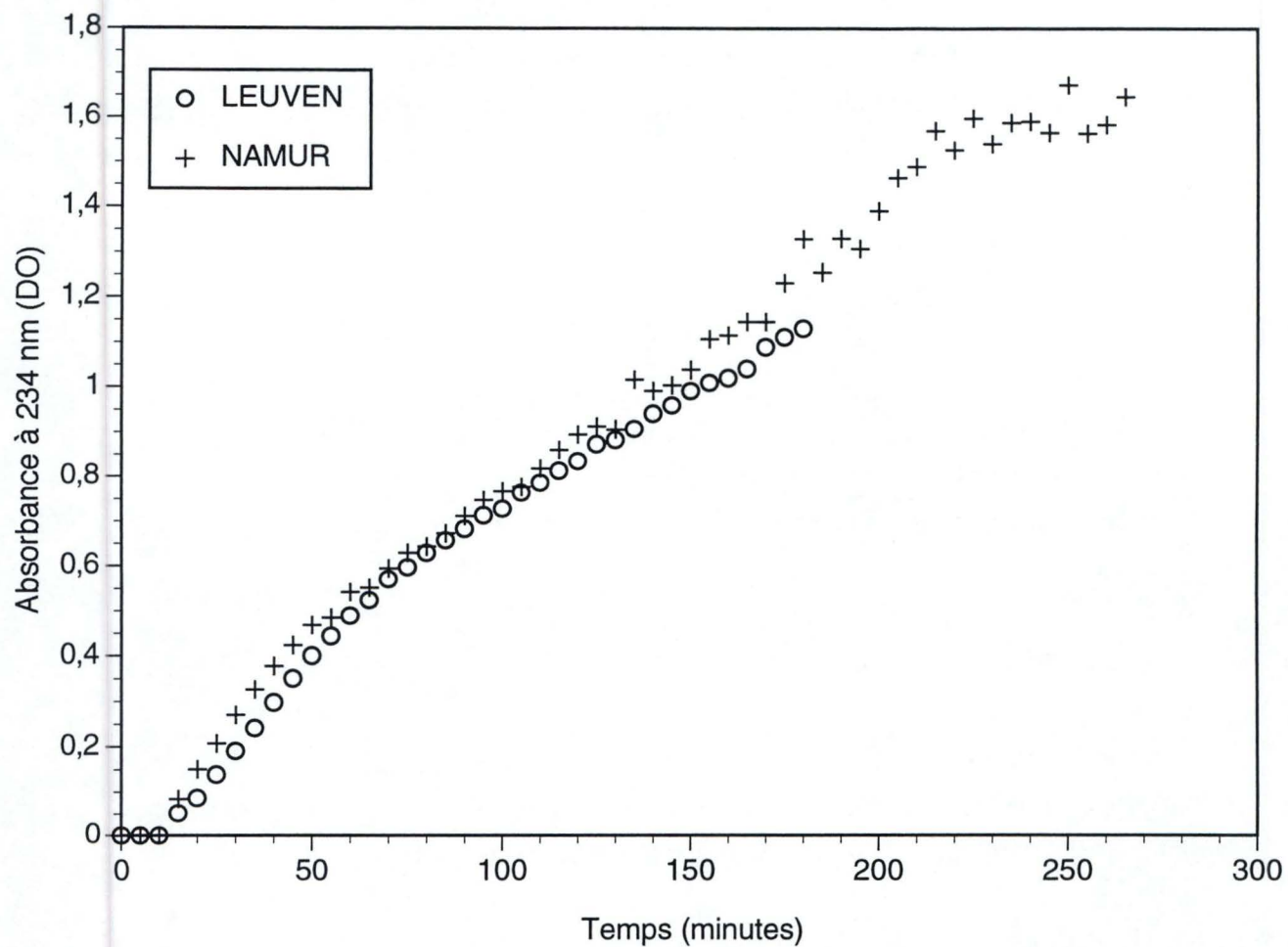


Fig 3 Suivi au cours du temps de l'oxydation de deux préparations de LDL (la première provenant de Leuven, la seconde provenant de Namur) à 234 nm.

Leuven. La seconde préparation a été préparée à Namur. Etant donné que dans un avenir proche, nous désirons réaliser nous mêmes les différentes préparations de LDL afin de ne plus dépendre de Leuven, nous avons comparé le profil d'oxydation des LDL venant d'un donneur de Leuven avec celles d'un donneur de Namur. Nous pouvons observer à la figure 3 que les deux profils d'oxydation sont quasi identiques. Le suivi de l'oxydation a été prolongé jusqu'à 265 minutes pour la préparation de Namur et nous observons l'apparition d'un plateau qui correspond à la phase de décomposition.

Nous pouvons donc en conclure que les deux donneurs ont des profils d'oxydation des LDL comparables. Nous pourrions donc réaliser nous-mêmes les préparations LDL pour la suite des travaux sur ce sujet.

5. Différenciation des monocytes en cellules macrophagiques

5.1. Matériels

-Milieu RPMI+10% S

-Le type de boîte (T25 ou boîte de Pétri (Corning ou Falcon) de 35 mm de diamètre) dépend de l'expérience.

-Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, P-8139, Sigma Chemical Co, USA) est un ester de phorbol dont la solution stock est préparée à une concentration de 0,5 ou 1 mg/ml dans de l'éthanol.

Les fractions sont conservées à -70°C.

5.2. Méthode

Nous avons utilisé la méthode décrite par Holvoet et ses collaborateurs (1995).

Après comptage et centrifugation, les cellules sont resuspendues, à la densité désirée pour l'expérience, dans une solution de RPMI+ 10% S contenant du PMA 0,3 μ M. Les boîtes de culture contenant les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 10 % CO₂ pendant 24 heures au cours desquelles la différenciation en macrophages a lieu. Après ces 24 heures, on peut observer au microscope des cellules devenues adhérentes à la boîte.

6. Différenciation des cellules macrophagiques en cellules spumeuses

La méthode de différenciation et de coloration utilisée est celle décrite par Holvoet et ses collaborateurs (1995).

6.1. Différenciation des cellules macrophagiques en cellules spumeuses

6.1.1. Matériels

- RPMI+BSA
- N-LDL, MDA-LDL et oxLDL
- Boîtes de Pétri de 35mm de diamètre (Falcon ou Corning)
- milieu de rinçage

6.1.2. Méthode

Les cellules, ensemencées à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules par boîtes, ont été différenciées en macrophages suivant la méthode décrite au point 4. Les boîtes de Pétri de 35mm de diamètre contenant les cellules macrophagiques sont ensuite rincées délicatement avec du milieu de rinçage. Après avoir décanté le surnageant, 2 ml de milieu RPMI+BSA contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDL sont ajoutés aux cellules. Les cellules sont incubées pendant 24 heures au terme desquelles les cellules macrophagiques se sont différenciées en cellules spumeuses.

6.2. Coloration des cellules spumeuses

6.2.1. Matériels

- PBS
- Paraformaldéhyde 4% (Merck, Darmstadt, Germany) dilué dans du PBS: cette solution est préparée au dernier moment
- Isopropanol 60% (Merck, Darmstadt, Germany) dilué dans de l'eau distillée

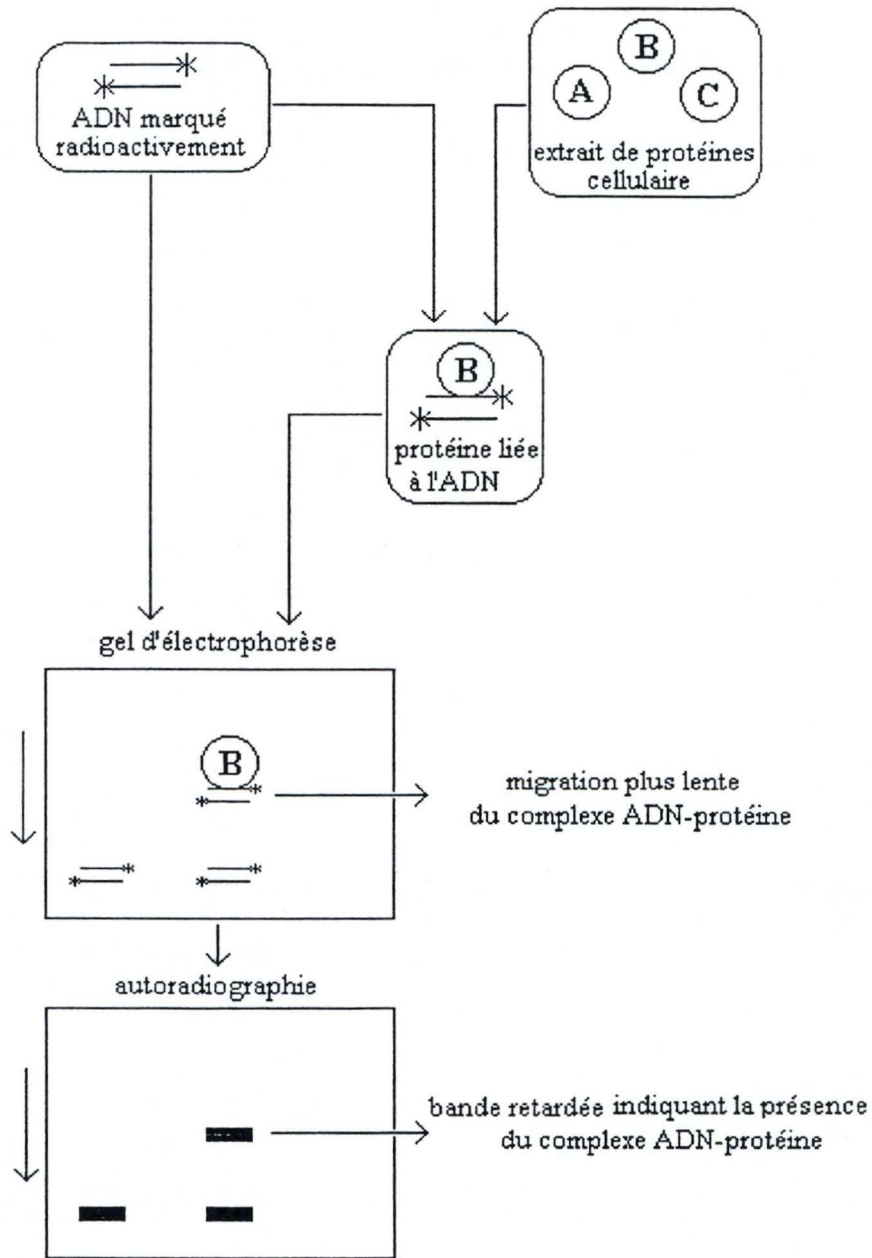


Fig. 4 Principe de la technique de retard sur gel (*electrophoretic mobility shift assay* ou EMSA). La liaison du facteur de transcription (B) à l'oligonucléotide marqué au P32 cause un retard de migration lors d'une électrophorèse sur un gel natif. Cette bande retardée apparaît sur une autoradiographie.

- Oil Red O 1% (Aldrich Chemical Company, USA) dilué dans de l'isopropanol 60%: cette solution est préparée au dernier moment
- Vert de méthyl 1% (BDH Chemicals Ltd Poole, UK) dilué dans de l'eau
- Microscope (Dialux 21, Leitz)
- Filtre bleu (Leica, Germany)

6.2.2. Méthode

Les boîtes de pétri contenant les cellules spumeuses sont délicatement rincées avec 2 ml de PBS. Les cellules sont fixées dans 2 ml de paraformaldéhyde à 4% pendant une heure à température ambiante. Puis, elles sont immergées brièvement dans de l'isopropanol 60% afin de les rendre perméables aux colorants. Ensuite, elles sont incubées pendant une heure à 4°C dans de l'Oil Red O 1% qui colore les lipides cellulaires en rouge. Au terme de cette incubation, le colorant est décanté et les cellules sont immergées durant 15 secondes dans du vert de méthyl. Celui-ci colore le noyau des cellules en vert. Enfin, ce second colorant est décanté et une lamelle couvre-objet est déposée sur les cellules. Les cellules sont observées au microscope à contraste de phase en présence d'un filtre bleuté afin d'améliorer les contrastes entre la coloration des lipides et le milieu.

7. E.M.S.A.

La technique de retard sur gel ou EMSA ("*Electrophoretic Mobility Shift Assay*") permet de mettre en évidence la (non)-liaison d'une protéine avec une séquence génomique (Fig 4). Un oligonucléotide contenant la séquence-cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse. Si la protéine active est présente dans l'extrait cellulaire, elle se lie au DNA marqué, et la migration du complexe DNA-protéine formé sera retardée par rapport à la migration de la sonde seule ("*shift*").

7.1. Matériels

7.1.1. Pour la stimulation des cellules

- Stimulants: IL-1 β , LDL, LPS
- PBS

7.1.2. Pour l'extraction

- pipettes pasteur
- raclette (Nunc, Danemark)
- Tampon de lyse : -HEPES : 0,02 M, pH 7,5 (Janssen Chimica)
 - NaCl : 0,35 M (Merck)
 - Glycérol : 20% dilué dans de l'eau distillée (Merck)
 - NP-40 : 1% dilué dans de l'eau distillée (Nonidet P-40, N-6537, Sigma, USA)
 - MgCl₂ : 1 mM (Merck)
 - EDTA : 0,5 mM, pH 7,5 (Titriplex, Merck)
 - EGTA : 0,1 mM, pH 7,5 (E-4378, Sigma, USA)

porter à 100 ml, autoclaver et ajouter la leupeptine :

-Leupeptin 10 µg / ml (L-2884, Sigma, USA)

avant chaque utilisation ajouter pour 5 ml de tampon:

- DTT : 5 µl / ml (Dithiothréitol, D-8024, Sigma, USA)
- PMSF : 5 µl / ml (Pefabloc, n°1429876, Boehringer)
- Aprotinine: 10 µl / ml (A-6279, Sigma, USA)

7.1.3. Pour le marquage de la sonde

Mixture réactionnelle :

-Oligo NF-κB (Proméga E-3291). Il est constitué de 22 paires de bases et reproduit la séquence *enhancer* de la chaîne légère des immunoglobulines de cellules B. Sa séquence est la suivante:

5'-AGTTGAGGGGACTTT CCC AGGC-3'

3'-TCAACT CCC CTGAAAGGGTCC G-5'

- Kinase buffer (n°1465392, Boehringer)
- Polynucléotide kinase (n°174645, Boehringer)
- ATP³² 10 mCi / ml (25 µl) (NEN)

EDTA : 0,25 M ; pH 8,0 ; autoclavé

Spin colonnes :

-Tubes

-Tampon TE : Tris HCl 10 mM, EDTA 1mM ; pH 8,0 ; autoclavé

Centrifugeuse : Jouan B.311 (Vel, Louvain-La-Neuve)

Comptage : avec l'Aqua-luma (Lumac, Pays-Bas)

7.1.4. Pour la liaison sonde-protéine

- Binding buffer :

-HEPES : 0,01 M, pH 7,5 (Janssen Chimica)

-Glycérol : 20% dilué dans de l'eau distillée (Merck)

-KCl : 300 mM (Merck)

-DTT : 10 mM (Dithiothréitol, D-8024, Sigma, USA)

-Binding mixture par puits :

-eau distillée, autoclavée

-Binding buffer

-Poly d (I-C) : (n°108812, Boehringer Mannheim) resuspendu dans du tampon Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, pour une concentration finale de 1 mg / ml. Cette solution est fractionnée et congelée à -20°C . Le Poly d(I-C) permet d'éviter la liaison non spécifique de protéines avec la sonde marquée.

-BSA : Albumine de sérum bovin sans DNAases (B-2518, Sigma, USA). Sa présence empêche la liaison non spécifique entre la sonde et diverses protéines de l'extrait cellulaire.

-Oligo marqué (25000 cpm)

-Bleu de bromophénol (Merck) 1% dilué dans du tampon de lyse

-Extrait protéique (25 µg)

7.1.5. Pour l'électrophorèse

Tampon d'électrophorèse :

TBE 0,5X : Sln.Stock (TBE 10X) :- Tris 0,9 M (Merck)

- Acide borique 0,9 M (Merck)

- EDTA 0,02 M (Merck)

Gel d'électrophorèse : pour 100 ml :

- Acrylamide / bisacrylamide:30% d'acrylamide (Boehringer)
1% de bisacrylamide (Gibco)
- Tampon d'électrophorèse TBE 0,5X
- eau distillée
- TEMED (Bio-Rad): concentration finale (c.f.) : 0,005%
- Persulfate d'ammonium (Bio-rad): c.f.: 0,06%

7.1.6. Pour la révélation sur film

- Film MP pour des isotopes émettant des radiations β et γ
(Amersham, UK)
- Révélateur PQ universel (Ilford, UK) dilué 5X
- Eau distillée
- Fixateur Hypam (Ilford, UK) dilué 5X

7.2. Méthode

7.2.1. Cellules en suspension

7.2.1.A. Culture des cellules

Les cellules sont repiquées à raison de $2,5 \cdot 10^6$ cellules par T25 dans 5ml de milieu RPMI+BSA et sont incubées durant 24 heures afin d'éliminer toute trace de sérum. Après ce rinçage, la suspension cellulaire est transvasée dans des tubes de 10 ml (Sterilin, UK) et centrifugée 10 minutes à 1000 rpm sous température ambiante.

7.2.1.B. Stimulation

Après avoir décanté le surnageant, les cellules sont resuspendues dans 3 ml de milieu RPMI+BSA contenant des concentrations déterminées en IL-1 β , en LDL ou en LPS. Ensuite, la suspension cellulaire est transvasée dans une nouvelle T25. La

stimulation des cellules a lieu pour une période déterminée en fonction de la molécule utilisée.

7.2.1.C. Récolte des protéines

Après la stimulation, le milieu contenant les cellules est transvasé dans un tube. Certaines cellules qui restent adhérentes à la boîte sont raclées à l'aide de 2 ml de PBS et ajoutées dans le tube. Elles subissent ensuite une centrifugation à 1000 rpm durant 10 minutes à 4°C. Après avoir resuspendu le culot dans 1,5 ml de PBS, la suspension cellulaire est transvasée dans un eppendorf et à nouveau centrifugée à 1000 rpm durant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse par une agitation douce. La réaction se déroule pendant 10 minutes à 4°C. Les eppendorfs sont alors centrifugés à vitesse maximale (14000 rpm, centrifugeuse Janetski TH12) pendant 20 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récolté et aliquoté. Quelques µl sont nécessaires pour effectuer un dosage de protéines selon la méthode de Bradford. Les extraits cellulaires sont enfin placés à - 70°C.

7.2.2. Cellules adhérentes

7.2.2.A. Culture des cellules

Les cellules sont incubées pendant 24 heures dans du milieu RPMI+ S+ PMA à raison de 5 ml dans des boîtes T25 (Corning) ou à raison de 2 ml dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Les cellules sont ensuite rincées dans du RPMI + BSA pendant 24 heures afin d'éliminer toute trace de PMA et de sérum.

7.2.2.B. Stimulation

Les cellules sont stimulées à l'aide de l'IL-1 β , de LPS ou de LDL pour une durée déterminée en fonction du type de l'expérience.

7.2.2.C. Extraction

Après la stimulation, le milieu est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec 2 ml de PBS froid. Les cellules sont ensuite raclées dans 1,5 ml de PBS froid. La suspension cellulaire est récoltée et centrifugée à 1000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse par une agitation douce. La réaction a lieu pendant 10 minutes à 4°C. Ensuite, les

eppendorfs sont centrifugés à vitesse maximale (14000 rpm, centrifugeuse Janetski TH12) pendant 20 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récolté et aliquoté. Quelques μl sont nécessaires pour effectuer un dosage de protéines selon la méthode de Bradford. Les extraits cellulaires sont enfin placés à -70°C .

7.2.3. La liaison de la sonde aux protéines

Le mélange de réaction contient 7,4 μl d'eau, 4 μl de tampon de liaison, 2 μl de poly d[I-C], 2 μl de BSA 10 mg / ml, un volume de sonde marquée au ^{32}P tel que chaque test contienne 25000 cpm (l'énergie de la sonde doit être réévaluée par comptage avant chaque expérience), et enfin 25 μg d'extraits protéiques.

Ce mélange réactionnel est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la réaction est arrêtée par l'ajout de 1 μl de bleu de bromophénol 0,3 % (Janssen Chimica, Belgique). Ensuite, les échantillons peuvent être déposés sur le gel.

7.2.4. Electrophorèse

Le gel est coulé, puis polymérisé pendant environ 1 heure. Il s'agit d'un gel natif (c'est-à-dire sans SDS, sodium dodecyl sulfate) afin de ne pas dénaturer le NF- κ B éventuellement actif, présent dans les extraits protéiques.

Le gel polymérisé est placé dans la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0,5X. Il sera soumis pendant 1 h 30 à une tension de 100 V afin d'équilibrer le gel. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits. La migration est maintenue pendant environ 3 heures sous une tension de 100 V, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne les 2 / 3 de la hauteur du gel.

7.2.5. Analyse et quantification

7.2.5.A Sur film autoradiographique

Le gel est démoulé et séché sous vide à 80°C pendant une heure entre un papier Whatman et un papier cellophane. Dans l'obscurité, le gel est déposé dans une cassette Kodak (KP 63375) en présence d'un film MP pré-flashé.

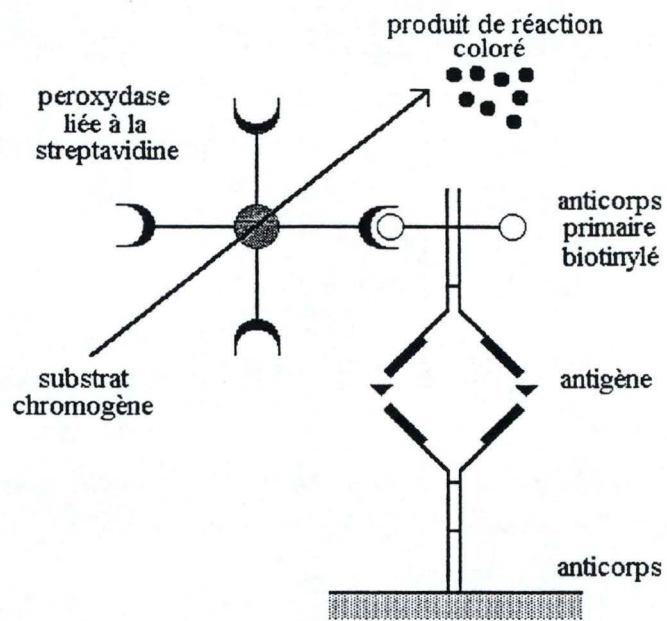


Fig. 5 Principe du test ELISA direct utilisé pour le dosage du bFGF (d'après Immuno Stain Handbook).

La révélation des films a lieu quelques jours plus tard. Dans l'obscurité encore, le film est trempé dans la solution révélatrice pendant 4 minutes, puis dans de l'eau pendant 30 secondes, et enfin dans un bain contenant le fixateur durant 4 minutes. Le film est rincé à l'eau de ville avant d'être séché à l'air libre.

