



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en évidence des phospholipases A₂ impliquées dans les processus d'activation de cellules endothéliales artérielles humaines en culture

Koener, Sylvie

Award date:
1998

[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.

RECEPTION DE BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Département de Sciences, Et.
P. 507 - 1000 NAMUR

FACULTÉS UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

12 JUIN 1998

Faculté des Sciences

**Mise en évidence des phospholipases A_2 impliquées dans les
processus d'activation de cellules endothéliales artérielles
humaines en culture**

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

Sylvie KOENER
Juin 1998

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.42.43 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: .joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Mise en évidence des phospholipases A₂ impliquées dans le processus d'activation de cellules endothéliales artérielles humaines en culture

KOENER Sylvie

Résumé

Les phospholipases A₂ (PLA₂) forment une famille hétérogène d'enzymes, jouant des rôles dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires. Nous savons que la cytokine pro-inflammatoire, interleukine-1 (IL-1) augmente l'activité PLA₂. De plus, les PLA₂ semblent jouer un rôle dans deux pathologies vasculaires étudiées au laboratoire: l'athérosclérose et les varices. Mais qu'il s'agisse des processus inflammatoires ou des pathologies vasculaires, on ignore la nature exacte des PLA₂ impliquées.

Dans ce travail, nous avons voulu préciser quelle(s) étai(en)t la(es) PLA₂ impliquées après stimulation à l'IL-1, dans un modèle de cellules endothéliales humaines de l'artère coronaires (HCAEC), site privilégié des lésions athérosclérotiques. Pour répondre à notre question, nous avons choisi une approche biochimique via des inhibiteurs spécifiques des PLA₂ cytosoliques, sécrétées et indépendantes du calcium et une approche moléculaire via la RT-PCR.

L'identification des PLA₂ impliquées dans un processus pathologique devrait permettre de mieux cibler les interactions thérapeutiques anti- PLA₂.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1998

Promoteur: M. Raes

Co-promoteur: C.Michiels

Et voici que se terminent ces quatre années d'études ! Tout est allé si vite...

Je tiens à remercier premièrement le Professeur Remacle de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Un tout grand merci et un grand coup de chapeau revient à Martine Raes. Ses conseils judicieux m'ont beaucoup aidé dans mon travail. Merci pour son dévouement et d'avoir toujours su être à l'écoute malgré son emploi du temps surchargé.

Merci également à Carine Michiels pour m'avoir suivie tout au long de ce chemin. Je tiens à souligner sa grande rigueur scientifique. Elle était toujours présente pour répondre à mes questions, quelque fois idiotes, je l'avoue !!!

Je tiens également à remercier Maggy, sans qui la RT-PCR n'aurait aucun sens pour moi !! J'ai eu quand même du mal à te suivre quelques fois !!

Un énoooooorme merci à Isabelle Géron . Je crois que sans toi, je n'y serait pas arrivé à temps. Tu as passé toute cette dernière nuit à nous aider , heureusement qu'il y a eu quelques fous rires pour nous détendre !

Merci également à Cabou , à Mumu et son extraordinaire coup de papier collant, à Isa R. pour l'orthographe , à Nath C. .. et tant d'autres qui nous ont aidé dans ce dernier moment.

Merci à Marc pour m'avoir "dépêtré" de tant de galères informatiques. Excuse-moi encore pour les virus et autres catastrophes !

Un grand merci à mes compatriotes mémorants et à la bonne ambiance qui a régné au sein de nous 8 : merci à Delphine, Fred, Ben, Laura, Vincianne et ses grimaces légendaires, Johanne et Christophe .

Merci à toutes les personnes du labo pour la bonne entente .

Un merci va tout droit à mes parents qui m'ont soutenue (et pas seulement financièrement !!!) durant ces 4 années . Merci à ma sœur .

Merci à Laurent sans qui la vie ne serait pas pareil. Merci pour ton soutien et ton réconfort malgré mon insupportable caractère ces dernières semaines.