Pour quantifier l'intensité des différentes bandes apparues sur le film, nous utilisons un système d'analyse d'images, le système Visage 101 (Millipore, USA). Il est composé principalement d'une caméra haute résolution 1024 x 1024 (Videk) et d'un ordinateur doté entre autres du logiciel Whole Band (Millipore, USA).

Après avoir été calibrée sur une échelle de gris précise, la caméra enregistre l'image du film qu'on lui présente. L'image est traitée par le logiciel qui transforme les différents niveaux de gris (pixels) en densité optique (D.O.).

Nous demandons au logiciel de repérer les bandes sur le gel, de les délimiter, de calculer leur surface et de définir leur niveau de gris. Pour chaque bande, les résultats sont exprimés en D.O. ainsi qu'en I.O.D. (Intégration de la Densité Optique) représentant le produit de la D.O. et de la surface (en mm²) de la bande. Ces données permettent de calculer la proportion de radioactivité présente dans la bande retardée.

7.2.5.B Sur Instantimager

Lorsque le gel a été séché pendant une heure sous vide à 80 °C. Nous l'introduisons dans un appareil qui va analyser la radioactivité émise par le gel. Cet appareil est relié à un ordinateur qui va transformer chaque coup (CPM) venant du gel en pixel. Au fur et à mesure du comptage, nous voyons donc apparaître petit à petit l'image du gel représenté sous forme de pixels.

Lorsque l'image du gel nous paraît suffisante pour être analysée, nous stoppons le comptage. A l'aide de matrices, nous délimitons les bandes sur le gel. Ensuite, à l'aide du programme, nous pouvons quantifier chacune de ces bandes en CPM.

8. ELISA

8.1. Principe

L'ELISA permet de doser quantitativement un constituant biologique grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de celui-ci (Fig 5). Nous avons à notre disposition une plaque multipuits recouverte d'anticorps monoclonaux spécifiques du composé à

doser. Les échantillons contenant le constituant sont déposés dans les puits. Les anticorps vont reconnaître et fixer le composé dans le fond des puits. Tous les autres constituants seront éliminés par lavage.

Ensuite, un anticorps polyclonal également spécifique du composé à doser mais lié lui-même à une enzyme de révélation est ajouté. Après la liaison de ce second anticorps, une solution contenant le substrat chromogène de cette enzyme est déposée dans les puits. La coloration obtenue suite à la réaction enzymatique est proportionnelle à la quantité de composé présent au départ.

Parallèlement, une courbe d'étalonnage est réalisée afin de déterminer la concentration en composé présente dans chaque échantillon.

8.2. ELISA IL-6

8.2.1. Matériels et solutions

8.2.1.A. Pour la stimulation

- IL-1 β ou LPS
- RPMI contenant 0,2 % de HLA (*human lactate albumine*, ???)

8.2.1.B. Pour l'ELISA

Kit (Biosource, California 93012) contenant :

- une plaque multipuits recouverte avec les anticorps monoclonaux spécifiques de l'IL-6 humaines ou murines.
- des fioles contenant le standard lyophilisé pour faire la courbe de calibration
- une fiole de solution contenant le tampon de dilution pour les standards
- une fiole de solution de rinçage à diluer 25 fois dans de l'eau distillée
- une fiole d'anticorps anti-IL-6 conjugués à la biotine
- une fiole de solution contenant la streptavidine-peroxydase
- une fiole de solution contenant le tampon de dilution pour la streptavidine-peroxydase
- une fiole contenant le chromogène (tétraméthylbenzidine, TMB)

-une fiole de solution stop pour arrêter la réaction

8.2.2. Méthode

8.2.2.A. Repiquage

Les cellules sont, dans un premier temps, repiquées à la concentration voulue pour l'expérience, dans du RPMI contenant 0,2 % de HLA. Après les avoir rincées et laissées reposer durant 24 heures, elles sont stimulées dans du milieu RPMI + 0,2 % de HLA contenant de l'IL-1 β ou des LPS en concentration déterminée lors de l'expérience. Le temps de stimulation est également défini lors de l'expérience.

8.2.2.B. Courbe d'étalonnage

Bien que très similaires, les deux ELISA étudiés (ELISA IL-6 humain pour les cellules THP-1(ELISA ultrasensible) et ELISA IL-6 murin pour les cellules J774) comportent différents détails au niveau de la préparation des échantillons de la courbe d'étalonnage.

ELISA IL-6 humain pour les cellules THP-1(ELISA ultrasensible)

Une fiole de solution standard est resuspendue dans du tampon de dilution pour standard afin d'obtenir une concentration finale 310 pg/ml. Ensuite, 50 μ l de cette solution obtenue est ajoutée à 1500 μ l du tampon de dilution pour standard afin d'obtenir une concentration de 10 pg/ml. Une dilution de deux en deux à partir de cette dernière concentration est réalisée. Nous obtenons ainsi une série d'échantillons standards aux concentrations suivantes: 5 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,25 pg/ml, 0,625 pg/ml, 0,312 pg/ml, 0,156 pg/ml.

ELISA IL-6 murin pour les cellules J774

Une fiole de solution standard est resuspendue dans du tampon de dilution pour standard afin d'obtenir une concentration finale de 10000 pg/ml. Ensuite, 100 μ l de cette solution obtenue est ajoutée à 400 μ l du tampon de dilution pour standard afin d'obtenir une concentration de 2000pg/ml. Une dilution de deux en deux à partir de cette dernière concentration est réalisée. Nous obtenons ainsi une série d'échantillons standards aux

concentrations suivantes: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml.

8.2.2.C. ELISA

100 µl de ces standards de concentrations connues sont déposés au fond des puits ainsi que 100 µl d'échantillons. La plaque est recouverte avec un film plastique et laissée à 37 °C durant 1 h30 (kit murin) ou 3 heures (kit humain). Quand le temps est écoulé, les puits sont rincés trois fois avec 200 µl de solution de rinçage en prenant soin de bien enlever tout le liquide se trouvant dans les cupules c'est-à-dire en retournant la plaque et en la frappant sur du papier absorbant.

Ensuite, nous ajoutons 100 µl d'anticorps anti-IL-6 biotinylé dans chaque puits. Après 45 minutes d'incubation à 37 °C, les puits sont rincés trois fois avec 200 µl de solution de rinçage.

L'étape suivante consiste en l'addition de 100 µl de streptavidine-peroxydase diluée 100 fois dans du tampon de dilution pour streptavidine. La plaque est à nouveau recouverte avec un film plastique et placée à température ambiante durant 45 minutes. Ensuite, les puits sont à nouveau rincés trois fois avec 200 µl de solution de rinçage comme précédemment. A ce moment, 100 µl de la solution de révélation (chromogène) sont ajoutés et incubent pendant 20 minutes (pour le kit murin) ou 30 minutes (pour le kit humain) à l'abri de la lumière à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant 100 µl de solution stop dans chaque puits.

Enfin, la densité optique à 450 nm est mesurée grâce à un lecteur de plaque multipuits (Biorad, USA).

8.2.2.D. Mesure de la quantité d'IL-6

A l'aide de la courbe d'étalonnage, on peut calculer la quantité d'IL-6 présent dans chaque échantillon. Afin de tenir compte de la quantité de cellules présentes dans chaque boîte, un dosage de protéines est réalisé.

8.3. ELISA M-CSF

8.3.1. Matériel

Kit (R&D systems, UK) contenant :

- une plaque multipuits recouverte avec les anticorps monoclonaux spécifiques du M-CSF humain.
- des fioles contenant le standard lyophilisé pour faire la courbe de calibration
- une fiole de solution contenant le tampon de dilution pour les standards
- une fiole de solution contenant le tampon de dilution pour les échantillons
- une fiole de solution de rinçage à diluer 25 fois dans de l'eau distillée
- une fiole d'anticorps anti-M-CSF conjugués à la peroxydase
- une fiole contenant le réactif A (H_2O_2) et de réactif B (TMB)
- une fiole de solution stop pour arrêter la réaction

8.3.2. Méthode

8.2.2.A. Repiquage

Les cellules sont, dans un premier temps, repiquées à la concentration voulue pour l'expérience, dans du RPMI contenant 0,2 % de HLA. Après les avoir rincées et laissées reposer durant 24 heures, elles sont stimulées dans du milieu RPMI + 0,2 % de HLA contenant de l'IL-1 β ou des LPS en concentration déterminée lors de l'expérience. Le temps de stimulation est également défini lors de l'expérience.

8.3.2.B. Courbe d'étalonnage

Une fiole de solution standard est resuspendue dans du tampon de dilution pour standard afin d'obtenir une concentration finale 2000 pg/ml. La reconstitution prend 15 minutes au cours desquelles on agite régulièrement. Ensuite, nous procédons à une dilution de deux en deux à partir du standard 2000 pg/ml de manière à obtenir les

concentrations suivantes: : 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml.

8.3.2.C. ELISA

100 μ l de ces standards de concentrations connues sont déposés au fond des puits ainsi que 100 μ l d'échantillons. La plaque est recouverte avec un film plastique et laissée à température ambiante durant 90 minutes. Quand le temps est écoulé, les puits sont rincés quatre fois avec 200 μ l de solution de rinçage en prenant soin de bien enlever tout le liquide se trouvant dans les cupules c'est-à-dire en retournant la plaque et en la frappant sur du papier absorbant.

Ensuite, nous ajoutons 200 μ l d'anticorps anti-M-CSF couplé à la peroxydase dans chaque puits. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante, les puits sont rincés quatre fois avec 200 μ l de solution de rinçage.

L'étape suivante consiste en l'addition de 200 μ l de solution de révélation (préparée en mélangeant en quantité égale la solution A et la solution B). La plaque est à nouveau recouverte avec un film plastique et placée à température ambiante durant 20 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée en ajoutant 50 μ l de solution stop dans chaque puits.

Enfin, la densité optique à 450 nm est mesurée grâce à un lecteur de plaque multipuits (Biorad, USA).

8.3.2.D. Mesure de la quantité de M-CSF

A l'aide de la courbe d'étalonnage, on peut calculer la quantité de M-CSF présent dans chaque échantillon. Afin de tenir compte de la quantité de cellules présentes dans chaque boîte, un dosage de protéines est réalisé.

RESULTATS
et DISCUSSIONS

EFFET DE DIVERSES PREPARATIONS DE LDL SUR L'ACTIVATION DES MONOCYTES/MACROPHAGES HUMAINS ET MURINS

1. Les modèles cellulaires

1.1. Les cellules humaines THP-1

La lignée de cellules monocytaires THP-1 utilisée lors de nos expériences est dérivée du sang périphérique d'un garçon âgé d'un an et souffrant d'une leucémie monocytique aiguë. Ces cellules croissent en suspension dans le milieu et de ce fait sont difficiles à mettre au point au microscope (Fig 1). On constate également qu'elles s'agrègent en petits amas.

1.1.1. Différenciation des monocytes THP-1 en macrophages

Nous avons étudié la différenciation de ces monocytes THP-1 en macrophages. Cette différenciation a été induite de différentes manières. Dans un premier temps, elle a été réalisée par adhérence induite sur gélatine, méthode classiquement utilisée pour des monocytes frais. Cependant, cette technique a été abandonnée car le rendement de différenciation n'était pas satisfaisant. En effet, à partir de $15 \cdot 10^6$ cellules au départ, nous n'avons obtenu que $2 \cdot 10^6$ cellules adhérentes.

Nous avons ensuite essayé de différencier les cellules à l'aide d'esters de phorbol, largement utilisés comme agents différenciateurs pour diverses lignées de cellules monocytaires. En général, c'est le PMA (phorbol myristate acétate) qui est utilisé dans ce but. Mais, étant donné que le but du mémoire est d'étudier l'activation des monocytes/ macrophages, et en particulier l'activation du facteur NF- κ B et sachant que le PMA est reconnu pour activer ce facteur transcriptionnel, nous avons d'abord essayé le phorbol dibutyrate. Cet analogue, plus soluble dans l'eau que le PMA, a l'avantage de s'éliminer plus facilement lors des rinçages. Il risque donc moins d'élever l'activité constitutive de NF- κ B chez les macrophages. Nous reviendrons sur ce point au paragraphe 1.2.1.A.. Cependant, lorsque nous incubons ensuite les cellules macrophagiques avec différentes préparations de LDL, elles perdent leur aspect macrophagique. Cette technique a donc également été abandonnée.

Nous avons donc utilisé comme agent de différenciation des monocytes, le phorbol myristate acétate (PMA), largement utilisé dans la littérature comme facteur de

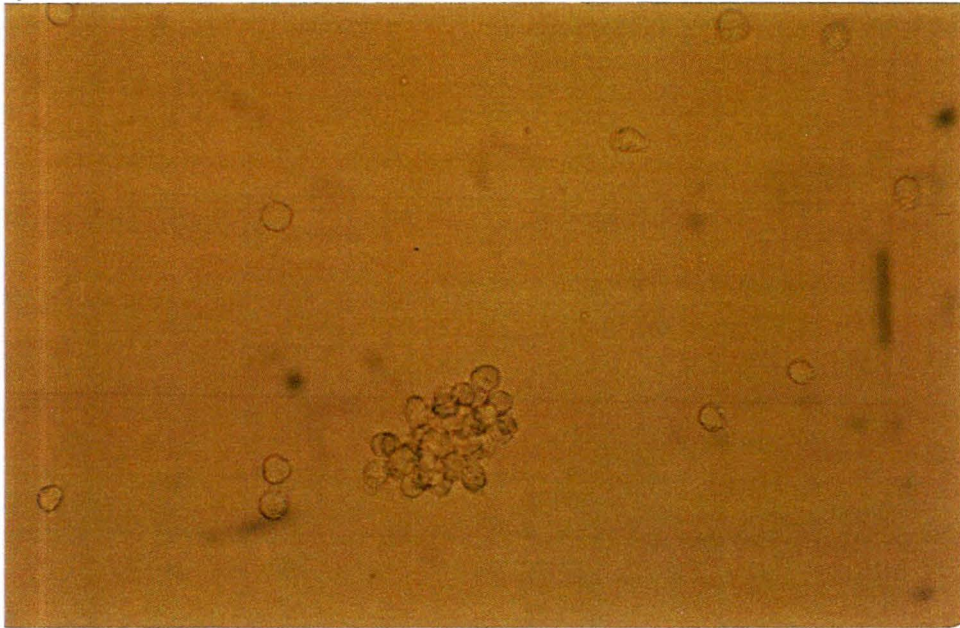


Fig 1 Micrographie en contraste de phase de monocytes THP-1 en culture (X 288)

différenciation *in vitro*. Afin de vérifier si la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages avec le PMA est bien définitive, nous l'avons suivie au microscope pendant 24 heures (Fig 2).

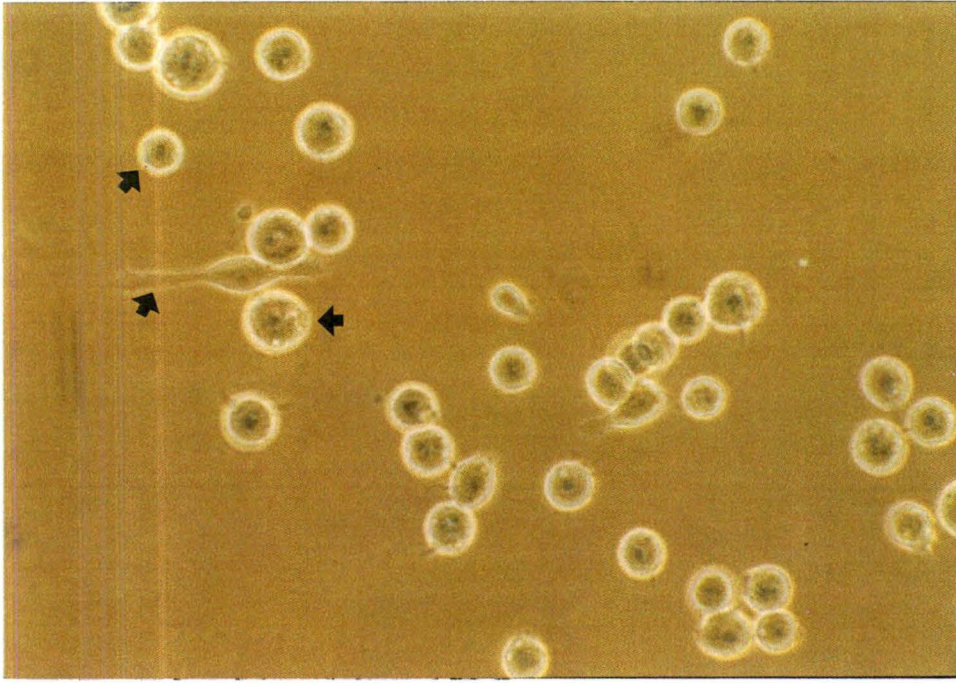
Durant les deux premières heures suivant la mise en incubation avec le PMA 0,3 μM , nous n'observons pas de modifications importantes dans la morphologie. Les cellules restent en suspension. Ensuite, après 4 heures, quelques cellules commencent à adhérer dans le fond de la boîte, mais ces cellules restent toujours arrondies. Ce n'est que 6 heures après le début de l'incubation que nous pouvons observer certaines cellules émettant de fins prolongements (Fig 2A). Au cours des temps, les cellules sont de plus en plus nombreuses à adhérer et prennent de plus en plus une morphologie de type macrophagique. Enfin, après 24 heures d'incubation, la plupart des cellules ont pris un aspect macrophagique évident (Fig 2B). Certaines cellules développent des prolongements cytoplasmiques, qui évoquent les cellules dendritiques.

1.1.2. Différenciation des macrophages en cellules spumeuses

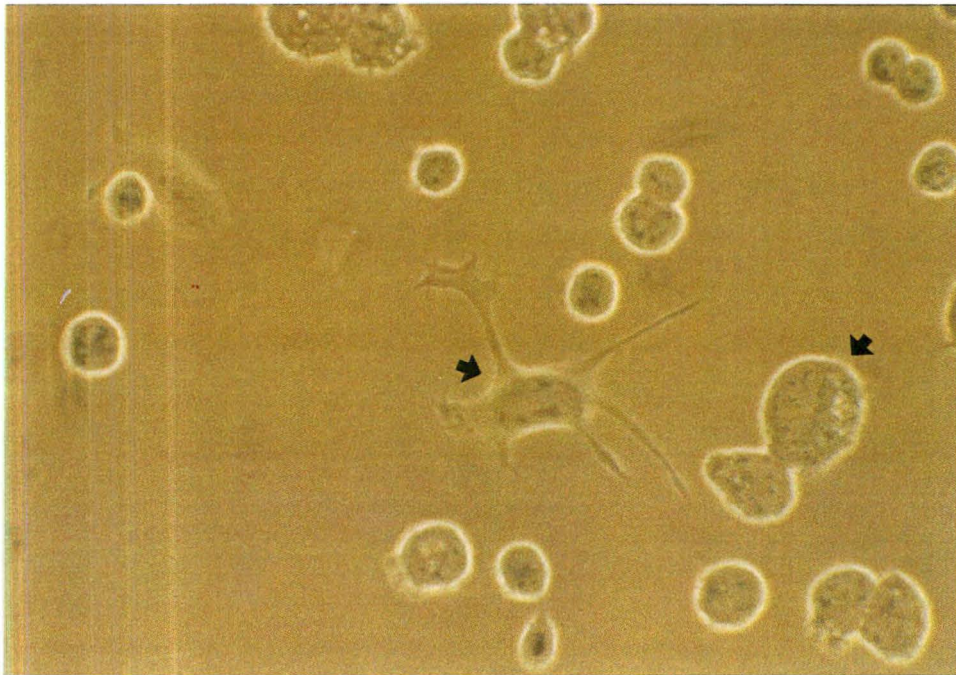
Contrairement aux monocytes qui en sont incapables, les macrophages, mis en présence de LDL fortement modifiées, se différencient en cellules spumeuses suite à une accumulation excessive de lipides. La manière la plus simple de s'assurer que les monocytes THP-1 se sont bien différenciés en macrophages suite à une incubation de 24 heures en présence de PMA, est donc de voir si la différenciation de ces macrophages en cellules spumeuses est possible.

Pratiquement, les monocytes THP-1 sont différenciés en macrophages suite à une incubation de 24 heures dans 0,3 μM de PMA. Ensuite, le milieu contenant le PMA est décanté et remplacé par du milieu contenant soit 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDL fortement oxydées (oxLDL) ou de LDL modifiées dans la partie protéique (MDA-LDL), pour une durée de 24 heures. En effet, nous avons vu que lorsque les LDL sont fortement oxydées dans la partie protéique, elles ne sont plus reconnues par le récepteur aux LDL natives, mais par un autre récepteur, le récepteur *scavenger*, présent sur les macrophages mais pas sur les monocytes (voir point 4.5.2.B. de l'introduction). Ce récepteur n'est pas capable, comme le récepteur aux LDL natives, de réguler l'entrée de cholestérol dans la cellule. Les MDA-LDL et oxLDL vont donc s'accumuler dans les cellules qui deviennent des cellules spumeuses.

De fait, nous pouvons observer sur les photos (Fig 3) qu'après 24 heures d'incubation en présence de MDA-LDL (Fig 3C) et de oxLDL (Fig 3D) à 50 $\mu\text{g/ml}$, les cellules se chargent de lipides (coloration rouge à l'Oil Red O) par l'intermédiaire de



(A)



(B)

Fig 2

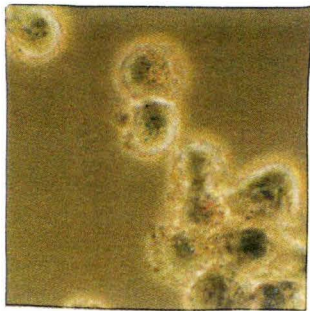
Evolution morphologique des cellules THP-1 incubées avec du PMA 0,3 μM pendant 6 heures (A) et 24 heures (B), ce qui les différencie progressivement en macrophages (flèches) (X460)



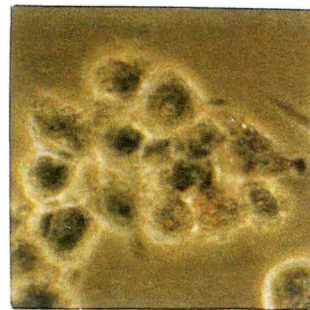
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig 3

Micrographies en contraste de phase de cellules macrophagique THP-1 non traitées (A), traitées pendant 24 heures avec des LDL natives (B), avec des MDA-LDL (C) et des oxLDL (D), à raison de 50 $\mu\text{g/ml}$. Les cellules ont été colorées à l'Oil Red O (X 400)

leur récepteur *scavenger*. Tandis que les cellules incubées durant 24 heures avec 50 µg/ml de LDL natives (Fig 3B) ou incubées en l'absence de LDL (Fig 3A) ne montrent qu'une coloration faible des lipides à l'Oil Red O. Elles ne sont donc pas différenciées en cellules spumeuses. Les photographies ont été prises en contraste de phase, pour pouvoir distinguer les cellules. De ce fait, la coloration à l'Oil Red O est estompée. Quand on examine les cellules en fond clair, les gouttelettes lipidiques apparaissent nettement en rouge mais sans aucun autre détail cellulaire.

Nous pouvons donc conclure que les monocytes THP-1 mis en présence de PMA 0,3 µM pendant 24 heures, se différencient bien en macrophages puisqu'ils possèdent le récepteur *scavenger* capable de les transformer en cellules spumeuses en présence de MDA-LDL et oxLDL. De plus, étant donné que les macrophages THP-1 peuvent être différenciés en cellules spumeuses *in vitro* comme dans le cas *in vivo* de la pathologie, elles se révèlent être un bon modèle pour l'étude de l'athérosclérose.

1.2. Les cellules murines macrophagiques J774

Les cellules murines macrophagiques nous ont été aimablement fournies par la KUL. En culture, ce sont des cellules arrondies et adhérentes (Fig 4).

Ces cellules macrophagiques J774 se sont avérées être aussi un modèle cellulaire adéquat pour l'étude de l'athérosclérose. En effet, après une incubation de 24 heures dans du milieu contenant 10 µg/ml de MDA-LDL, Holvoet et ses collaborateurs (1995) ont montré que les cellules J774 se différencient également en cellules spumeuses.

Les modèles cellulaires fixés, il nous reste, avant de tester les différentes préparations de LDL, de trouver des conditions activant effectivement les cellules THP-1 et J774: c'est ce que nous avons appelé les contrôles positifs d'activation cellulaire.

1.2. Discussion

Dans un premier temps, nous avons testé la différenciation en macrophages des monocytes humains THP-1 à l'aide de PMA 0,3 µM. Nous avons ensuite suivi cette différenciation durant 24 heures en observant les changements morphologiques que subissaient les cellules.

Nous avons ainsi constaté une adhérence des cellules à la boîte de culture, une augmentation de leur taille et la formation de prolongements cytoplasmiques. Afin de

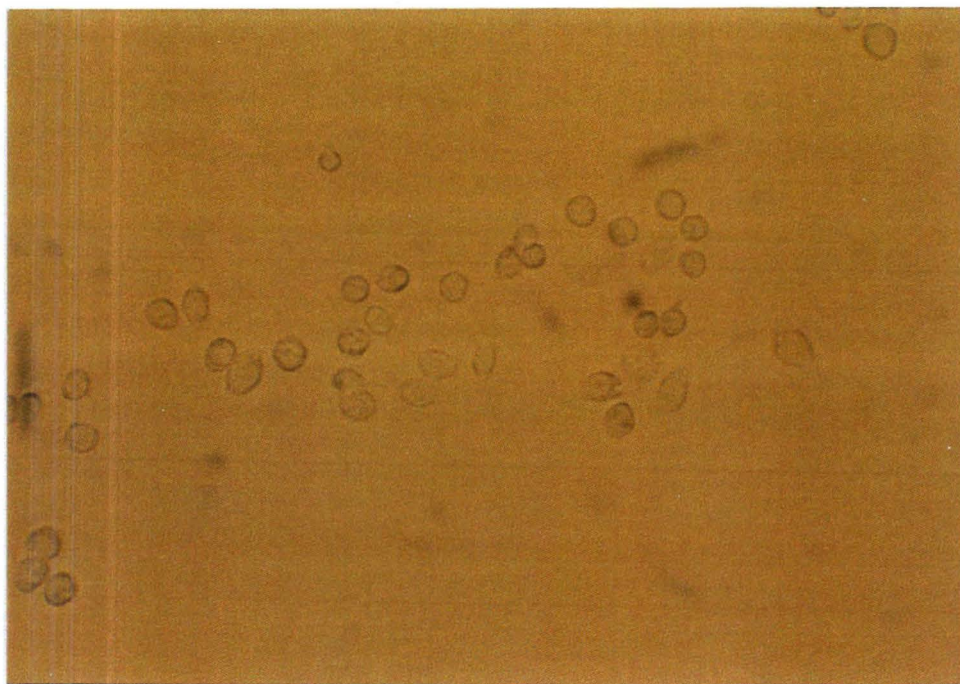


Fig 4 Micrographie en contraste de phase de macrophages murins J774 en culture (X 288)

vérifier si les cellules obtenues après 24 heures de différenciation étaient bien des cellules macrophagiques, nous avons testé la présence d'un récepteur présent uniquement sur les macrophages. Pour cela, nous avons choisi le récepteur *scavenger* car il joue également un rôle dans l'athérogenèse. En effet, ce récepteur est capable de lier des LDL modifiées dans la partie protéique et de les accumuler dans son cytoplasme sans être régulé, comme l'est le récepteur aux LDL natives (présent sur les monocytes et les macrophages). De fait, après 24 heures d'incubation avec des LDL modifiées dans la partie protéique, les macrophages THP-1 se transforment en cellules spumeuses.

La formation de cellules spumeuses à partir de monocytes THP-1 avait déjà été étudiée par Banka et ses collaborateurs en 1991. Ces chercheurs ont suivi dans un premier temps la croissance de la lignée cellulaire THP-1 incubées durant 7 jours dans du PMA 10^{-7} M et ont démontré ainsi que la quantité de μg d'ADN ne variait pas durant les 7 jours. Ensuite, ils ont démontré l'endocytose de LDL acétylées par les macrophages THP-1, en suivant l'incorporation par ces macrophages de ^{14}C acétate contenu dans les LDL acétylées, préalablement marquées au ^{14}C . Ils ont ainsi pu démontrer qu'il y avait une forte incorporation de LDL acétylées par les macrophages par rapport à l'incorporation de LDL non acétylées. Ces auteurs en concluent que les monocytes THP-1 différenciés en macrophages étaient capables de se transformer en cellules spumeuses.

D'autres chercheurs (Via et al., 1989) ont également montré une augmentation de l'expression du récepteur *scavenger* par un ester de phorbol chez les monocytes humains THP-1.

Au niveau du modèle cellulaire murin, les macrophages J774 se sont avérés être également un modèle adéquat pour l'étude de l'athérogenèse. En effet, elles répondent bien à une incubation en présence de LDL modifiées dans la partie protéique, en se transformant en cellules spumeuses (Holvoet, 1995). Par contre, elles restent des cellules macrophagiques normales en présence de N-LDL. Ces LDL étudiées étaient préparées de la même manière que les LDL que nous avons utilisées sur les macrophages THP-1.

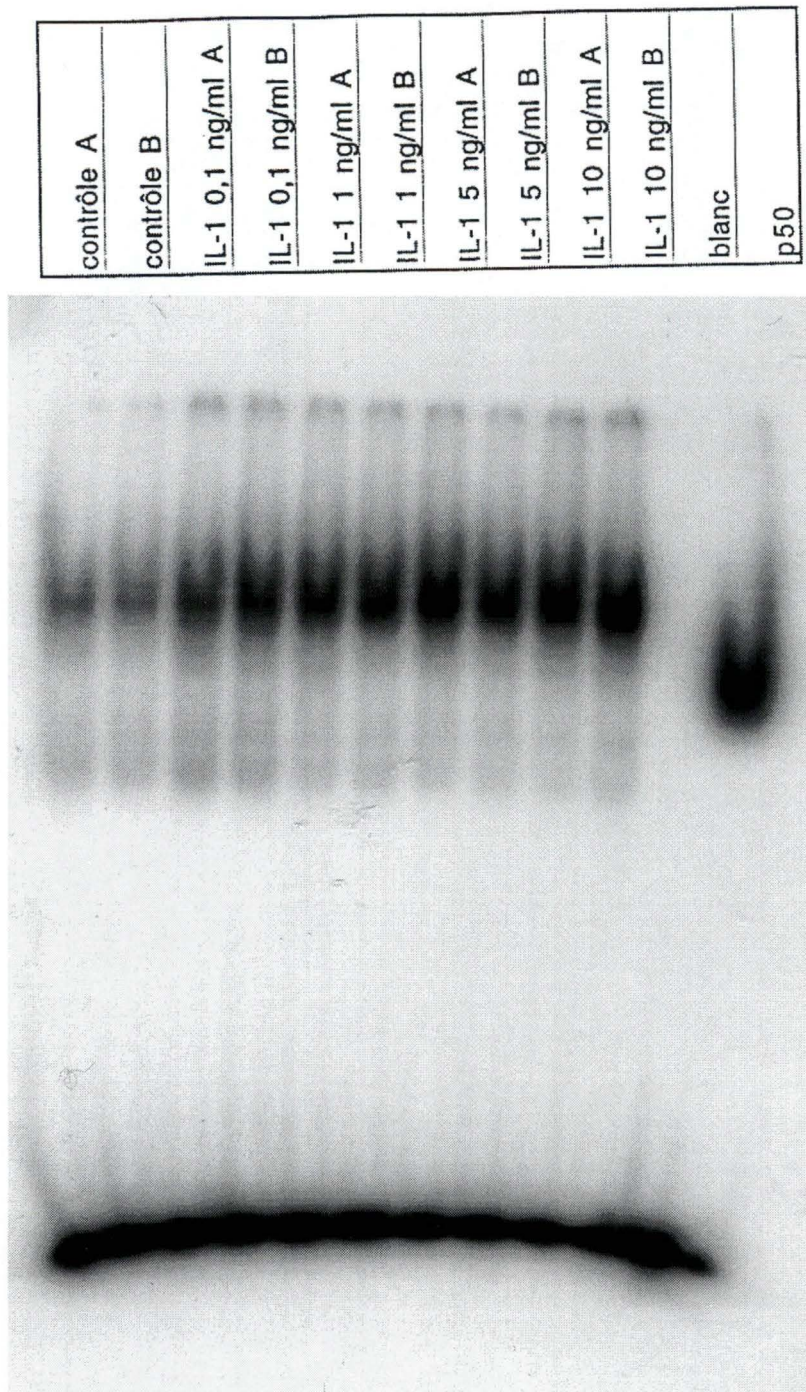


Fig 5 Effet de concentrations croissantes en IL-1 sur l'activation du facteur NF- κ B dans les monocytes THP-1. Ces cellules ont été incubées 30 minutes avec 0,1 ; 1 ; 5 et 10 ng/ml d'IL-1. L'activation de NF- κ B a été déterminée par retard sur gel, le gel ayant été exposé à un film autoradiographique. Le blanc correspond à un échantillon contenant l'oligonucléotide, mais pas de protéines cellulaires. p50 correspond au dimère p50/p50 purifié, mis en présence de l'oligonucléotide et démontre la spécificité de la liaison oligonucléotide-NF- κ B. On a déposé 25 μ g de protéines pour chaque piste.

2. Recherche de contrôles positifs pour l'étude de l'activation des monocytes/macrophages, par l'utilisation d'IL-1 β et de LPS

Dans le cadre de ce travail, nous voulons étudier l'activation des macrophages (THP-1 et J774) stimulés avec différentes préparations de LDL. Deux méthodes seront utilisées afin de détecter s'il y a eu activation ou non sur les deux types cellulaires. La première méthode (point 2.1.), le retard sur gel ou EMSA, analyse directement l'activation d'un facteur transcriptionnel, dans notre cas, le facteur NF- κ B. Tandis que la seconde, l'ELISA, détecte l'activation cellulaire via la production de certaines cytokines (point 2.2.). Nous avons choisi l'IL-1 β et l'IL-6, produites par les monocytes/macrophages *in vivo* et toutes deux sont sous le contrôle du facteur NF- κ B, même si les promoteurs des deux gènes correspondants possèdent également des sites de liaison pour d'autres facteurs transcriptionnels.

Pour stimuler les monocytes /macrophages, nous avons choisi la cytokine IL-1 β ainsi que des LPS, reconnus comme activateurs des cellules *in vitro*.

2.1. L'activation du facteur de transcription NF- κ B

Le but de cette expérience est de mettre au point des conditions d'activation du facteur NF- κ B dans les différentes cellules étudiées (les monocytes/macrophages THP-1 et les macrophages J774). Pour ce faire, nous avons stimulé ces cellules avec des concentrations croissantes en molécules qui sont reconnues capables d'activer NF- κ B, à savoir l'interleukine 1 β (IL-1 β) et les lipopolysaccharides (LPS). L'activation du facteur NF- κ B est déterminée par la méthode de retard sur gel ou EMSA, c'est-à-dire en évaluant sa capacité à complexer un oligo-nucléotide double brin, reproduisant la séquence cible présente au niveau des promoteurs qu'il contrôle.

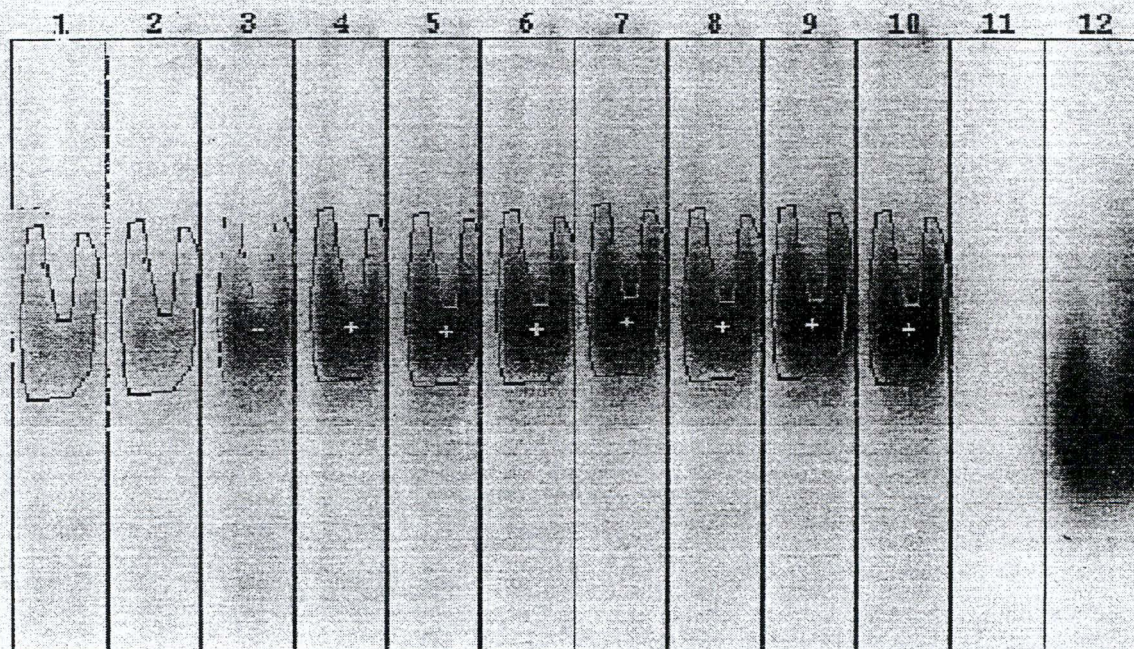


Fig 6 Analyse de l'image du film autoradiographique de la figure 5 par le système Visage 101. Pour chaque piste, le logiciel calcule la IOD pour la bande retardée, c'est-à-dire le produit de la DO par la surface.

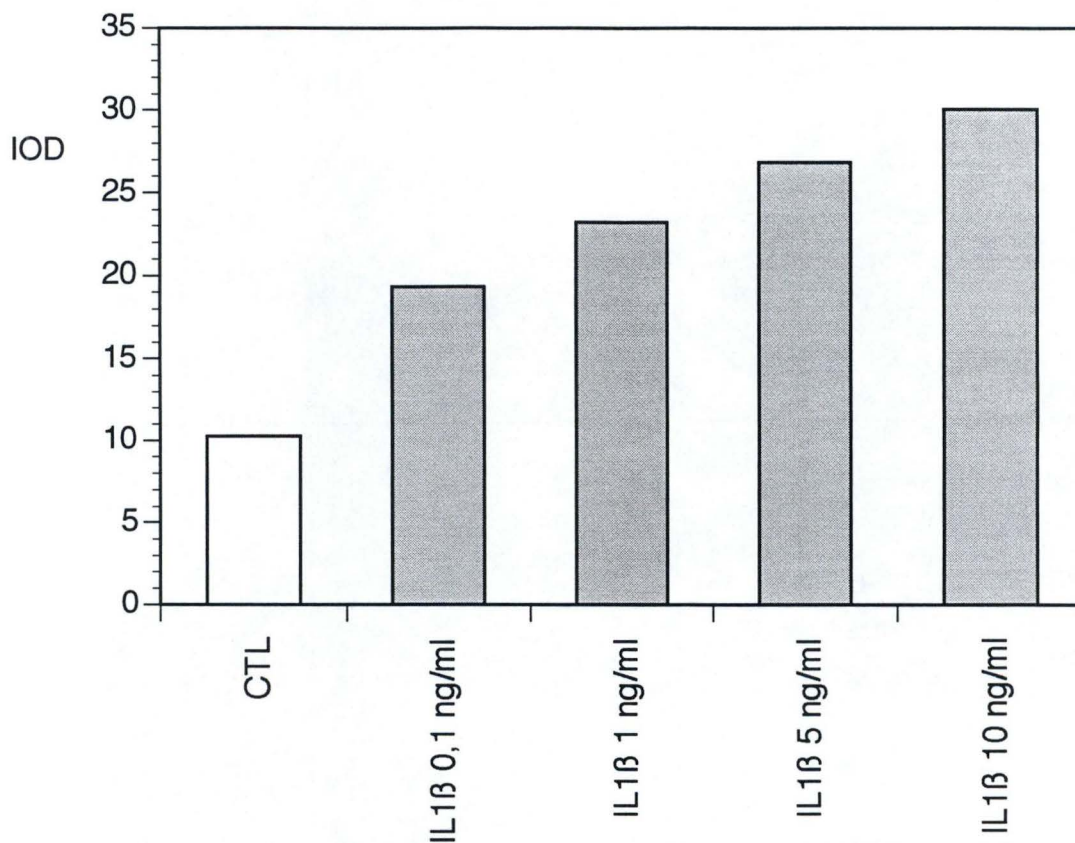


Fig 7 Effet sur l'activation du facteur NF- κ B dans la stimulation des monocytes THP-1 avec de l'IL1 β (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml et 10 ng/ml) durant 30 minutes. Les résultats correspondent au film autoradiographique de la Fig 5, analysée par les système Visage 101 (Fig 6), et sont donc exprimés en IOD (*integrated optical density*). Chaque colonne représente la moyenne de deux bandes correspondant au même traitement, du gel représenté à la Fig 5.

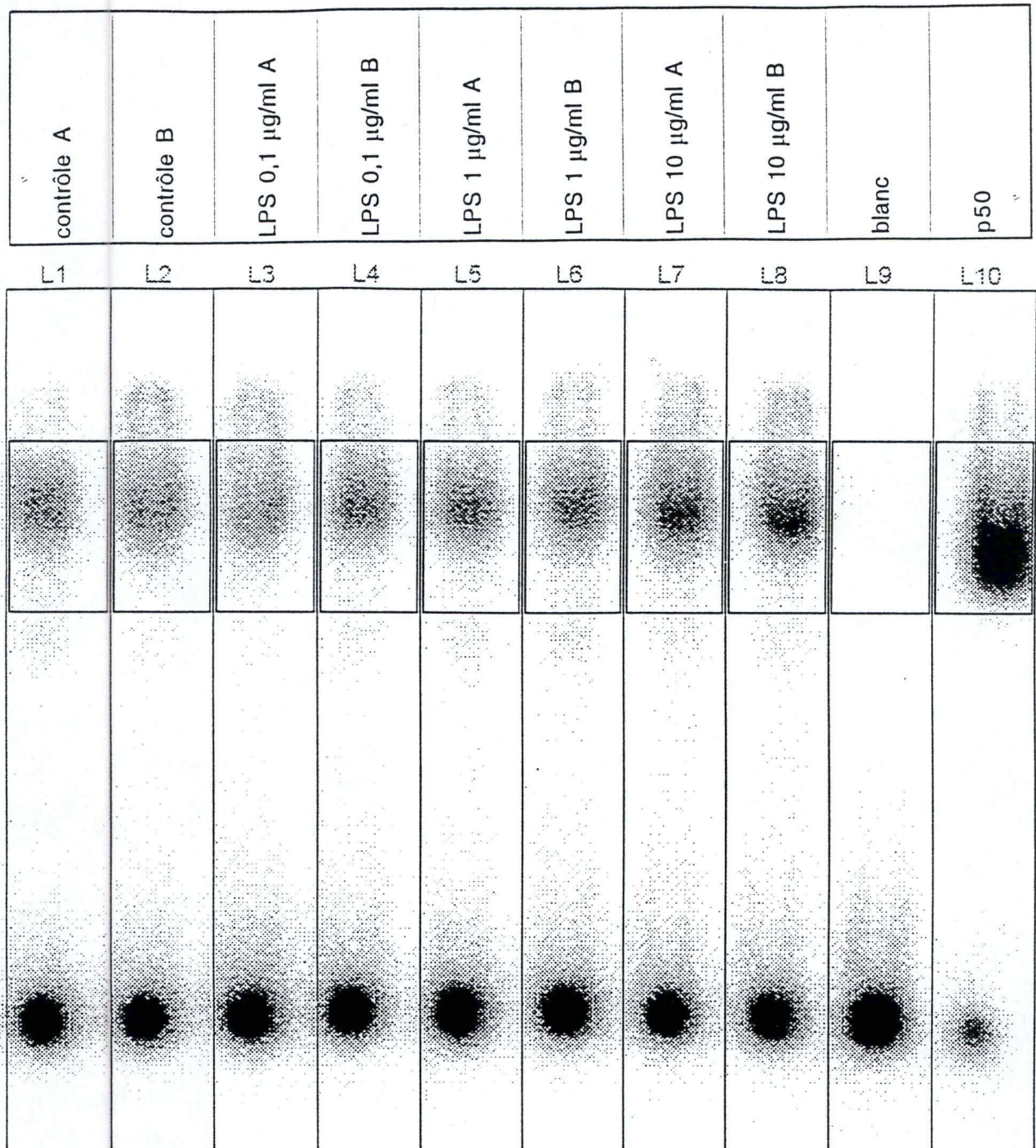


Fig 8

Effet de concentrations croissantes en LPS sur l'activation du facteur NF- κ B dans les monocytes THP-1. Les cellules ont été incubées 1 heure avec 0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. L'activation de NF- κ B a été déterminée par retard sur gel, le gel ayant été introduit dans un appareil, l'Instant Imager, transformant chaque coup (CPM) venant du gel en pixels et quantifiant chaque bande retardée en CPM. Le blanc correspond à un échantillon contenant l'oligonucléotide, mais pas de protéines cellulaires. p50 correspond au dimère p50/p50 purifié, mis en présence de l'oligonucléotide et démontre la spécificité de la liaison oligonucléotide-NF- κ B. On a déposé 25 μg de protéines pour chaque piste.

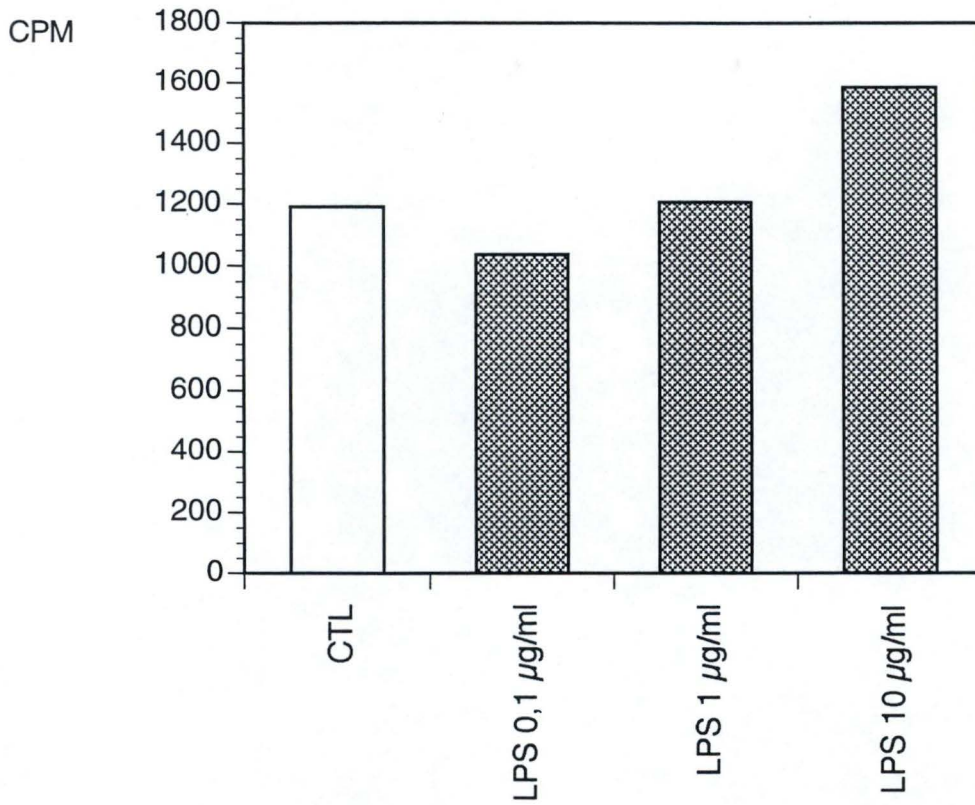


Fig 9 Effet sur la stimulation du facteur NF- κ B dans la stimulation des monocytes THP-1 avec des LPS (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) durant 1 heure. Les résultats ont été obtenus par comptage direct des gels de retard et sont donc exprimés en CPM. Les test ayant été réalisés en double, chaque colonne représente donc la moyenne de deux tests. Enfin, chaque échantillon analysé correspond à 25 μ g de protéines.

2.1.1. Les cellules THP-1

2.1.1.A. Sous forme de monocytes

Stimulation avec l'interleukine 1 β

Nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'IL-1 β sur l'activation du facteur NF- κ B dans les monocytes THP-1. Différentes concentrations (0,1 ng/ml; 1 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml) ont été testées sur les cellules durant 30 minutes d'incubation. Après avoir fait migrer les protéines extraites des cellules, selon la technique de l'EMSA, le gel a été séché et déposé sur un film autoradiographique. Quelques jours plus tard, ce film est révélé (Fig 5). Un système d'analyse d'image, le système Visage 101 reproduit alors l'image du film autoradiographique à l'aide d'une caméra (Fig 6). Ensuite, un logiciel adéquat permet de quantifier chaque bande en IOD (*integrated optical density*=densité optique X surface de la bande marquée). Les résultats chiffrés peuvent être ensuite portés en graphique (Fig 7). L'analyse du graphe montre un bel effet dose-dépendant de l'activation des monocytes THP-1 avec des concentrations croissantes en IL-1 β . En effet, on observe une augmentation de la quantité de facteur NF- κ B activé en fonction de la concentration en IL-1 β utilisée. A 10 ng/ml, on observe environ trois fois plus d'activation du facteur NF- κ B que pour les cellules contrôles.

Stimulation avec des lipopolysaccharides

Nous avons testé également un deuxième type d'activateur, les lipopolysaccharides, reconnus comme étant activateurs de NF- κ B. La stimulation a duré 1 heure et, comme dans le cas de l'IL-1 β , nous avons testé différentes concentrations: 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml et 10 μ g/ml. Après extraction puis migration des protéines sur gel (EMSA), nous avons introduit celui-ci dans un appareil capable d'analyser la radioactivité émise par ce gel. Cet appareil, l'Instant Imager, est relié à un ordinateur. Au fur et à mesure du comptage, nous voyons donc apparaître petit à petit sur écran, l'image du gel représenté sous forme de pixels (Fig 8). L'Instant Imager possède également un logiciel capable de quantifier chaque bande retardée en CPM.

Après avoir reporté les résultats sur graphe, nous constatons (Fig 9) que nous obtenons aussi un effet dose-dépendant de l'activation du facteur de transcription NF- κ B en fonction des concentrations croissantes en LPS. Cependant, il faut noter que au

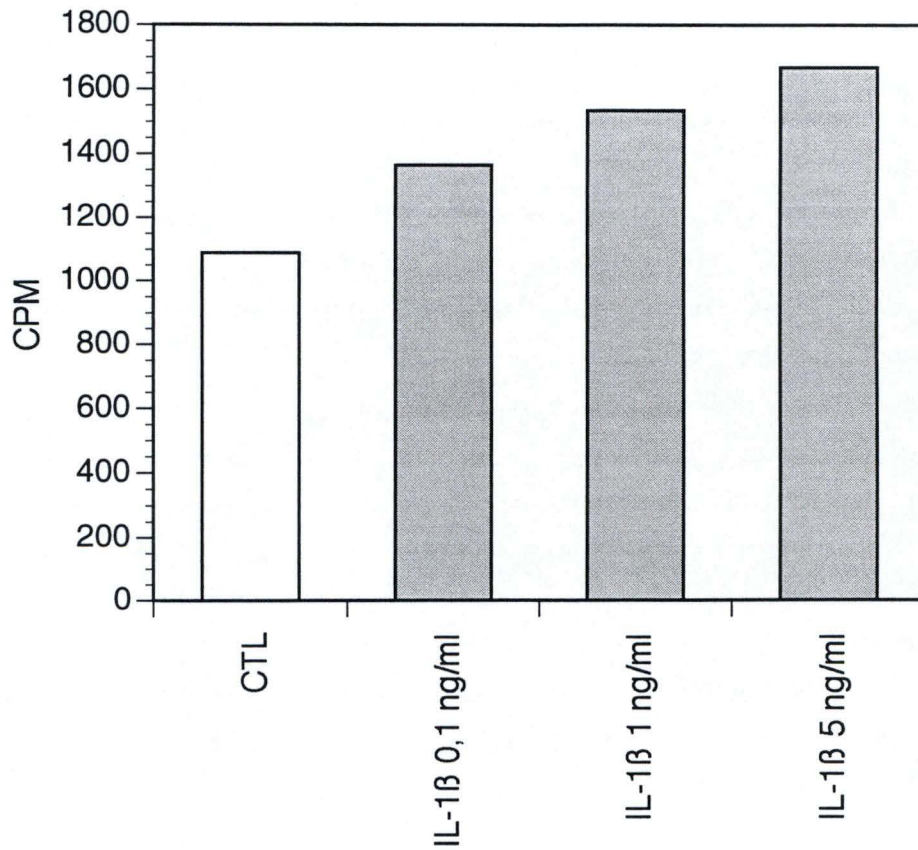


Fig 10 Effet de l'IL-1 β sur l'activation du facteur NF- κ B pour les cellules macrophagiques THP-1. Les cellules, après différenciation avec le PMA 0,3 μ M pendant 24 heures et après une mise au repos de 24 heures, sont stimulées avec de l'IL-1 β (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml) durant 30 minutes . Les gels de retard ont été analysés via l'Instant Imager, les résultats sont donc exprimés en CPM. Chaque colonne correspond à la moyenne de deux échantillons correspondant à 25 μ g de protéines.

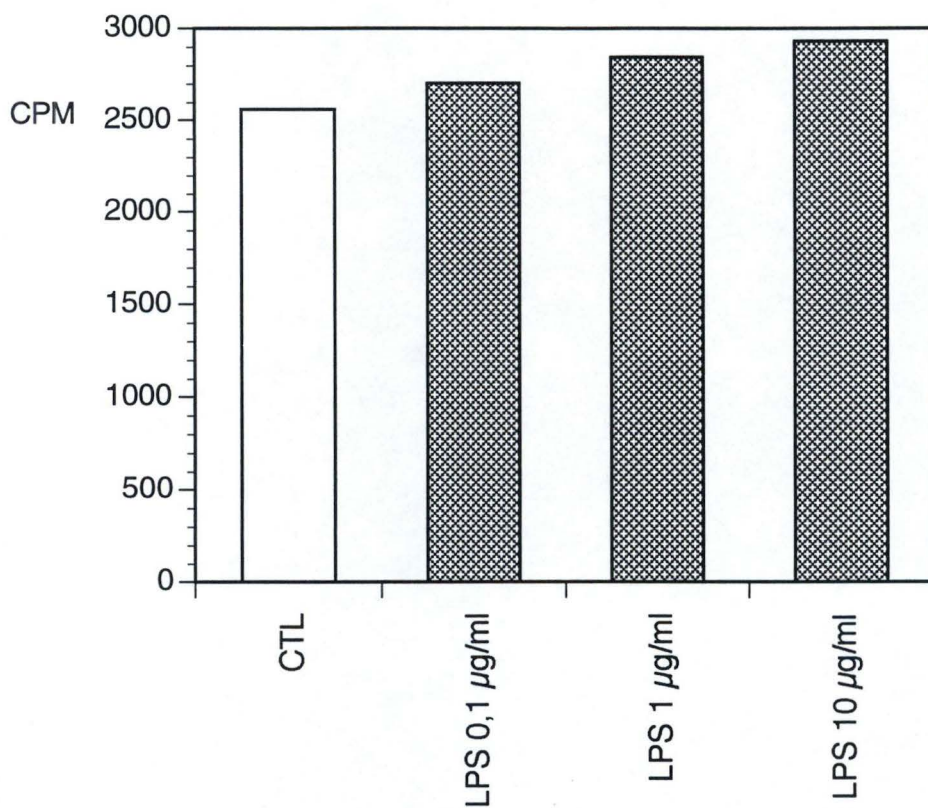


Fig 11 Effet sur l'activation du facteur NF- κ B de la stimulation des macrophages THP-1 avec différentes concentrations en LPS (0,1 μ g/ml; 1 μ g/ml; 10 μ g/ml). Les gels retard ont été analysés par l'Instant Imager et les résultats ont donc été exprimés en CPM. Chaque colonne correspond à la moyenne de deux échantillons déposés sur le gel et chaque échantillon correspond à 25 μ g de protéines.

niveau des contrôles, c'est-à-dire pour les cellules non stimulées, l'activation de NF- κ B est anormalement élevée. Cette activation résulte probablement d'un problème apparu lors de la manipulation des cellules contrôles.

2.1.1.B. Sous forme macrophagique

Stimulation avec l'interleukine 1 β

Après avoir mis les monocytes THP-1 en présence de PMA 0,3 μ M durant 24 heures pour les différencier en macrophages, nous avons voulu vérifier si le facteur NF- κ B de ces macrophages peut toujours bien être activé. Ces cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec différentes concentrations en IL-1 β : 0,1 ng/ml; 1 ng/ml; 5 ng/ml. Les résultats ont été analysés à l'aide de l'Instant Imager.

Nous constatons que nous obtenons toujours un bel effet dose dépendant de l'activation du facteur NF- κ B en fonction de la concentration en IL-1 β utilisée (Fig 10). Il faut cependant remarquer que les valeurs contrôles, correspondant aux macrophages non stimulés, sont fort élevées, ce qui révèle la présence d'une activation basale de NF- κ B importante dans les cellules macrophagiques THP-1. Cette activation constitutive présente dans les cellules macrophagiques n'est pas surprenante. En effet, de nombreux articles en ont fait également état. Nous l'avons également constatée de manière reproductible.

Stimulation avec des lipopolysaccharides

Nous avons également stimulé les macrophages THP-1 avec des LPS à diverses concentrations (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml et 10 μ g/ml). Cette stimulation a duré 1 heure. Après analyse du graphe (Fig 11), nous ne constatons qu'une très faible augmentation de l'activation du facteur NF- κ B par rapport aux cellules non stimulées, ainsi qu'une activation constitutive pour les cellules non stimulées fort élevée.

Tentatives de diminution de l'activation constitutive des macrophages

L'activation constitutive élevée de NF- κ B constatée chez les macrophages THP-1 peut poser un problème pour la suite du mémoire, dans le sens où nous souhaitons tester les effets de diverses préparations de LDL sur l'activation de NF- κ B, tant constitutive qu'induite. Dans le cas où certaines LDL auraient un effet activateur, cet

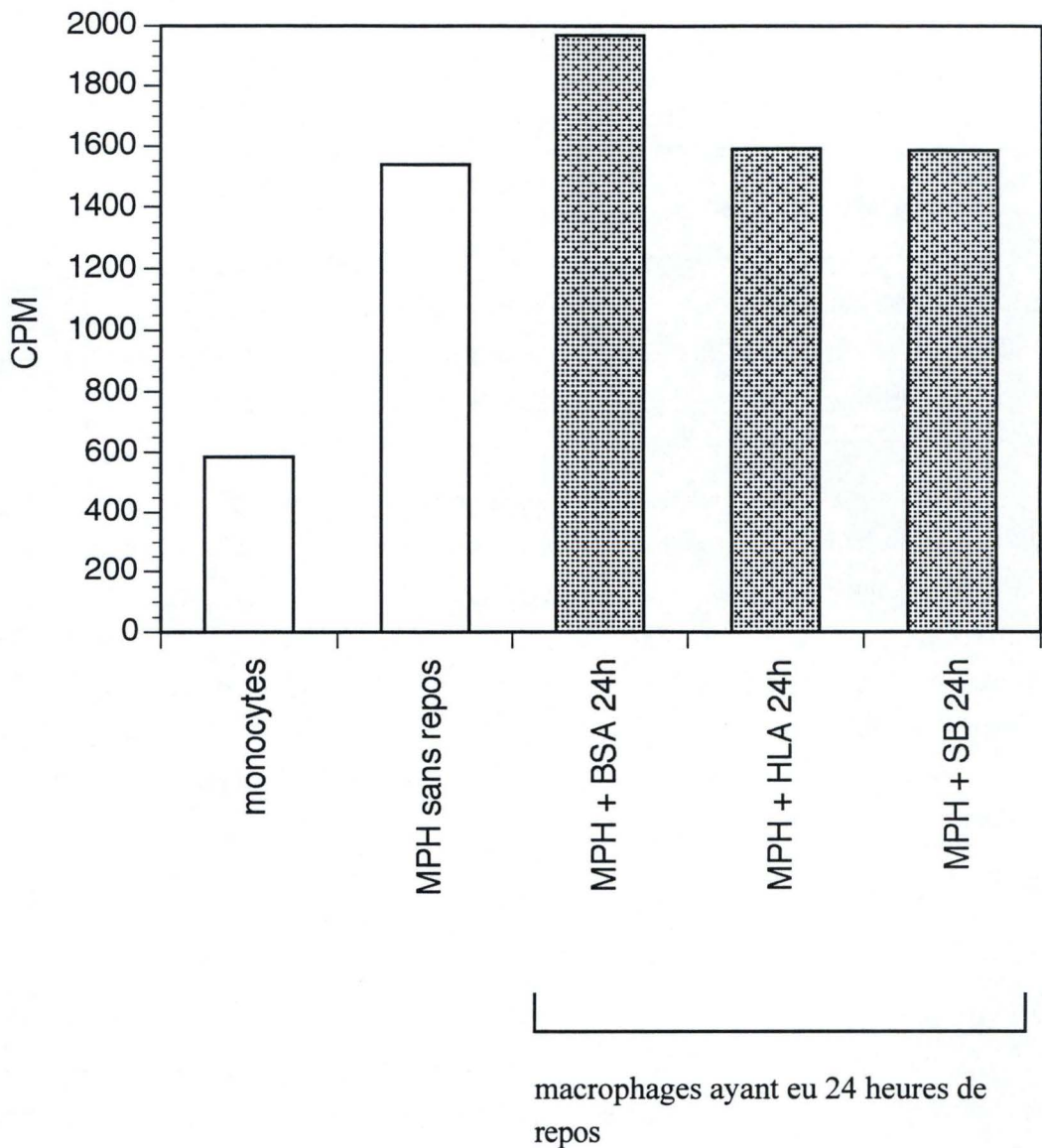


Fig 12 A Effet de la composition du milieu de repos sur l'activité constitutive de NF- κ B dans les macrophages THP-1. Les monocytes THP-1 ont été différenciés dans un milieu contenant du sérum à 10 % et du PMA 0,3 μ M durant 24 heures. La différenciation est suivie d'une incubation de 24 heures dans du milieu de repos contenant, soit 0,1% de BSA (albumine bovine), soit 0,2% de HLA, soit 0,1% de sérum (SB). Chaque test a été réalisé en simple. Les résultats ont été obtenus par comptage direct des gels de retard et sont donc exprimés en CPM. Chaque échantillon analysé correspond à 15 μ g de protéines.

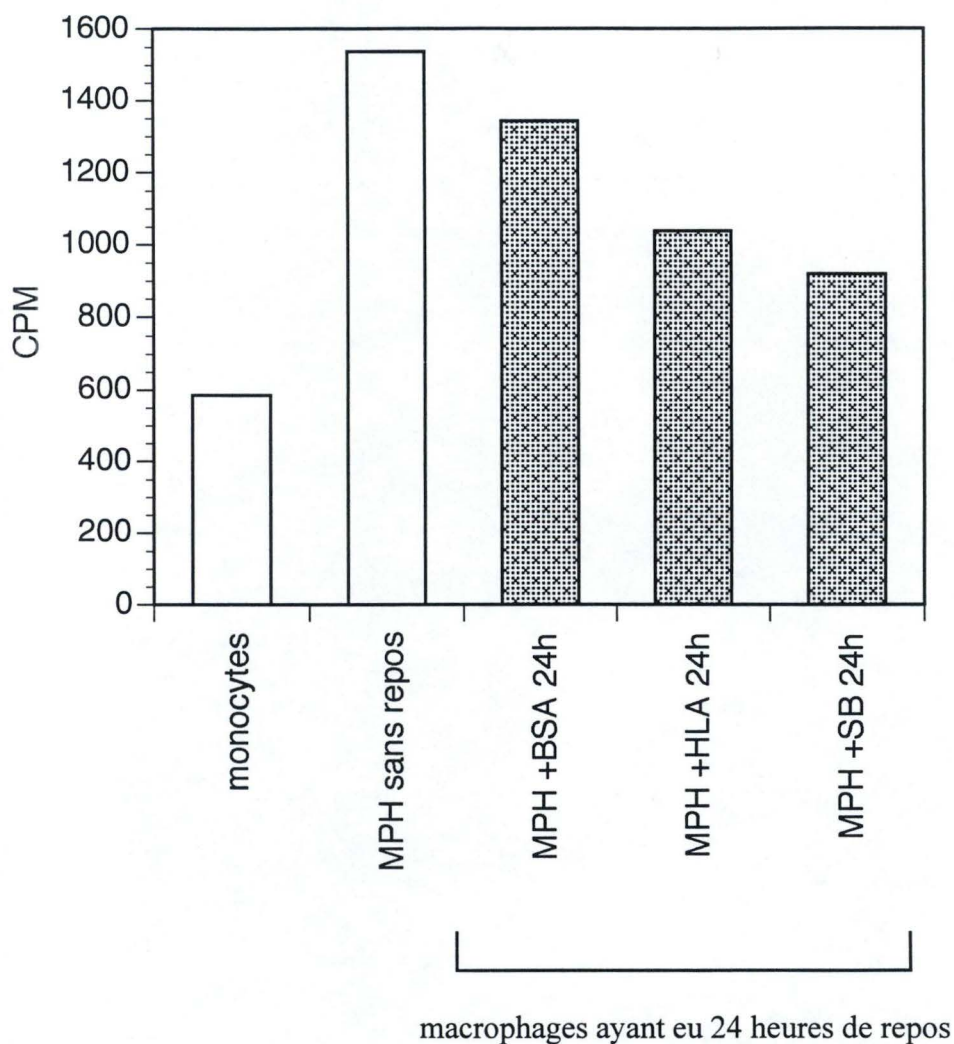


Fig 12 B Effet de la composition du milieu de repos sur l'activité constitutive de NF- κ B dans les macrophages THP-1. Les monocytes THP-1 ont été différenciés avec du PMA 0,3 μ M, non plus avec du sérum 10 % (Fig 12A) mais avec de la BSA 0,1 %. La différenciation est suivie d'une incubation de 24 heures dans un milieu de repos contenant soit 0,1% de BSA, soit 0,2% de HLA ou soit 0,1% de SB. Chaque test a été réalisé en simple. Les résultats (en CPM) ont été obtenus par comptage direct sur les gel de retard par l'Instant Imager. Chaque échantillon correspond à 15 μ g de protéines.

effet ne sera pas facile à mettre en évidence. En effet, si le niveau basal d'activation du facteur NF- κ B est déjà élevé chez les macrophages THP-1, cela signifie qu'un grand nombre de molécules NF- κ B sont sous leur forme dimériques, non complexées à I κ B. Il est donc difficile d'augmenter encore de manière significative le taux de molécules de NF- κ B à activer. Inversement, si certaines LDL avaient un effet inhibiteur sur l'activation induite de NF- κ B, cet effet serait également difficile à mettre en évidence, puisque la différence entre cellules stimulées et cellules contrôles est relativement faible. C'est pourquoi, nous avons tenté de diminuer cette activation constitutive des macrophages THP-1.

Nous nous sommes demandé quel facteur extérieur serait capable d'influencer cette activation basale. Le PMA, utilisé lors de la différenciation des monocytes en macrophages, est un facteur pouvant également activer le facteur NF- κ B. De plus, étant liposoluble, cet ester de phorbol s'élimine difficilement lors des rinçages. Nous avons envisagé de le remplacer par un autre ester de phorbol plus hydrosoluble et donc plus facile à éliminer au cours des rinçages, le phorbol dibutyrate, mais les résultats de la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages par ce facteur n'étaient pas satisfaisants (point 1.1.1.A.).

Aussi, lors de nos expériences, nous avons pris toutes les précautions nécessaires pour que l'action éventuelle du PMA soit réduite le plus possible quand nous commençons la stimulation avec l'IL-1 ou les LPS. C'est pourquoi, après les 24 heures de différenciation en macrophages, les cellules sont brièvement rincées avec du milieu de rinçage et ensuite mises en "repos" durant 24 heures supplémentaires dans un milieu contenant 0,1 % d'albumine bovine, mais ne contenant ni PMA ni sérum.

Nous avons alors décidé de changer la composition du milieu utilisé lors de la mise en repos des cellules, en espérant ainsi diminuer quelque peu l'activité constitutive de NF- κ B. L'albumine bovine a été remplacée par de l'hydrolysate de lactalbumine (HLA) à 0,2 % ou par 0,1 % de sérum (SB). Le HLA est un substitut de sérum pour des cultures à court terme. En analysant les résultats (Fig 12A), nous pouvons constater que quel que soit le milieu de repos utilisé, l'activation basale reste comparable aux contrôles, c'est-à-dire aux cellules n'ayant pas du tout été mises en repos. On constate par ailleurs que les macrophages présentent une activité constitutive supérieure à celle observée chez les monocytes.

Nous avons ensuite essayé d'agir pendant la phase de différenciation avec le PMA. Lorsque nous différencions les monocytes THP-1, ces cellules sont incubées dans un milieu contenant du sérum. Nous avons décidé de changer la composition de ce milieu de différenciation en remplaçant le sérum par de l'albumine bovine à 0,1 %. Les

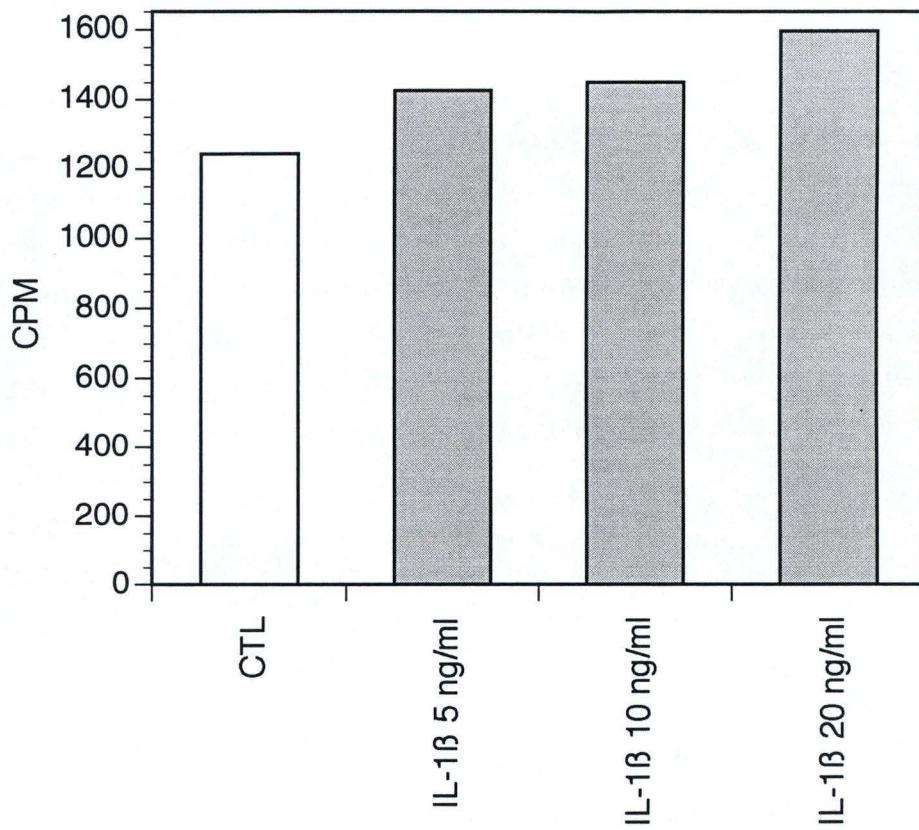


Fig 13 Effet sur l'activation du facteur NF- κ B de la stimulation des macrophages J774 avec de l'IL-1 β (5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml). Les gels de retard ont été analysés par l'Instant Imager et les résultats exprimés en CPM. Chaque colonne correspond à la moyenne de 2 échantillons déposés sur le gel et chaque échantillon correspond à 25 μ g de protéines.

cellules sont ensuite laissées en repos pendant 24, 48 ou 72 heures dans les mêmes milieux testés lors de l'expérience précédente (milieu + 0,2 % de HLA ou milieu + 0,1 % de sérum). Comme montré à la figure 12 B, on constate cette fois une diminution de l'activation basale du facteur NF- κ B.

Néanmoins, ces résultats doivent être considérés avec précaution pour les raisons suivantes. D'une part, la coloration au bromure d'éthidium et à l'acridine orange réalisée après la période de 24 heures de repos, ne révèle aucune cytotoxicité apparente. D'autre part, l'examen au microscope à contraste de phase, révèle par contre, des quantités significatives de cellules mortes et de débris cellulaires flottant dans le milieu, ce qui suggère néanmoins une toxicité des traitements. Cette mortalité ne fait que s'accroître lorsque la période de repos passe à 48 et 72 heures (résultats non montrés).

En conclusion, vu que les différentes tentatives de diminution de l'activation constitutive de NF- κ B chez les macrophages THP-1 n'ont pas donné de résultats satisfaisants, nous avons décidé de garder nos conditions d'incubation de départ. Dans un premier temps, nous différencions les cellules pendant 24 heures dans un milieu contenant 10 % de sérum et de PMA 0,3 μ M. Ensuite, après les avoir brièvement rincées avec du milieu de rinçage, nous les mettons en repos, durant 24 heures, dans un milieu contenant 0,1 % d'albumine bovine. Tout au long des expériences suivantes, nous étudierons donc l'activation du facteur NF- κ B dans les cellules macrophagiques sachant qu'elles présentent une activité constitutive fort marquée.

2.1.2. Les macrophages murins J774

Stimulation avec l'interleukine 1 β

Afin de vérifier si le facteur NF- κ B peut être activé dans les cellules macrophagiques de la lignée J774, nous les avons stimulées avec des concentrations croissantes en IL-1 β (5 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml) pendant 30 minutes. En analysant les résultats de la stimulation, nous observons sur le graphe (Fig 13) une légère augmentation de l'activité du facteur NF- κ B en fonction de la concentration en IL-1 β . Nous constatons à nouveau, comme c'était le cas pour les macrophages THP-1, que le niveau basal d'activation du facteur NF- κ B est élevé. Nous n'avons plus testé différents milieux de mise en repos des cellules pour les macrophages J774, afin de diminuer cette activation basale. Nous suivrons donc la même méthode que celle utilisée pour les macrophages THP-1, c'est-à-dire une mise en repos de 24 heures dans du milieu RPMI contenant 0,1 % d'albumine bovine, avant la stimulation.

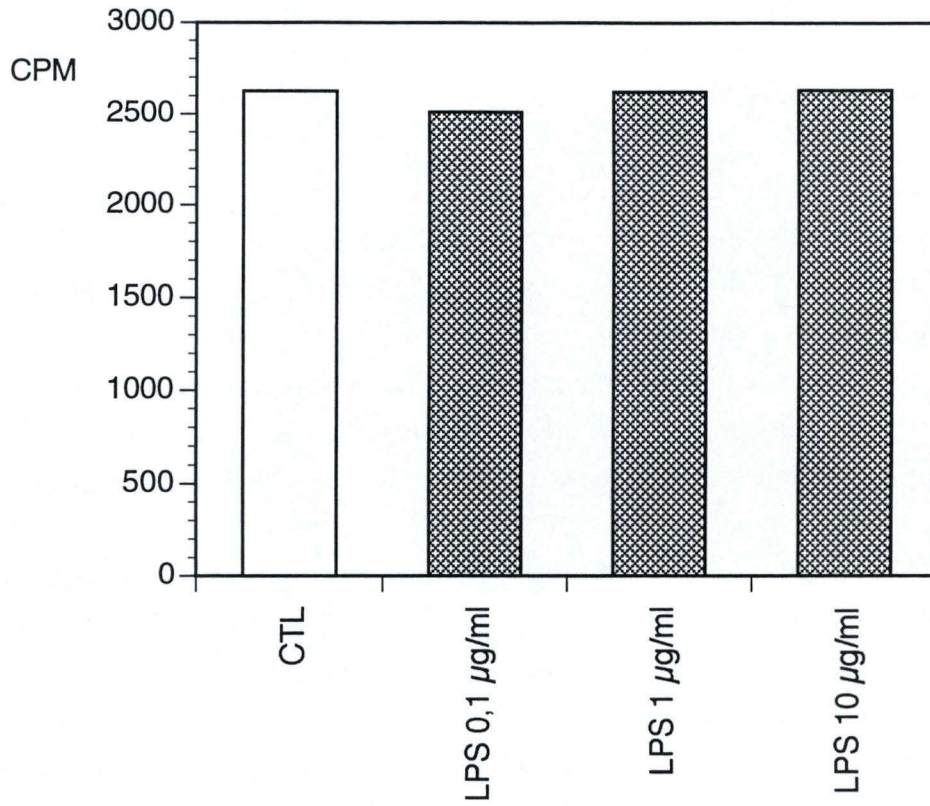


Fig 14 Effet sur l'activation du facteur NF- κ B de la stimulation des macrophages J774 avec différentes concentrations LPS (0,1 μ g/ml; 1 μ g/ml; 10 μ g/ml) durant 1 heure. Les gels de retard ont été analysés par l'Instant Imager et les résultats ont donc été exprimés en CPM. Chaque colonne correspond à la moyenne de deux échantillons (contenant 25 μ g de protéines) déposés sur le gel.

Stimulation avec des lipopolysaccharides

Nous avons également testé les cellules J774 avec des LPS. Cette stimulation a duré une heure et est réalisée à différentes concentrations en LPS (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml). Nous remarquons sur le graphe que nous n'avons pas pu démontrer un activation du facteur NF-κB en fonction des concentrations croissantes en LPS.

2.2. La production de cytokines: l'IL-6

L'étude de la production de certaines cytokines, IL-1β et IL-6, nous permet également d'étudier l'activation cellulaire plus en aval. En effet, il est connu que les monocytes/macrophages libèrent de nombreuses cytokines lors d'une réponse inflammatoire. Au sein du promoteur des gènes de plusieurs cytokines, se trouve une ou plusieurs séquences reconnaissant le facteur NF-κB. Donc, par le biais de l'étude de la libération de cytokines, nous espérons pouvoir étudier indirectement l'activation du facteur NF-κB. Chez des fibroblastes humains WI-38 transformés par le virus SV40, Renard et al (Boichem. Pharmacol., sous presse, ont montré un beau parallélisme entre d'une part l'activation de NF-κB et d'autre part la production d'IL-6, après stimulation avec l'IL-1. De plus, des molécules antioxydantes inhibant l'activation du facteur NF-κB, inhibent également la production d'IL-6. Cette étude de la libération de cytokines a également un grand avantage. La technique de l'EMSA, étudiant l'activation de facteurs de transcription est une technique laborieuse, nécessitant beaucoup de matériel cellulaire et elle ne permet pas de répéter plusieurs fois le même test au sein d'une même expérience. Par contre, l'étude de la libération de cytokines et leur détection par la méthode ELISA a l'avantage d'être plus abordable. De nombreux répliquats par tests peuvent être réalisés et la quantité de cellules nécessaires est nettement moins importante. Elle nous a donc semblé très avantageuse, surtout pour tester par après les différentes préparations de LDL, disponibles en quantités limitées.

Ainsi, dans le cadre de nos expériences, si le facteur NF-κB est activé suite à une stimulation par des LPS ou de l'IL-1β, on peut supposer qu'il se fixera sur la séquence cible du promoteur du gène de l'IL-6 ou de l'IL-1β et activera leur transcription. Ces cytokines seront alors libérées dans le milieu et leur production sera détectée par ELISA.

L'étude de la libération de ces cytokines suite à une activation par de l'IL-1β ou des LPS a été faite principalement sur les macrophages. En effet, les cellules adhérentes se prêtent mieux à la méthode ELISA que les cellules en suspension.

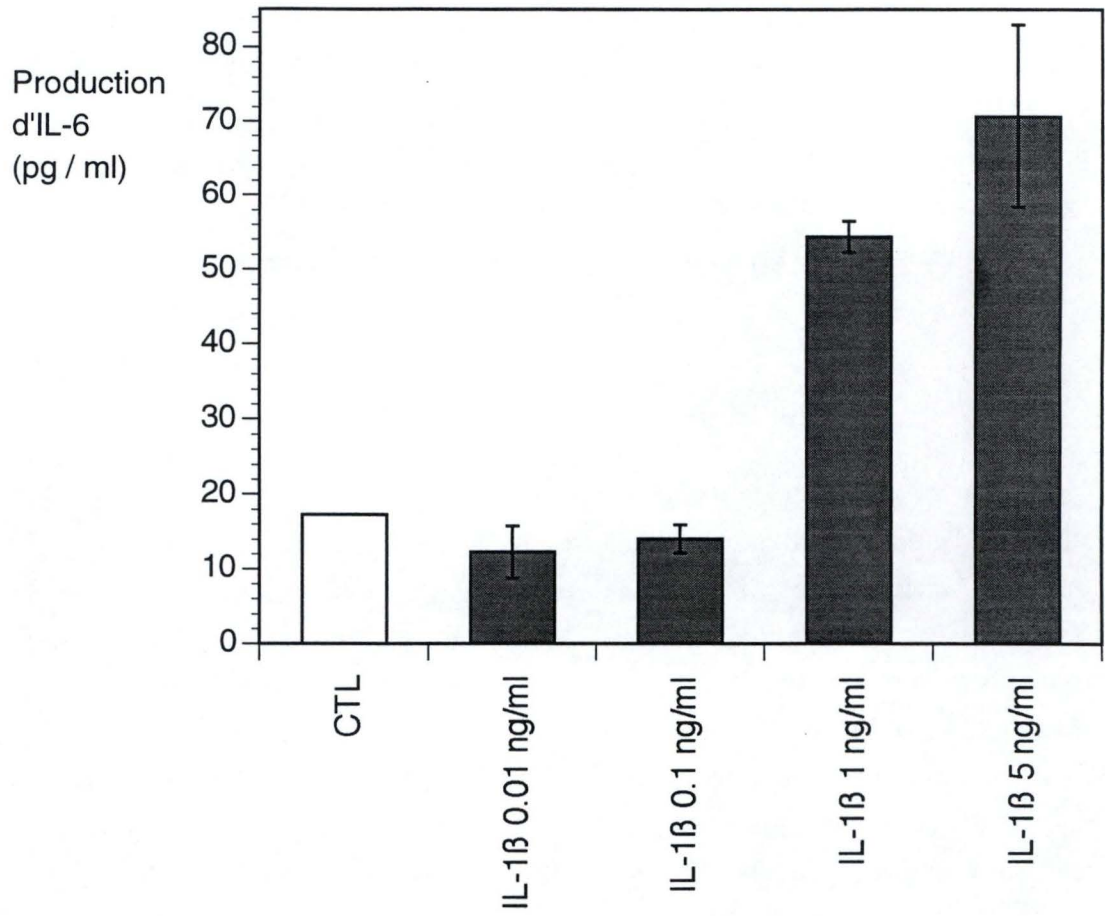


Fig 15 Effet dose-dépendant de l'IL-1 β sur la production d'IL-6 par les macrophages THP-1. Les cellules ont été stimulées avec de l'IL-1 β (0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml) durant 6 heures (100 000 cellules par test). L'IL-6 est dosée dans le milieu extracellulaire (1 ml) par ELISA et les résultats correspondent à la moyenne de 3 cupules \pm un écart-type.

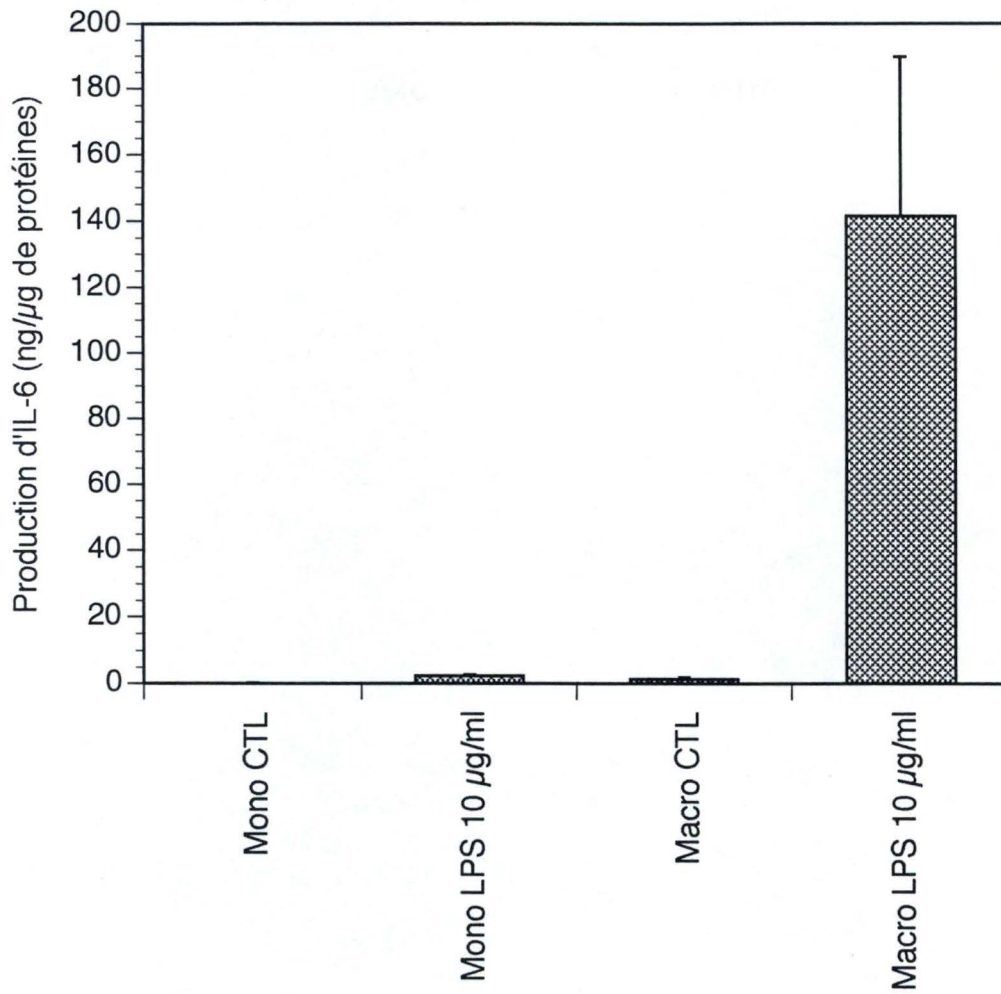


Fig 16 Comparaison de l'effet d'une stimulation avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS durant 24 heures sur la production d'IL-6 par des monocytes THP-1 et des macrophages THP-1. Chaque colonne représente la moyenne de 6 cupules \pm un écart-type (1 μg de protéine représente environ 15000 cellules).

Dans une première expérience, nous avons étudié la production de l'IL-1 β et de l'IL-6 par les macrophages, après les avoir stimulés avec des LPS. En ce qui concerne l'IL-1 β , nous n'avons pas obtenu de différence entre les cellules non stimulées et les cellules stimulées avec des LPS. Par contre, les LPS induisent bien une production d'IL-6. Bien que les résultats sur l'IL-1 β soient surprenants, étant donné que les monocytes/macrophages sont les principales cellules productrices d'IL-1 β , nous n'avons pas approfondi cette question par manque de temps et étant donné que les résultats obtenus avec l'IL-6 semblaient prometteurs. Il n'est pas exclu que la sensibilité du kit ELISA utilisée pour l'IL-1 β entre en ligne de compte. Tous les ELISA présentés dans la suite du travail concernent donc soit l'IL-6 humaine pour les macrophages THP-1, soit l'IL-6 murine pour les macrophages J774.

2.2.1. Les cellules macrophagiques THP-1

Stimulation avec l'interleukine 1 β

Afin d'obtenir une production d'IL-6, nous avons stimulé, pendant 6 heures, les macrophages THP-1 avec différentes concentrations en IL-1 β (0,01 ng/ml; 0,1 ng/ml; 1 ng/ml; 5 ng/ml) dans des boîtes de Pétri Corning à raison de 10⁵ cellules par boîte.

Ensuite, après détection par l'ELISA, nous avons pu déterminer, à l'aide de la droite d'étalonnage, la quantité d'IL-6 produite par les cellules. Ces résultats ont été reportés sur un graphe (Fig 15). Nous constatons d'abord une faible production basale d'IL-6 dans les macrophages non stimulés. Nous remarquons ensuite qu'il existe une augmentation de la libération d'IL-6 en fonction de la concentration en IL-1 β . Nous obtenons donc un bon effet dose dépendant. Nous pouvons également constater que les concentrations en IL-1 β de 0,01 ng/ml et de 0,1 ng/ml sont trop faibles pour produire une libération significative d'IL-6. Rappelons qu'à 0,1 ng/ml, l'IL-1 β induisait déjà une légère activation du facteur NF- κ B (Fig 7).

Stimulation avec les lipopolysaccharides

Afin d'obtenir une production d'IL-6, les macrophages THP-1 ont été stimulés pendant 24 heures avec 10 μ g/ml de LPS, c'est-à-dire la concentration la plus élevée utilisée pour les retards sur gel (Fig 11). Les résultats (Fig 16) ont été exprimés en ng/ μ g de protéines correspondant à chaque test. Nous avons également comparé les

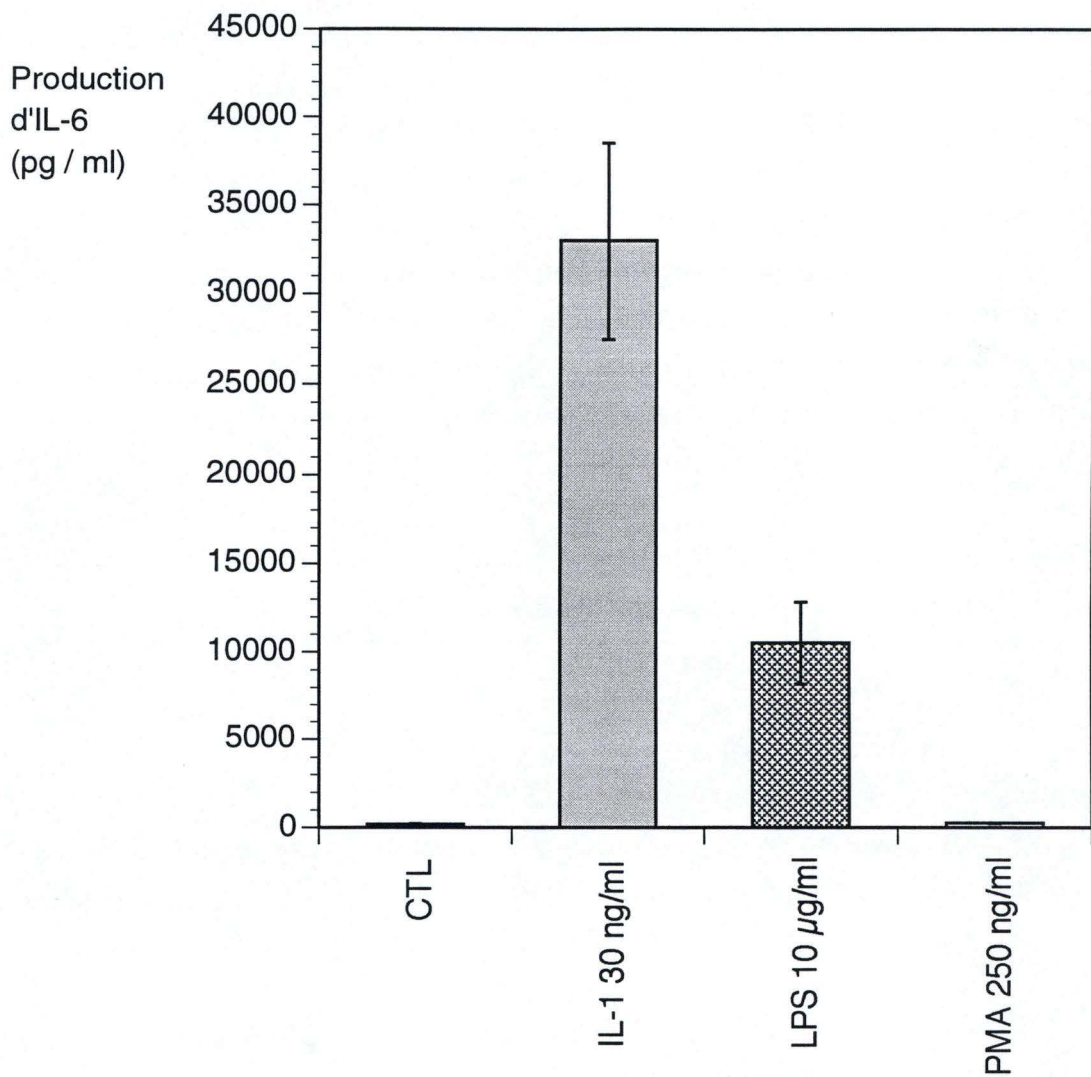


Fig 17 Effet de la stimulation des macrophages J774 avec des LPS (10 µg/ml), du PMA (250 ng/ml) ou de l'IL-1 (30 ng/ml) durant 24 heures, sur la production d'IL-6. L'IL-6 est dosée dans le milieu extracellulaire par ELISA et les résultats correspondent à la moyenne de 6 cupules ± un écart-type. Les cupules ont étéensemencées avec 150 000 cellules dans 500 µl.

effets des LPS, sur les monocytes et les macrophages: nous voyons que la production d'IL-6 par les monocytes est négligeable, qu'ils soient stimulés ou non.

2.2.2. Les macrophages murins J774

Dans cette expérience, nous avons stimulé les macrophages J774 avec 10 µg/ml de LPS ou 30 ng/ml d'IL-1 durant 24 heures dans des plaques multipuits de 24 puits contenant chacun $1,5 \cdot 10^5$ cellules. Nous avons également testé le PMA à une concentration de 250 ng/ml dans les mêmes conditions de stimulation que l'IL-1β et les LPS.

Les résultats, illustrés par la figure 17, montrent une libération accrue d'IL-6 lorsque les macrophages J774 sont stimulés avec de l'IL-1β et des LPS par rapport à des cellules non stimulées. Par contre, il ne semble pas y avoir d'effet du PMA sur la libération d'IL-6 par les macrophages J774. Aux concentrations utilisées, l'IL-1β induit une meilleure stimulation que les LPS. Mais, pour pouvoir comparer les deux stimulations, il faudrait les courbes de concentrations pour l'IL-1β et pour les LPS. Cependant, les deux concentrations utilisées respectivement pour l'IL-1β et pour les LPS sont plutôt élevées. Dès lors, ayant trouvé de bonnes conditions d'induction de la production d'IL-6, nous avons utilisé celles-ci pour tester les LDL dans la suite du travail.

2.3. Discussion

De nombreux gènes (M-CSF, MCP-1, molécules d'adhésion,...) impliqués dans les stades précoces du développement de l'athérosclérose possèdent une séquence cible pour le facteur NF-κB dans leur promoteur. Afin d'étudier l'effet des LDL sur l'activation de ce facteur, nous avons d'abord recherché un contrôle positif de ce facteur de transcription dans les modèles cellulaires choisis, les cellules THP-1 et les cellules J774.

Comme les monocytes/macrophages sont des cellules jouant un rôle essentiel dans l'inflammation et comme le facteur NF-κB est connu pour être activé lors des réponses inflammatoires, nous avons choisi de tester l'IL-1β et les LPS sur l'activation du facteur NF-κB.

Nous avons étudié l'activation de ce facteur à deux niveaux différents, d'une part sur l'activation du facteur NF-κB lui-même, d'autre part plus en aval sur la libération

d'IL-6, cytokine qui possède un site de reconnaissance du facteur NF- κ B dans son promoteur.

Renard et ses collaborateurs (sous presse) ont montré un parallélisme entre l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la production d'IL-6 chez les fibroblastes humains transformés, stimulés avec de l'IL-1 β . Cordle et ses collaborateurs (1993) ont également démontré une activation du facteur NF- κ B chez les monocytes THP-1 stimulés durant 30 à 120 minutes avec 10 μ g/ml de LPS, et particulièrement une activation du dimère p65/p50.

Lors de nos expériences, nous avons pu démontrer de fait que les cellules humaines THP-1 sous forme de monocytes ou sous forme de macrophages présentent une activation du facteur NF- κ B croissante en fonction de la concentration en IL-1 β ou en LPS. Pour les cellules murines J774 de type macrophagique, nous n'observons une activation du facteur NF- κ B qu'avec l'IL-1 β .

Il faut noter que nous avons également remarqué une forte activation constitutive de NF- κ B en ce qui concerne les macrophages. Cette activation constitutive chez les macrophages est rencontrée dans de nombreux articles. Après quelques tentatives de diminution de cette activation en changeant certaines conditions, les résultats n'étant pas satisfaisants, nous avons décidé de continuer nos expériences dans les mêmes conditions qu'au départ malgré la présence de cette activité basale élevée.

Au niveau de la libération d'IL-6, les expériences se sont avérées aussi fort concluantes. Nous avons pu démontrer une augmentation de la libération d'IL-6 chez les macrophages THP-1 en fonction de concentrations de plus en plus fortes en IL-1 β . Nous avons également montré une production accrue d'IL-6 par les macrophages J774 stimulés avec de l'IL-1 β ou des LPS. Par contre, aucune libération d'IL-6 n'est notée lorsqu'ils sont stimulés avec du PMA.

Nous constatons donc que dans les monocytes/macrophages humains et murins, il n'y a pas nécessairement un parallélisme entre l'activation du facteur NF- κ B et la production d'IL-6, contrairement à ce que l'on observe par exemple pour les fibroblastes humains transformés stimulés à l'IL-1 β (Renard et ses collaborateurs, sous presse). Cette discordance est particulièrement évidente pour les macrophages murins stimulés avec des LPS: nous ne constatons pas aucune activation du facteur NF- κ B, mais bien une induction considérable de la production d'IL-6; en ce qui concerne par contre les macrophages murins J774 non stimulés, on observe une activité basale du facteur NF- κ B, mais pratiquement pas de production d'IL-6.

Enfin, nous constatons également que les macrophages murins stimulés libèrent dans le surnageant des quantités d'IL-6 très supérieures à celles observées pour les macrophages humains non stimulés. Signalons à cet égard que certains auteurs mesurent l'IL-6 dans le surnageant et le lysat cellulaire, ce qui suggère qu'une partie de l'IL-6 reste piégée dans les cellules. Encore une fois par manque de temps, nous n'avons pas exploré cette possibilité. Rappelons également que le but du mémoire était de tester diverses préparations de LDL sur la production d'IL-6 et l'augmentation que nous observons en présence d'IL-1 β (Fig 15) et de LPS (Fig 16) s'avère suffisante pour détecter d'éventuels effets inhibiteurs.

Vu les résultats obtenus dans ce chapitre, c'est-à-dire ayant démontré que l'activation du facteur NF- κ B et la libération de cytokines se produisaient bien dans les macrophages THP-1 et J774, nous sommes maintenant à même d'étudier l'effet des différentes préparations de LDL sur les cellules au niveau de l'activation du facteur NF- κ B et de la libération d'IL-6, et ce pour les monocytes/macrophages non stimulés et stimulés.

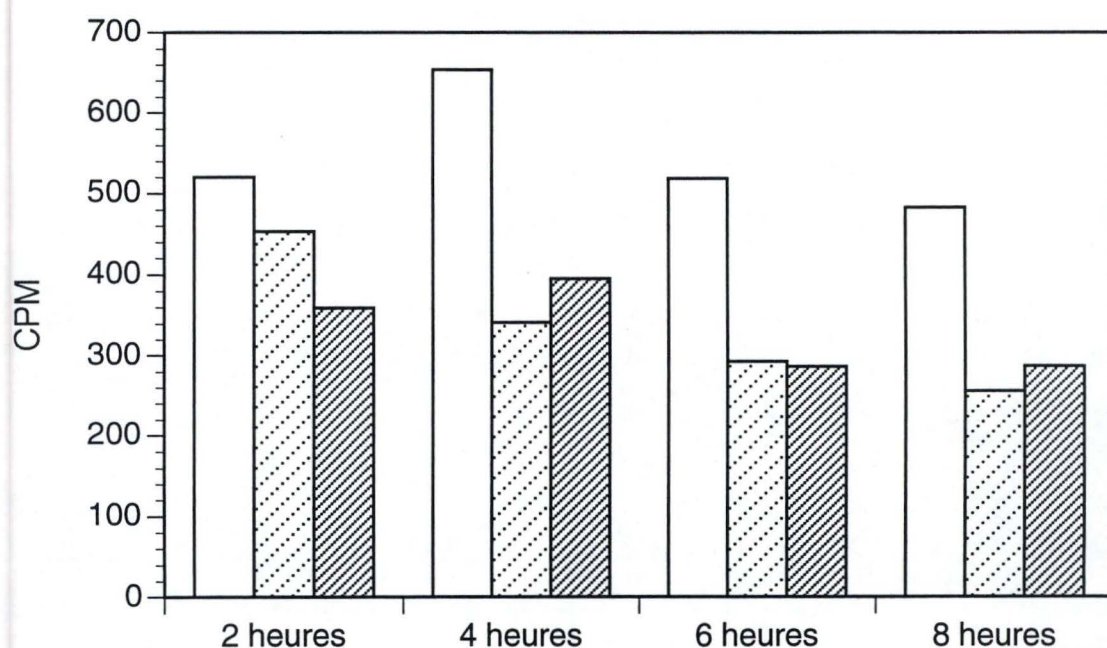


Fig 18A

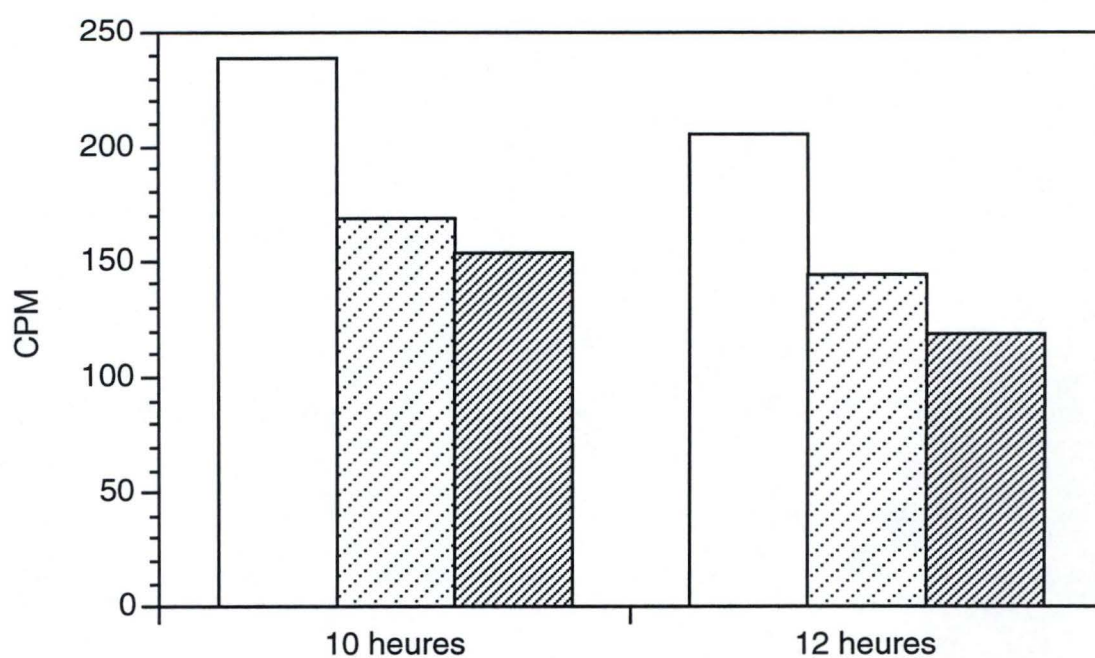


Fig 18B

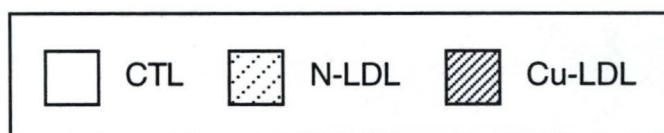


Fig 18 Effet au cours du temps de LDL natives ou oxydées au Cu^{++} , sur l'activité du facteur $\text{NF-}\kappa\text{B}$ chez les monocytes THP-1. Les cellules ont été incubées avec $50 \mu\text{g/ml}$ de N-LDL ou de oxLDL durant 2, 4, 6, 8 heures (A) et 10 et 12 heures (B). L'activité du facteur $\text{NF-}\kappa\text{B}$ a été déterminée par comptage de la radioactivité sur les gels de retard, par l'Instant Imager. Bien qu'il s'agisse d'une même expérience, nous avons utilisé deux échelles différentes pour l'ordonnée en A et en B.

3. Effet de diverses préparations de LDL sur l'activation des monocytes/macrophages non stimulés

Comme indiqué à la fin de l'introduction, l'objectif majeur du mémoire est de voir dans quelle mesure des LDL modifiées sont capables de moduler le fonctionnement des monocytes et des macrophages, que ce soit de manière positive ou négative, et qu'il s'agisse de monocytes/macrophages au repos ou stimulés (par exemple, par des LPS). En effet, dans la littérature, il n'existe aucun consensus à ce sujet. En outre, nous nous focaliserons sur trois types de LDL, les LDL natives (N-LDL), les LDL modifiées par le malondialdéhyde (MDA-LDL) uniquement au niveau de leur partie protéique, et enfin les LDL fortement oxydées au Cu^{++} (oxLDL), affectés et au niveau de la partie protéique et au niveau de la partie lipidique.

Toutes les LDL utilisées dans le cadre de ce mémoire ont été produites et caractérisées à Leuven, selon des méthodes détaillées dans le « Matériels et Méthodes » au paragraphe 4. Nous avons nous-mêmes réalisé un certain nombre d'expériences à Leuven et sommes actuellement en train de transférer ces méthodologies dans notre laboratoire à Namur, pour des raisons de facilité de gestion des expériences et d'autonomie.

Ces différentes préparations de LDL, oxydées ou non, seront testées sur l'activation d'une part du facteur de transcription NF- κ B présent, rappelons-le, dans le promoteur de nombreux gènes exprimés précocement dans les lésions. D'autre part, les LDL seront testées sur la production d'IL-6, une cytokine dont le gène est contrôlé entre autre par le facteur NF- κ B, même si, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les deux réponses peuvent discorder.

3.1. Sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B chez les monocytes/macrophages THP-1

3.1.1. Les monocytes THP-1

Dans une première expérience, nous avons voulu étudier l'effet des LDL sur les monocytes THP-1 d'un point de vue cinétique. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules THP-1 en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives (N-LDL) ou en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$ de oxLDL durant les temps suivants: 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 et 12 heures (Fig 18).

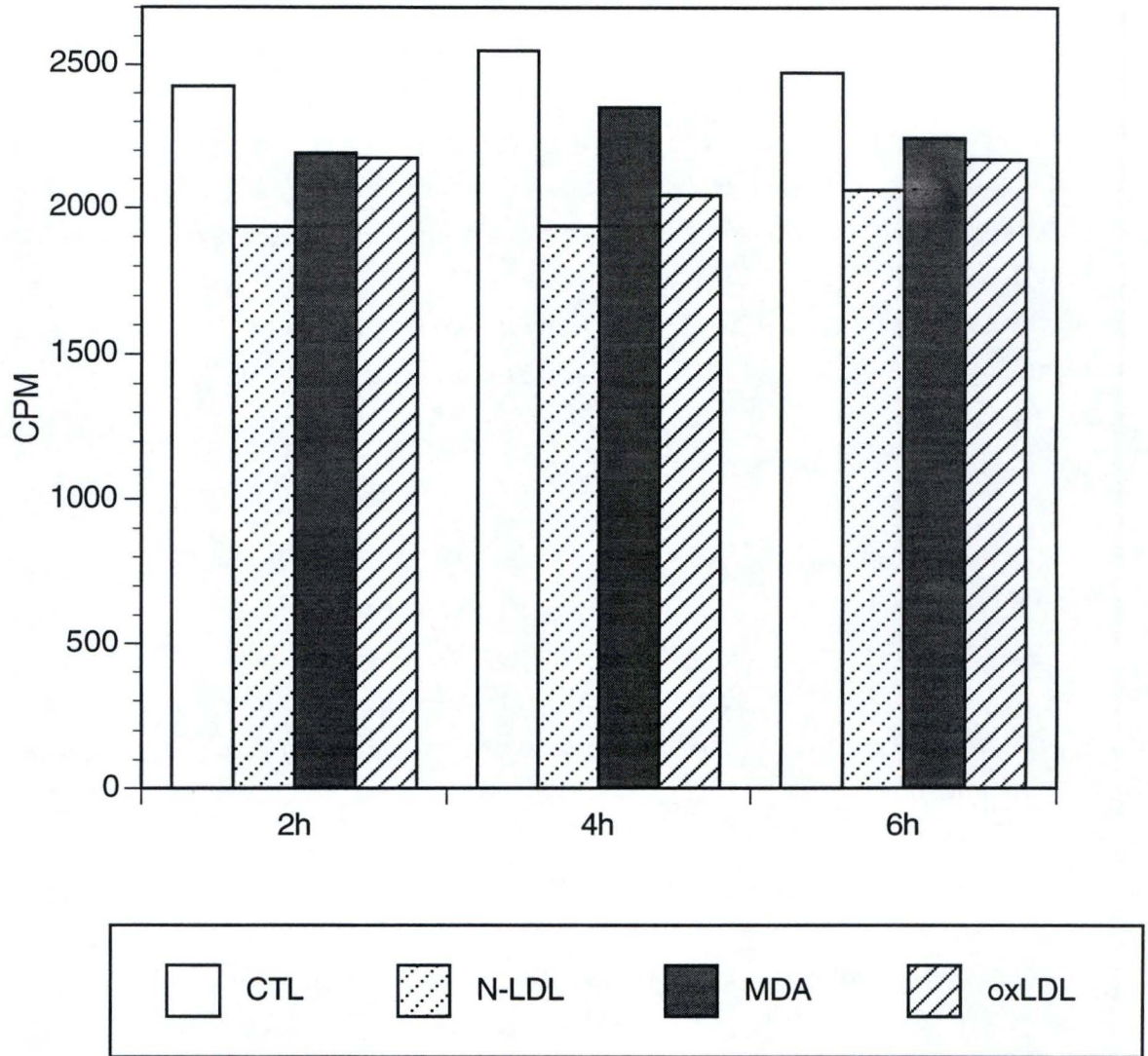


Fig 19 Effet au cours du temps de LDL natives, LDL modifiées au MDA ou oxydées au Cu^{++} (oxLDL), sur l'activité du facteur NF- κ B chez les macrophages THP-1. Les cellules ont été incubées avec 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de N-LDL, de MDA-LDL ou de oxLDL durant 2, 4 et 6 heures. L'activité du facteur NF- κ B a été déterminée par comptage de la radioactivité sur les gels de retard, par l'Instant Imager.

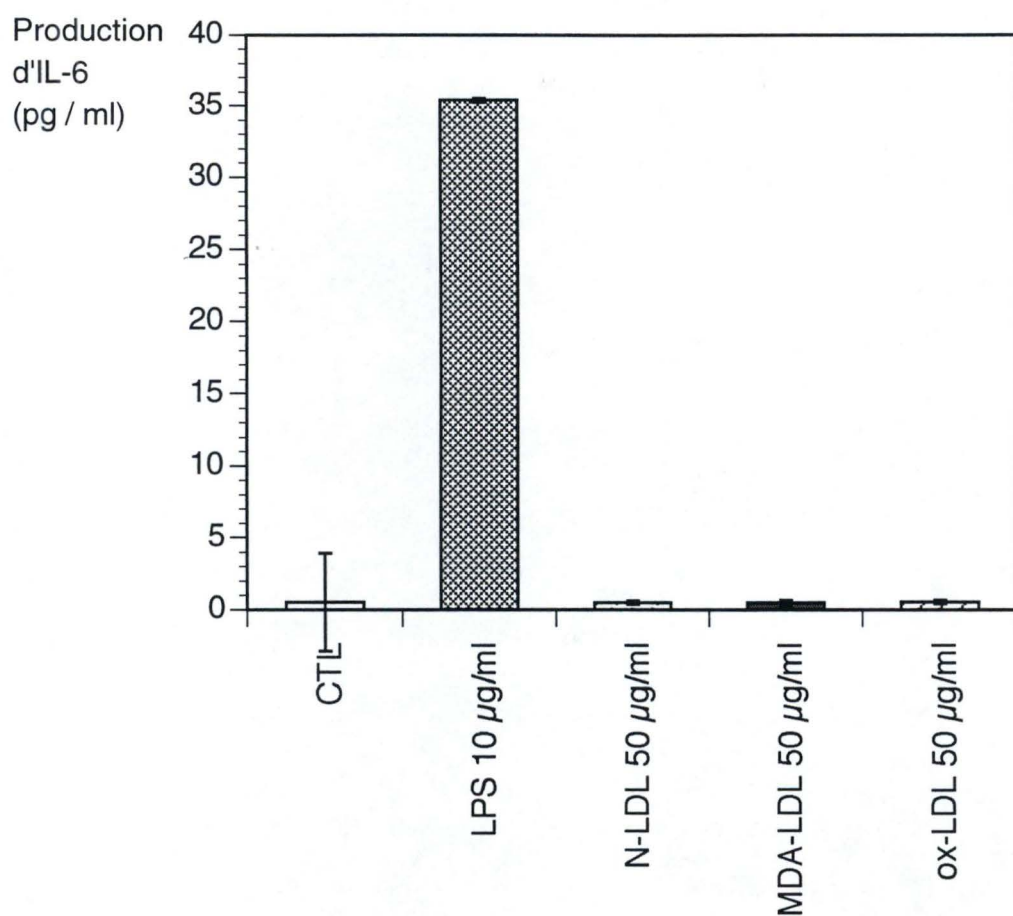


Fig 20 Effet de l'incubation des macrophages THP-1 avec 50 µg/ml de N-LDL, MDA-LDL et oxLDL sur la production d'IL-6, déterminée par ELISA. Les contrôles positifs correspondent aux cellules traitées avec 10 µg/ml de LPS. Chaque colonne correspond à la moyenne de 6 cupules ± un écart-type. Les cupules ont étéensemencées avec 250 000 cellules incubées dans 500 µl.

Nous remarquons, pour chaque durée d'incubation, une inhibition de l'activation du facteur NF- κ B par les N-LDL et les oxLDL par rapport à l'activation basale observée chez les cellules contrôles. Ces résultats vont plutôt dans le sens des articles mentionnés dans le tableau 10 de l'introduction.

3.1.2. Les macrophages THP-1

Afin de réaliser une courbe de temps comme dans le cas des monocytes, nous avons stimulé les macrophages THP-1 avec 50 μ g/ml de N-LDL, de MDA-LDL ou de Cu-LDL durant 2 ; 4 ou 6 heures (Fig 19).

Malgré un contrôle positif toujours fort élevé, il s'agit de macrophages, nous pouvons émettre les mêmes conclusions que pour l'expérience réalisée avec les monocytes (Fig 18). En effet, pour chaque durée d'incubation, nous constatons une légère inhibition de l'activation du facteur NF- κ B suite à une stimulation des macrophages par les diverses préparations de LDL. Par contre, il est difficile de discriminer les différentes préparations de LDL.

3.2. Sur la production d'IL-6

3.2.1. Les macrophages THP-1

Pour étudier la production d'IL-6 par les macrophages THP-1, nous les avons stimulés durant 24 heures avec 50 μ g/ml de N-LDL, MDA-LDL ou oxLDL. Nous ne remarquons sur le graphe de la figure 20, aucun effet des diverses LDL sur la libération d'IL-6 par rapport au contrôle positif, c'est-à-dire les macrophages stimulés avec 10 μ g/ml de LPS produisant environ 35 fois plus d'IL-6.

Dans une deuxième expérience, nous avons décidé de tester des concentrations croissantes (1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml et 200 μ g/ml) en N-LDL, en MDA-LDL ou en oxLDL, en utilisant l'IL-1 β comme contrôle positif. Encore une fois, nous n'observons aucun effet des LDL (résultats non montrés).

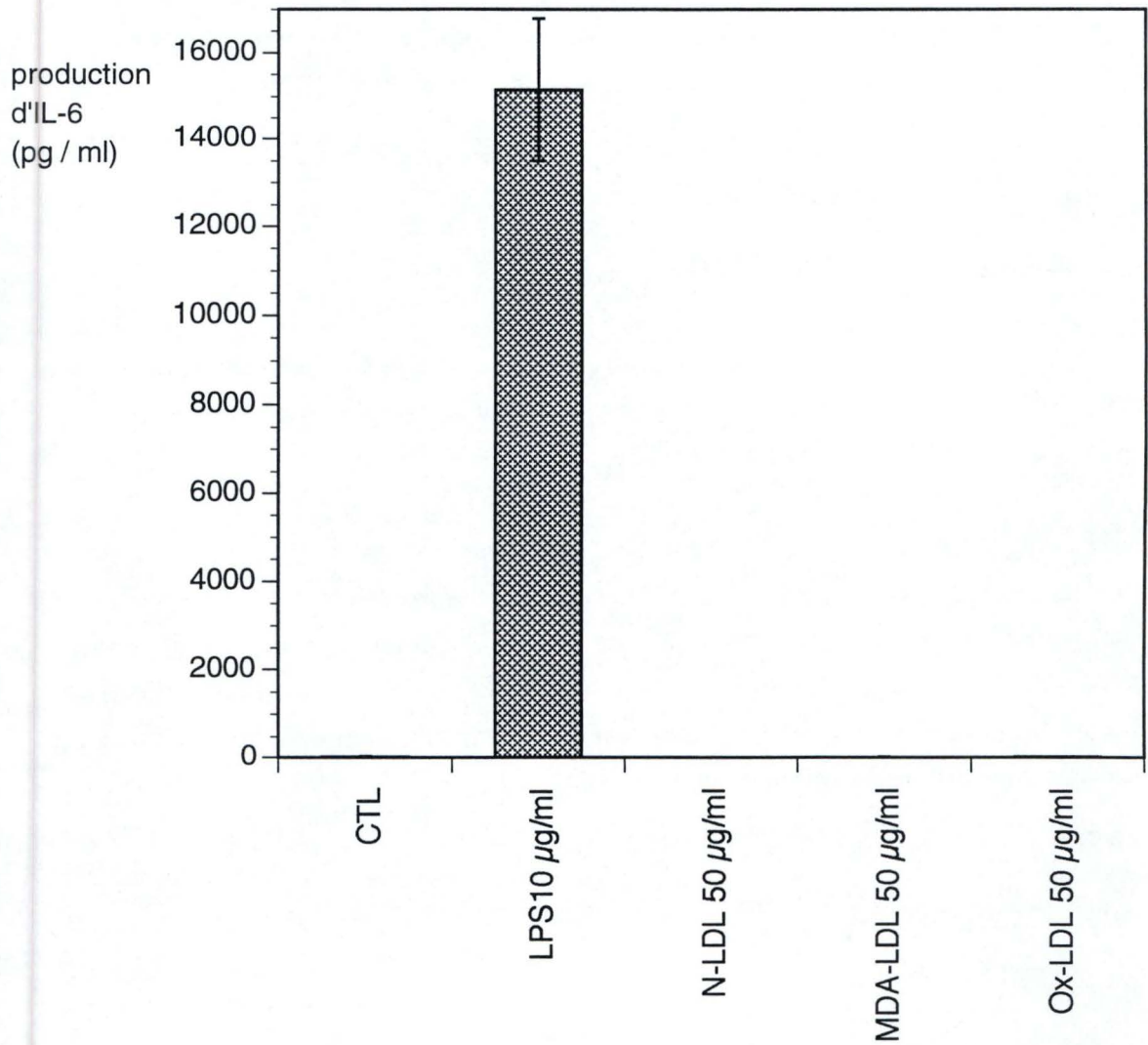


Fig 21 Effet de l'incubation des macrophages J774 avec 50 µg/ml de N-LDL, MDA-LDL et oxLDL durant 24 heures, sur la production d'IL-6, déterminée par ELISA. Le contrôle positif correspond aux cellules traitées avec 10 µg/ml de LPS. Chaque colonne correspond à la moyenne de 6 cupules ± un écart-type. Les cupules ont étéensemencées avec 250 000 cellules incubées dans 500 µl.

3.2.2. Les macrophages J774

Nous avons stimulé les macrophages J774 avec 50 µg/ml des trois types de LDL étudiées, les N-LDL, MDA-LDL ou Cu-LDL durant 24 heures. Après analyse du graphe reportant les résultats (Fig 21), nous remarquons plusieurs choses: primo, la production basale d'IL-6 par le macrophage est négligeable, puisqu'elle est inférieure à 15 pg/ml; secundo, les LPS (à 10 µg/ml) induisent une très forte stimulation de cette production (d'un facteur 1000 X); tertio, par comparaison avec le contrôle positif que constitue le LPS (10 µg/ml), il n'y a pas de production d'IL-6 par les cellules incubées avec les différentes préparations en LDL.

3.3. Discussion

Comme évoqué dans l'introduction, l'effet des LDL peut varier fortement d'une préparation à l'autre et c'est ainsi que les résultats de l'effet des LDL sur diverses cellules sont fort controversés d'un laboratoire à l'autre. C'est pourquoi, nous avons décidé de caractériser convenablement les préparations de LDL avant de les utiliser. Ces caractérisations ont été faites au niveau de la partie lipidique et au niveau de la partie protéique des différentes LDL (voir chapitre 4, matériels et méthodes). Une fois ce matériel caractérisé, nous avons commencé à stimuler nos cellules THP-1 et J774 afin d'étudier l'activation du facteur de transcription NF-κB et la libération d'IL-6 dans ces cellules lorsqu'elles ont été stimulées avec de l'IL-1β et des LPS.

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'effet de diverses préparations de LDL en fonction de la durée d'incubation de ces LDL avec les cellules THP-1 sous forme monocytique ou macrophagique. Nous avons démontré lors de ces deux expériences qu'on observe une diminution de l'activation de NF-κB par rapport à des cellules non stimulées.

Ces résultats concordent avec ceux de Shackelford (1995), qui constate une diminution de l'activation du facteur NF-κB dans des macrophages de souris incubées de 0 à 8 heures avec 15 µg/ml de oxLDL.

Mikko en 1995 a également observé, mais sur des cellules musculaires lisses humaines, une diminution de l'activation de NF-κB lorsque ces cellules sont incubées durant 4 heures avec 50 µg/ml de LDL préalablement oxydées au Cu⁺⁺ durant 15 heures (oxLDL).

Cependant, Peng (1995) a obtenu des résultats montrant une augmentation de l'activation du facteur NF- κ B dans des cellules endothéliales provenant de veines saphènes humaines incubées durant 6 heures avec 50 μ g/ml de oxLDL.

Les types cellulaires étant fort différents et le type d'oxydation de LDL variant d'un laboratoire à l'autre, il est difficile de comparer les résultats aux nôtres. Mais la plupart des articles étudiant l'activation du facteur de transcription par les différents LDL nous montrent une tendance à l'inhibition de l'activation du facteur NF- κ B par des LDL fortement oxydées.

Nous avons également étudié dans ce chapitre, l'effet de différentes LDL sur la production d'IL-6 par les macrophages humains THP-1 et les macrophages murins J774. Nous avons démontré qu'il n'y avait aucune production d'IL-6, non seulement après 24 heures d'incubation des macrophages avec 50 μ g/ml des N-LDL, MDA-LDL et oxLDL mais également après 8 heures d'incubation des macrophages THP-1 avec des concentrations croissantes (0 à 200 μ g/ml) des différentes LDL. De façon identique, les macrophages J774 n'ont montré aucune libération d'IL-6 suite à une incubation de 24 heures avec 50 μ g/ml des diverses LDL.

Les LDL comme telles n'induisent donc aucun effet sur la production d'IL-6. Nous avons également étudié l'effet des diverses LDL sur la production d'IL-6, induite par les LPS.

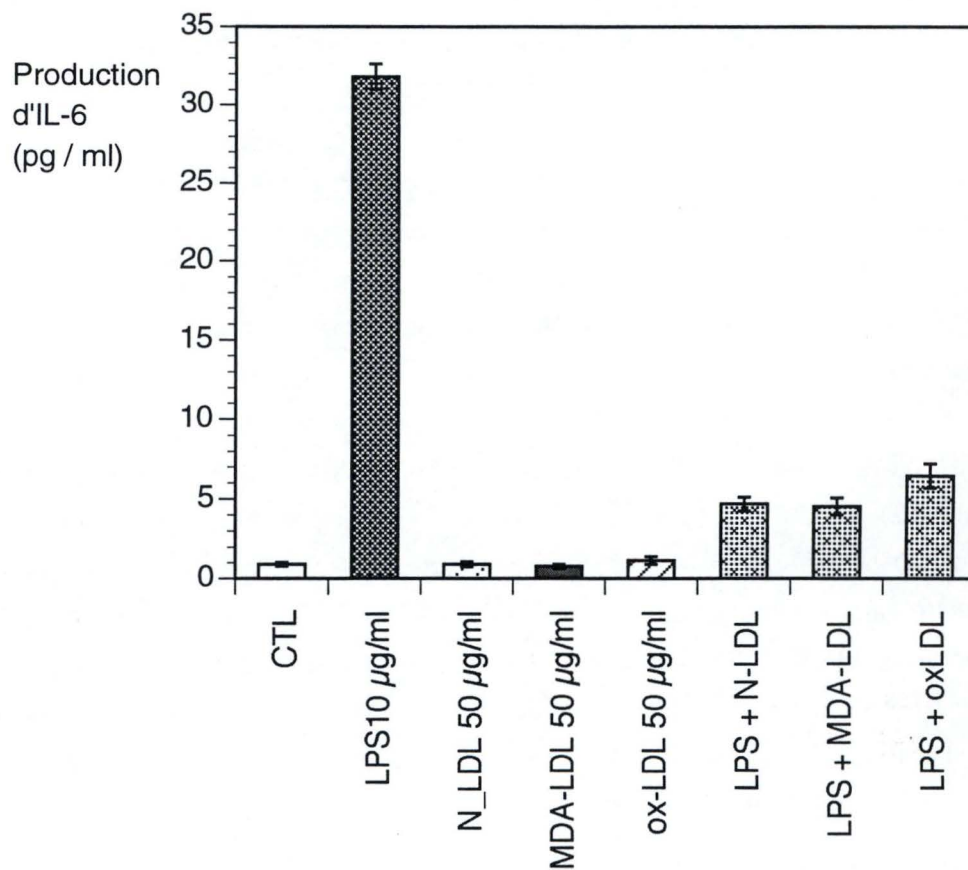


Fig 22 Effet sur la libération d'IL-6 de la stimulation des macrophages THP-1 avec 10µg/ml de LPS ou 50 µg/ml de N-LDL, MDA-LDL ou oxLDL durant 24 heures et de la stimulation des macrophages THP-1 avec des 10µg/ml LPS + 50 µg/ml de N-LDL, MDA-LDL ou oxLDL durant 24 heures. Chaque colonne représente la moyenne de 6 cupules ± un écart-type. Chaque cupule ont étéensemencées avec 250 000 cellules incubées dans 500 µl.

4. Effets de diverses préparations de LDL sur l'activation des macrophages THP-1, induite par les LPS

4.1. Etude de la production d'IL-6

Nous avons testé l'effet des LDL sur la production d'IL-6 par des macrophages stimulés avec des LPS à 10 µg/ml. Pour ce faire, nous avons stimulé les cellules avec 10 µg/ml de LPS, en présence de différentes préparations de LDL (50 µg/ml), pendant 24 heures. Les contrôles correspondent aux cellules sans additifs (CTL) et aux cellules incubées avec les LDL seules, ou les LPS seules. Cette expérience a pour but de voir si les LDL ont un effet inhibiteur ou non sur la libération d'IL-6 induite. Nous constatons (Fig 22) que les LDL ont bien un effet inhibiteur sur la production d'IL-6. En effet, nous voyons une inhibition par les LDL de la production d'IL-6 par les macrophages stimulés avec les LPS. Cette inhibition est de l'ordre de 80 %. Mais cet effet inhibiteur est comparable pour les LDL natives et modifiées.

4.2. Discussion

Nous avons pu démontrer que les différentes préparations de LDL (N-LDL, MDA-LDL et oxLDL) ont un effet inhibiteur de la production d'IL-6 chez les macrophages THP-1. En effet, lorsque nous avons stimulé ces cellules avec les LPS, en présence de LDL durant 24 heures, nous avons constaté une diminution de la production d'IL-6 par rapport aux cellules incubées uniquement avec des LPS.

Bertil et ses collaborateurs (1996) ont également démontré que des LDL oxydées inhibent la liaison induite par des LPS, du facteur NF-κB à l'ADN dans les macrophages humains. Ces résultats ont été obtenus en incubant les macrophages avec 50 µg/ml de LDL fortement oxydées (oxydation avec 5 µM de CuSO₄ durant 13 heures à 37°C) pendant 24 heures et ensuite dans un milieu ne contenant pas de LDL mais 1 µg/ml de LPS, pour une heure.

Production de M-CSF (en % par rapport aux cellules contrôles)

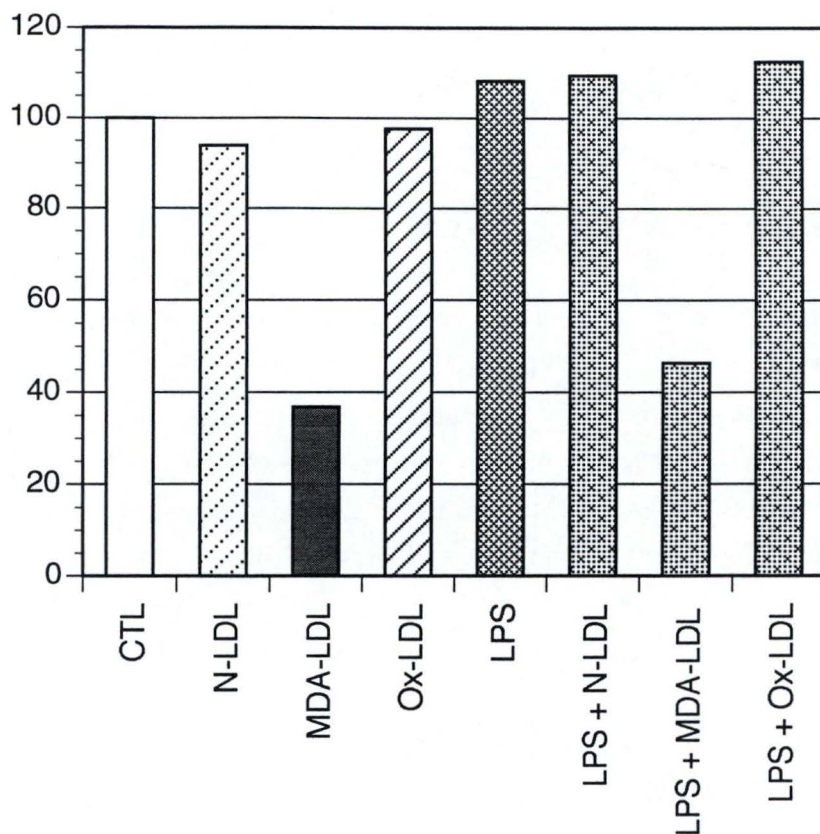


Fig 23 Effet de différentes préparations de LDL, sur la libération de M-CSF par des macrophages THP-1 incubés ou non avec des LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules ont été incubées pendant 24 heures avec ou sans LPS, en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$ de N-LDL, MDA-LDL ou oxLDL. Chaque colonne représente la moyenne de 6 cupules. Chaque cupule ont étéensemencées avec 250 000 cellules incubées dans 500 μl .

CTL	N-LDL	MDA-LDL	oxLDL
0 %	<i>6 %</i>	<i>63 %</i>	<i>2 %</i>
LPS	LPS + N-LDL	LPS + MDA-LDL	LPS + oxLDL
0 %	1 %	57 %	4 %

Fig 24 Effet inhibiteur des MDA-LDL sur la production de M-CSF par des macrophages THP-1 incubés sans (CTL) et avec (LPS) des LPS. Ces pourcentages d'inhibition (en italique) ou d'activation (en gras) ont été calculés à partir de la figure 23.

5. Effets de différentes préparations de LDL sur la production de M-CSF par les macrophages

Le M-CSF étant un facteur de différenciation des monocytes en macrophages surexprimé dans les lésions athérosclérotiques humaines et animales, nous avons décidé d'étudier l'effet des différentes préparations de LDL sur la production de M-CSF par les macrophages THP-1, stimulés ou non avec des LPS.

5.1. Etude de la production de M-CSF

Nous avons d'une part étudié la production du facteur M-CSF par des macrophages incubées avec différentes préparations de LDL (50 µg/ml) durant 24 heures. D'autre part, la libération de la production de M-CSF a aussi été testée sur des macrophages stimulés, durant 24 heures, par 10 µg/ml de LPS, en présence de LDL. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de production de M-CSF et sont à rapporter au contrôle, c'est-à-dire les cellules nontraitées, ramené à 100 % (Fig 23).

Au niveau des macrophages non stimulés avec des LPS, nous pouvons observer une forte inhibition de la libération de M-CSF chez les macrophages stimulés avec 50 µg/ml de MDA-LDL. Par contre, les N-LDL et les oxLDL n'induisent qu'une faible inhibition de la production de M-CSF.

Au niveau des macrophages stimulés avec des LPS, nous pouvons remarquer que les LPS n'augmentent pas la production de M-CSF chez les macrophages. Nous constatons également une inhibition de la libération de M-CSF par les MDA-LDL à 50 µg/ml (Fig 23). Nous avons rapporté les résultats en pourcentage d'inhibition (*italique*) ou d'activation (*gras*) par rapport respectivement aux cellules contrôle et aux cellules traitées avec les LPS (Fig 24). Nous pouvons ainsi remarquer que les MDA-LDL ont un effet inhibiteur de l'ordre de 60 %. Par contre, les N-LDL et oxLDL ne semblent pas modifier la production de M-CSF de manière significative.

5.2. Discussion

Nous avons étudié la libération de M-CSF par des macrophages stimulés ou non avec des LPS. Le M-CSF est un facteur de différenciation de la lignée monocytaire. Une surexpression de ce facteur a été détectée *in vivo* dans les lésions athérosclérotiques induite chez le lapin après avoir subi un régime athérogénique (Rajavashisth, 1990) et

chez l'homme souffrant d'athérosclérose (Clinton et al., 1992). C'est pourquoi, il est fort intéressant d'étudier l'effet de ces différentes préparations de LDL sur sa libération par les macrophages THP-1.

Les résultats ont montré une forte inhibition de la production de M-CSF par les MDA-LDL lorsque les macrophages THP-1 ont été incubés uniquement avec les LDL. Tandis qu'on ne remarque pas d'effet inhibiteur ou activateur de la production de M-CSF par les N-LDL ou oxLDL.

Parallèlement à cette expérience, nous avons également pu démontrer que des macrophages THP-1 stimulés durant 24 heures avec différentes préparations de LDL et en y ajoutant des LPS, montrent toujours une inhibition de la production de M-CSF lorsqu'ils sont incubés avec des MDA-LDL. Tandis qu'on ne remarque pas d'effet inhibiteur ou activateur des N-LDL ou oxLDL sur les autres macrophages stimulés. Ces données sont originales car à notre connaissance, cet effet des MDA-LDL n'a pas encore été décrit dans la littérature.

Cushing et ses collaborateurs (1990) ont démontré une augmentation de la production de M-CSF par les cellules endothéliales de l'aorte humaine lorsque celles-ci sont incubées durant 18 heures avec 20 µg/ml de LDL moyennement oxydées.

De même, Parhami et ses collaborateurs (1993) ont également montré une augmentation de la quantité de ARNm du M-CSF des cellules endothéliales de l'aorte humaine, de l'aorte de lapin ou de la valve de l'aorte humaine, après les avoir incubées durant 4 heures dans 125 µg/ml de mmLDL.

La plupart des augmentations de la production de M-CSF relatées dans la littérature ont été obtenues en incubant des cellules en présence de LDL moyennement oxydées, c'est-à-dire non modifiées dans la partie protéique. Dans notre cas, les LDL inhibant la production de M-CSF (MDA-LDL) sont modifiées dans la partie protéique.

Bien que des expériences ultérieures sont encore à faire pour confirmer ce résultat, nous pouvons dire, suite à notre expérience et à différents articles, que les MDA-LDL ont d'une manière générale, un effet inhibiteur sur la production de M-CSF.

La signification physiologique de ces résultats est difficile à évaluer. Mais nous confirmons donc que selon le type de cellules et le type de modification des LDL, celles-ci peuvent exercer des effets biologiques divergents.

Enfin, le fait que seules les MDA-LDL exercent un effet inhibiteur, et pas les oxLDL, est troublant, puisque ces deux types de LDL sont reconnues par le récepteur *scavenger*. Il faudra donc non seulement confirmer ces résultats, mais également essayer de les expliquer par de nouvelles expériences.

CONCLUSION
et
PERSPECTIVES

L'athérosclérose constitue une des causes principales des décès dans nos pays occidentaux. L'hypertension, le régime alimentaire, le tabac, le stress ou la constitution héréditaire paraissent être responsables d'une fréquence accrue de cette pathologie.

Le principal agent déclencheur semble être une accumulation excessive de LDL dans le plasma, entraînant une accumulation lipidique au niveau de l'intima des artères de gros calibre. Séquestrés dans cette couche sous-endothéliale, ces LDL vont s'oxyder et déclencher une réponse inflammatoire. Les LDL moyennement oxydées, c'est-à-dire les LDL modifiées uniquement dans la partie lipidique, vont alors jouer trois rôles principaux: primo, elles vont être responsables de la chémoattraction des monocytes via l'induction de la production de MCP-1 par les cellules endothéliales, vers le site inflammatoire; secundo, elles vont induire les cellules endothéliales à produire des molécules d'adhésion pour les monocytes; tertio, elles vont également activer la libération de M-CSF par les cellules endothéliales. Ainsi, les monocytes vont se retrouver dans l'intima et se différencier en macrophages. Lorsque les LDL s'oxyderont de manière plus forte, elles se modifieront également dans la partie protéique et seront alors reconnues par un récepteur, le récepteur scavenger, présent uniquement sur les macrophages. Ce récepteur, n'étant pas régulé par la concentration en cholestérol intracellulaire, comme l'est le récepteur aux LDL natives, provoque une accumulation massive de LDL dans les macrophages qui se transforment alors en cellules spumeuses. Au fil du temps, la lésion, accumulant de plus en plus de LDL, de cellules spumeuses et d'autres cellules de l'inflammation, va grossir et petit à petit, va rétrécir la lumière artérielle, provoquant ultérieurement une thrombose ou d'autres accidents cardiovasculaires.

Etant donné qu'un certain nombre de gènes semblent surexprimés dans les lésions précoces athérosclérotiques, on s'est intéressé à la régulation de ce gène et aux facteurs de transcription qui pourraient être impliqués.

Les études *in vitro* de l'activation des facteurs de transcription dans l'athérogenèse n'ont commencé que depuis quelques années et on remarque déjà que les résultats issus des différents laboratoires sont forts controversés. En effet, les cellules utilisées varient beaucoup d'un laboratoire à l'autre et les préparations de LDL sont forcément différentes. En effet, chaque laboratoire possède son propre donneur de LDL et, sachant que la composition des LDL varie d'une personne à l'autre, cela amplifie les différences des conditions expérimentales entre les laboratoires.

Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié l'effet de différentes préparations de LDL sur les monocytes/macrophages au niveau de l'activation du

facteur NF- κ B, de la libération de cytokines, plus particulièrement l'IL-6, et de la libération de M-CSF. Le choix du facteur de transcription NF- κ B provient du fait que ce facteur se trouve dans le promoteur de nombreux gènes jouant un rôle important dans l'athérogenèse (M-CSF, MCP-1 et autres molécules d'adhésion,...). La cytokine IL-6 possède également un site de reconnaissance du facteur NF- κ B dans son promoteur, c'est pourquoi nous l'avons également choisie, d'autant plus que la régulation de sa production par l'IL-1 β a déjà été bien étudiée au laboratoire dans un autre modèle cellulaire (Renard et al., sous presse).

Vu la diversité des résultats des différents laboratoires et étant donné que l'étude de l'effet des LDL sur l'activation de facteurs de transcription était un nouveau sujet dans notre laboratoire, nous avons décidé de nous attarder d'abord sur la caractérisation des modèles cellulaires et des préparations de LDL.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons démontré que nos lignées cellulaires monocytaires humaines, les THP-1 étaient bien capables de se différencier en macrophages grâce à du PMA. Cette différenciation a été vérifiée par leur capacité à se transformer en cellules spumeuses grâce aux récepteurs *scavenger* présents uniquement sur les macrophages. La seconde lignée cellulaire macrophagique murine J774 présente aussi la capacité de se transformer en cellules spumeuses (Holvoet, 1995).

Ensuite, nous avons recherché un contrôle positif pour l'activation du facteur NF- κ B et la libération d'IL-6 chez les monocytes/macrophages THP-1 et chez les macrophages J774. Nous avons ainsi pu démontrer que ces cellules, incubées avec de l'IL-1 β ou des LPS, étaient capables d'activer le facteur NF- κ B et de libérer de l'IL-6. Il faut noter que nous avons remarqué également une forte activation basale de NF- κ B au niveau des macrophages. Des tentatives de diminution de cette activation basale en changeant les conditions d'incubation des cellules ont été faites mais les résultats ne nous satisfaisant pas, nous avons décidé de continuer nos stimulations avec les conditions d'incubation utilisées au départ. L'IL-1 β et/ou les LPS se sont donc avérés être de bons contrôles positifs pour l'étude de l'activation du facteur NF- κ B et de la libération d'IL-6 sur les monocytes /macrophages THP-1 et J774. Signalons néanmoins que nous observons une certaine discordance entre l'activation du facteur NF- κ B et la production d'IL-6 que ce soit pour les monocytes/macrophages stimulés ou non.

Dans la partie suivante du travail, nous avons étudié l'effet de différentes préparations de LDL sur l'activation du facteur NF- κ B et de la libération d'IL-6 ainsi que sur la libération du facteur de différenciation M-CSF par les monocytes/macrophages THP-1 et J774. Les préparations de LDL utilisées pour ces expériences sont de trois types, les LDL natives (N-LDL) c'est-à-dire les LDL non

modifiées, les LDL modifiées dans la partie protéique par du malondialdéhyde (MDA-LDL) et les LDL oxydées dans la partie protéique et lipidique (oxLDL) par du Cu⁺⁺. Ces préparations de LDL nous ont été fournies par la KUL. Chaque type de LDL a été convenablement caractérisé au niveau de sa partie protéique et lipidique.

Au niveau de l'activation du facteur NF- κ B, nous avons pu démontrer une inhibition de son activation lorsque les THP-1 ou les J774 ont été incubées avec des LDL durant 2 à 6 heures. Au niveau de la libération d'IL-6, nous n'avons pu démontrer aucune activation, ni inhibition de la production d'IL-6 par les monocytes/macrophages incubés durant 24 heures avec des LDL.

Afin de voir si ces LDL n'avaient aucun effet ou avaient une tendance à inhiber la libération d'IL-6 induite, nous avons incubé les macrophages THP-1 en présence de LDL et de LPS durant 24 heures. Ainsi, nous avons pu démontrer une tendance des LDL à l'inhibition de la production d'IL-6, quel que soit le type de LDL.

Enfin, nous avons également démontré que les MDA-LDL induisaient une inhibition de la production de M-CSF chez les macrophages THP-1 stimulés ou non avec des LPS. Tandis que les N-LDL ou les oxLDL n'induisent aucun effet sur la production de M-CSF par les macrophages THP-1.

Ayant démontré, dans le cadre de ce travail, que les MDA-LDL c'est-à-dire les LDL modifiées uniquement dans la partie protéique ont tendance à diminuer l'activation du facteur NF- κ B et à inhiber la libération d'IL-6 et de M-CSF, nous réalisons que la spécificité de la modification de la partie protéique joue un rôle important dans la réponse cellulaire, bien que cette inhibition ne soit spécifique aux MDA-LDL que pour la production de M-CSF.

Les perspectives de ce travail seraient dans un premier temps de confirmer cette tendance à l'inhibition par les MDA-LDL en réalisant une courbe de concentration pour voir jusqu'à quelle concentration, les MDA-LDL sont capables d'inhiber cette production. Mais, si l'effet inhibiteur des MDA-LDL sur la production de M-CSF se confirmait, il faudrait également essayer de comparer à quel niveau elles agissent: est-ce avant ou après leur internalisation? Est-ce au niveau transcriptionnel ou traductionnel? Et pourquoi les MDA-LDL et pas les oxLDL?

Ensuite, il serait également intéressant de tester l'effet de nos différentes préparations de LDL sur la libération d'autres facteurs jouant un rôle dans l'athérogenèse, comme le facteur chémoattractif MCP-1, surexprimé dans les lésions athérosclérotiques de l'homme (Yla-Herttuala, 1991) et de molécules d'adhésion telles

que VCAM-1, ICAM-1. Ces facteurs favorisent le recrutement des monocytes. Toutefois, le modèle cellulaire de choix n'est plus le monocyte/macrophage, mais la cellule endothéliale artérielle, dont la mise en culture est beaucoup plus délicate et pour laquelle l'approvisionnement pose de réels problèmes.

Dans notre travail, nous avons choisi au départ de tester uniquement les N-LDL, les MDA-LDL et les oxLDL. Mais ces résultats obtenus dans ce travail, incitent à tester à l'avenir non seulement les N-LDL, MDA-LDL et les ox-LDL, mais aussi les moyennement oxydées (mmLDL) dont la caractérisation biochimique et la manipulation sont encore plus délicates. Ces LDL ne sont modifiées qu'au niveau de leurs partie lipidique. En effet, des articles relatent un effet activateur des mmLDL sur la libération de MCP-1 par les cellules musculaires lisses (Cushing, 1990), sur la production de ARNm de MCP-1 par les cellules endothéliales (Parhami, 1993), sur la production de M-CSF par les cellules endothéliales de l'aorte humaine (Cushing, 1990), sur l'activation de la transcription de M-CSF des cellules endothéliales (Parhami, 1993), etc... Il est donc fort probable que ce sont surtout les mmLDL et elles seules qui sont capables d'activer des facteurs transcriptionnels tels que NF- κ B, encore faut-il comprendre par quelles voies moléculaires.

Enfin, comme déjà mentionné, après avoir étudié les effets de différentes préparations de LDL sur les monocytes, d'autres cellules jouant un rôle important dans l'athérogenèse peuvent être également étudiées, à savoir les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Il n'est d'ailleurs pas exclu que les différentes préparations de LDL puissent avoir des effets divergents selon le type cellulaire étudié.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexander R.W. (1995). "Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective." *Hypertension* **25** (2), 155-61 Issn: 0194-911x.
- Andalibi A., Liao F., Imes S., Fogelman A.M. and Lusis A.J. (1993). "Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NF- κ B." *Biochem Soc Trans* **21** ,
- Assim (1991). "Immunologie générale". Medsi/McGraw-Hill.
- Baeuerle P.A. and Henkel T. (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol* **12** , 141-179.
- Banka C.L., Black A.S., Dyer C.A. and Curtiss L.K. (1991). "THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets." *Journal of Lipids Research* **32** , 35-43.
- Berliner J.A. and Heinecke J.W. (1996). "The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis." *Free Rad Biol Med* **20** (5), 707-727.
- Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D. and Lusis A.J. (1995). "Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics." *Circulation* **91** (9), 2488-96.
- Berliner J.A., Territo M.C., Sevanian A., Ramin S., Kim J.A., Bamshad B., Esterson M. and Fogelman M. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions." *J Clin Invest* **85** , 1260-1266.
- Bork R.W., Svenson K.L., Mehrabian M., Lusis A.J., Fogelman A.M. and Edwards P.A. (1992). "Mechanisms controlling competence gene expression in murine fibroblasts stimulated with minimally modified LDL." *Arterioscler Thromb* **12** (7), 800-6 Issn: 1049-8834.
- Chait A. and Heinecke J.W. (1994). "Lipoprotein modification: cellular mechanisms." *Curr Opin Lipidol* **5** (5), 365-70 Issn: 0957-9672.
- Clinton S.K., Underwood R., Hayes L., Sherman M.L., Kufe D.W. and Libby P. (1992). "Macriogage cikibt-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis." *Am J Pathol* **140** (2), 301-316.
- Collins T. (1993). "Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerosis lesion." *Lab Invest* **68** (5), 499-508.
- Cordle S.R., Donald R., Read M.A. and Hawigert J. (1993). "Lipopolysaccharide induces phosphorylation of MAD3 and activation of c-Rel and Related NF- κ B proteins in human monocytic THP-1 cells." *The Journal of Biological Chemistry* **268** , 11803-11810.
- Cox D.A. and Cohen M.L. (1996). "Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: Clinical and pharmacological implications in atherosclerosis." *Pharmacol Rev* **48** (1), 3-19.
- Cushing S.D., Berliner J.A., Valente A.J., Territo M.C., Navab M., Parhami F., Gerrity R., Schwartz C.J. and Fogelman A.M. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." *Proc Natl Acad Sci* **87** , 5134-5138.

- Cybulsky M.P. and Gimbrone M.A. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." *Science* **251** (788),
- Dadoune J.-P., Hadjiisky P., Siffroi J.-P. and Vendrely E. (1990). "Histologie". Paris, Medecine-Sciences Flammarion.
- Darnell, Lodish and Baltimore (1993). "Biologie moléculaire de la cellule". Bruxelles, DeBoeck Université.
- Davis (1991). "Lipoprotein structure and secretion". *Biochemistry of lipids* . Elsevier Science Publishers, ed. 461-487.
- Devary L.W. (1993). "NF- κ B activation by ultraviolet light not dependant on a nuclear signal." *Science* **261** , 1442-1445.
- Dougherty and Bride (1989). "Monocyte differenciation in vitro". *human monocytes* . Eds. Zembala and Asherson. London, Academic Press, ed. 49-58.
- Esterbauer H., Jurgens G., Quehenbergern Q. and Koller E. (1987). "Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes." *J. Lipid Res.* **28** , 495-509.
- Esterbauer H., Striegl G., Puhl H. and Rotheneder M. (1989). "Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein." *Free Rad Res Comm* **6** , 67-75.
- Fawcett D.W. (1994). "A textbook of histology". New york-London, Chapman & Hall.
- Freeman W.F. (1994). "Macrophage scavenger receptors." *Curr Op Lipidology* **5** , 143-148.
- Fruchart J.C. (1992). "Le transport du cholesterol et sa fixation dans les artères." *Pour la science* **175** , 40-47.
- Geng Y.-J., Holm J., Nygren S., Bruzelius M., Stemme S. and Hansson G.K. (1995). "Expression of the macrophage scavenger recptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon- γ ." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15** , 1995-2002.
- Gerrity R.G., Goss J.A. and Soby L. (1985). *Arteriosclerosis* **5** , 55-66.
- Gimbrone M.A., Kume N. and Cybulsky M.I. (1993). "Vascular endothelial dysfunction and pathogenesis of atherosclerosis." *Atherosclerosis Reviews* **25** , 1-9.
- Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K. and Brown M.S. (1979). "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition." *Proc Natl Acad Sci USA* **76** , 333-337.
- Gotto (1988). "Structural and functional aspects of HDL and LDL: influences of apolipoproteins." *Atherosclerosis Reviews* **17** , 39-49.
- Grimm S. and Bauerle P.A. (1993). "The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits." *Biochem J* **290** , 297-308.
- Havel R.J. (1988). "Regulation of lipoprotein metabolism by lipoprotein receptors." *Atherosclerosis Reviews* **17** , 1-8.
- Hazzard W.R. (1989). "Atherosclerosis and aging: a scenario in flux." *Am. J. Cardiol.* **63** , 20H-24H.

- Henkel T. (1993). "Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B." *Nature* **365** , 182-185.
- Hennen (1993). "Biochimie humaine". Bruxelles, Deboeck Université.
- Hiscott J. (1993). "Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukine 1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop." *Mol Cell Biol* **13** , 6231-6040.
- Holvoet P., Perez G., Zhao Z., Brouwers E., Bernar H. and Collen D. (1995). "Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease." *J Clin Invest* **95** , 2611-2619.
- Jialal I. and Devaraj S. (1996). "The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." *J Nutr* **126** (4 Suppl.), S1053-S1057.
- Junquiera L.C. and Carneiro J. (1971). "Histologica Basica". Rio de Janeiro, Brazil, Editora Guanabara Koogan S.A.
- Jürgens G., Hoff H.F., Chisolm G.M. and Esterbauer H. (1987). "Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation-characterization and pathophysiological implications." *Chem Phys Lipids* **45** , 315-336.
- Kanazawa T., Izawa M., Kaneko H., Onodera K., Metoki H., Oike Y. and Senyang L. (1987). "Comparison among lipid constituents in native LDL, ultra-water soluble LDL and vessel wall, and their significance in atherosclerosis." *Eper Mol Pathol* **47** , 166-174.
- Kaplan G. and Gaudernack G. (1982). "In vitro differentiation of human monocytes Differences in monocytes phenotypes induced by cultivation on glass or on collagen." *Exp Med* **156** , 1101-1114.
- Klinkner A.M., Waites C.R., Kerns W.D. and Bugelski P.J. (1995). "Evidence of foam cell and cholesterol crystal formation in macrophages incubated with oxidized LDL by fluorescence and electron microscopy." *J Histochem Cytochem* **43** (10), 1071-1078.
- Kume N., Cybusky M.I. and Gimbrone M.A. (1992). "Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells." *J Clin Invest* **90** , 1138-1144.
- Ledwozym A., Michalak J., Stepien A. and Kadziolka A. (1986). "The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis." *Clin Chim Acta* **155** , 275-284.
- Li H., Cybulski M.I., Gimbrone M.A. and Libby P. (1993). "An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium." *Arterioscler Thromb* **13** , 197-204.
- Lowry O.H., Rosegrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). "Protein mesurment with the folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193** , 265-275.
- Lyons and Ashman (1989). "Monocytes cell lines". *human monocytes* . . London, Academic Press, ed. 59-70.
- Mabile L., Fitoussi G., Periquet B., Schmitt A., Salvayre R. and Negresalvayre A. (1995). "alpha-Tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells." *Free Radical Biol Med* **19** (2), 177-187.

- Mikko P.S., Kallin B., Eriksson P. and Nilsson J. (1995). "Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor- κ B in human vascular smooth muscle cells." *Thromb Vasc Biol* **15** , 1584-1590.
- O'Brien K.D. and Chait A. (1994). "The biology of the artery wall in atherogenesis." *Med Clin North Am* **78** (1), 41-67.
- Ohlsson B.G., Englund M.C.O., Knutsen E., Erixon C., Skribeck H., Liu Y., Bondjers G. and Wiklund O. (1996). "Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappa B to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor- α and interleukine-1 β in macrophages." *J Clin Invest* **98** , 78-89.
- Osborn L., Kunkel S. and Nabel G.J. (1989). "Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B." *Proc Natl Acad Sci USA* **86** , 2336-2340.
- Palombella V.J. and Rando O.J. (1994). "The Ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B." *Cell* **78** , 773-785.
- Parhami F., Fang Z.T., Fogelman A.M., Andalibi A., Territo M.C. and Berliner J.A. (1993). "Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate." *J Clin Invest* **92** , 471-478.
- Peng H.B., Rajavashisth T.B., Libby P. and Liao J.K. (1995). "Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells." *J Biol Chem* **270** (28), 17050-17055.
- Piotrowski J.J., Hunter G.C., Eskelson C.D., Dubick M.A. and Bernhard V.M. (1990). "Evidence for lipid peroxydation in atherosclerosis." *Life Sci* **46** , 715-722.
- Poston R.N., Haskard D.O., Coucher J.R., Gall N.P. and Johnson-Tidey R.R. (1992). "Expression of intercellular adhesion molecule 1 in atherosclerotic plaques." *AM J Pathol* **140** , 665-673.
- Printseva O., Peclo M.M. and Gown A.M. (1992). "Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunochemicals studies employing monoclonal antibody 10F3." *Am J Pathol* **140** (889-896),
- Quinn M.T., Parthasarathy S., Fong L.G. and 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.
- Raes M., Renard P. and Remacle J. (1995). "Les radicaux libres comme messagers secondaires." *C R Soc Biol* **189** , 355-366.
- Rajavashisth T.B., Andalibi A., Territo M.C., Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M. and 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.
- Rajavashisth T.B., Yamada H. and Mishra N.K. (1995). "Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL - Involvement of nuclear factor-kappa B." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15** (10), 1591-1598.
- Ralph (1989). "Colony stimulating factor". *human monocytes* . Eds. Zembala and Asherson. London, Academic Press, ed. 227-246.

- Rambaldi A., Young D.C. and Griffin J.D. (1987). "Expression of the M-CSF (CSF-1) gene by human monocytes." **69** , 1409-1413.
- Rawn J.D. (1990). "Traité de biochimie". Bruxelles, DeBoeck Université.
- Roitt I.M., Brostoff J. and Male D.K. (1994). "Immunologie". Bruxelles, DeBoeck University.
- Ross (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's." *Nature* **362** , 801-809.
- Ross R. (1986). "The pathogenesis of atherosclerosis-an update." *The england journal of medecine* **314** , 488-500.
- Rubin E. and Farber J.L. (1988). "Pathology". Philadelphia, J.L. Lippincott company.
- Schneider W.J. (1991). "Removal lipoproteins from plasma". *Biochemistry of lipids* . . Elsevier Science Publisher, ed. 461-487.
- Schreck R., Rieber P. and Baeuerle P.A. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1." *EMBO J.* **10** , 2247-2258.
- Sen R. and Baltimore D. (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by posttranscriptional mechanism." *Cell* **47** , 921-928.
- Shackelford R.E., Misra U.K., Florine-Casteel K., THAI S.-F., PIZZO S.V. and ADAMS D.O. (1995). "Oxidized low density lipoprotein suppresses activation of NF- κ B in macrophages via a pertussis toxin-sensitive signaling mechanism." *J Biol Chem* **270** (8), 3475-3478.
- Siebenlist U. (1994). "Structure, regulation and function of NF- κ B." *Annu Rev Cell Biol* **10** , 405-455.
- Simionescu N. (1983). "Cellular aspects of transcapillary exchange." *Physiological Reviews* **63** , 1536-1579.
- Solera (1993). "Métabolisme des lipides et des lipoprotéines". *Biochimie clinique* . . Paris, Editions Médicales Internationales, ed. 193-217.
- Stanley E.R. (1985). "The macrophage colony-stimulating factor, CSF-1." *Methods in enzymology* **116** , 565-587.
- Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D. and Wissler R.W. (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association." *Arterioscler Thromb* **15** , 1512-1531.
- Steinberg D. (1988). "Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis." *Atherosclerosis Reviews* **18** , 1-23.
- Steinberg D. and Witztum J.L. (1990). "Lipoproteins and atherogenesis: current concepts." *JAMA* **264** , 3047-3052.

- Terkeltaub R., Banka C.L., Solan J., Santoro D., Brand K. and Curtiss L.K. (1994). "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity." *Arterioscler Thromb* **14** (1), 47-53 Issn: 1049-8834.
- Thanos D. and Maniatis T. (1995). "Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene." *Mol Cell Biol* **15** , 152-164.
- van der Wal A.C., Das P.K., Tigges A.J. and Becker A.E. (1992). "Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions." *Am J Pathol* **141** , 1427-1433.
- Via D.P., Pons L., Dennison D.K. and Fanslow E. (1989). "Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1." *J Lipid Res* **30** , 1515-1524.
- Whitley M.Z., Thanos D., Read M.A., Maniatis T. and Collins T. (1994). "A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters." *Mol Cell Biol* **14** (10), 6464-75 Issn: 0270-7306.
- Witztum J.L. (1993). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." *Br Heart J* **69** , S12-S18.
- Witztum J.L. and Steinberg D. (1991). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." *J Clin Invest* **88** , 1785-1792.
- Yang X., Cai B., Sciacca R.R. and Cannon P.J. (1994). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins." *Circ Res* **74** , 318-328.
- Yla-Herttuala S., Lipton B., Rosenfeld M.E., Sarkioja T., Yoshimura T., Leonard E.J., Witztum J.L. and Steinberg D. (1991). "Macrophages express monocytes chemotactic protein (MCP-1) in human and rabbit atherosclerotic lesions." *Acad Sci* **88** , 5252-5256.
- Zhang H.F., Yang Y.H. and Steinbrecher U.P. (1993). "Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages." *J Biol Chem* **268** , 5535-5542.