ABBREVIATIONS

ACAT	acyl cholesterol transferase
ADNc	acide désoxiribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
ADPase	adénosine diphosphatase
AMPc	adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BFGF	basic fibroblast growth factor
Bp	paire de base
BSA	bovin serum albumin
CHX	cycloheximide
COX-2	cyclooxygénase-2
cPLA ₂	phospholipase A ₂ cytosolique
DAG	diacylglycerol
DMSO	diméthyl sulfoxide
DNTP	déoxynucléotriphosphate
dpm	désintégration par minute
ECDGF	endothelial cell-derived growth factor
EDRF	endothelial-derived relaxing factor
EDTA	acide éthylènedinitrilotétraacétique
ELAM-1	endothelial leucocyte adhesion molecule-1
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ET-1	endothéline-1
FGF	fibroblast growth factor
HBSS	Hank's buffer saline solution
HCAEC	human coronary arterial endothelial cell
HDL	high density lipoprotein
HELSS	haloenol lactone suicide substrate
HMEC-1	human microvascular endothelial cell-1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I κ B	inhibitor κ B
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1

ICAM-2	intracellular adhesion molecule-2
ICF	IL-1 converting enzyme
IGF-1 like	insulin like growth factor -1
IKK	I κ B kinase
IL-1	interleukine-1
IL-I β	interleukine-1 β
iPLA ₂	phospholipase A ₂ indépendante du calcium
LCAT	lécithin cholesteryl acyl transférase
LDL	low density lipoprotein
LPL	lipoprotéine lipase
MAP kinase	mitogen activated protein kinase
MAPKKK	mitogen activated protein kinase kinase kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant
M-CSF	macrophage/monocyte colony stimulating factor
mmLDL	minimally or mildly modified LDL
MOPS	(3-[N-Morpholino]) propanesulfonic acid
NIK	NF- κ B inducing kinase
NK- κ B	nuclear factor κ B
NO \cdot	oxyde nitrique
OPC	oleyloxyéthyl phosphorylcholine
oxLDL	highly oxidized LDL
PAF	platelet activatig factor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PGF _{2α}	prostaglandine F _{2α}
PGG ₂	prostaglandine G ₂
PGH ₂	prostaglandine H ₂
PGI ₂	prostacycline
PKC	protéine kinase C
PLA ₁ , PLB, PLC, PLD	phospholipase A ₁ , B, C , D
PLA ₂	phospholipase A ₂
PMN	polymorphonucléaire

RLU	relative light unit
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodécyl phosphate
sPLA ₂	phospholipase A ₂ soluble
TBE	tris borate EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetraméthyléthylènediamine
TNF α	tumor necrosis factor α
t-PA	tissue plasminogen activator
TXA ₂	tromboxane A ₂
u-PA	urokinase plasminogen activator
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein

INTRODUCTION

1. LA CELLULE ENDOTHÉLIALE	6
1.1. STRUCTURE DE L'ENDOTHÉLIUM	6
1.2. CARACTÉRISTIQUES CYTOLOGIQUES DE LA CELLULE ENDOTHÉLIALE.....	7
1.3. LES RÔLES DE L'ENDOTHÉLIUM	7
1.3.1. <i>Barrière à perméabilité sélective</i>	7
1.3.2. <i>Contrôle de la thromborésistance</i>	7
1.3.3. <i>Contrôle de la vasodilatation/vasoconstriction</i>	9
1.3.4. <i>Les molécules d'adhérence</i>	10
1.3.5. <i>Les facteurs de croissance</i>	11
2. L'INTERLEUKINE-1	12
2.1. CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES	12
2.2. LES RÉCEPTEURS À L'IL-1	13
2.3. TRANSDUCTION DU SIGNAL LIÉE À L'IL-1	13
2.3.1. <i>Les protéines G</i>	14
2.3.2. <i>l'AMP cyclique (AMPC)</i>	14
2.3.3. <i>Phosphorylations protéiques</i>	15
2.3.4. <i>Messagers secondaires lipidiques</i>	16
2.4. EFFETS BIOLOGIQUE DE L'IL-1	17
2.4.1. <i>Effets sur l'hémostase</i>	17
2.4.2. <i>Effets sur le recrutement des cellules circulantes</i>	18
2.4.3. <i>Effets sur le tonus vasculaire et la perméabilité</i>	18
3. LES PHOSPHOLIPASES A₂.....	19
3.1. LES PHOSPHOLIPASES A ₂ (PLA ₂)	19
3.1.1. <i>Les PLA₂ solubles (sPLA₂)</i>	20
3.1.2. <i>Les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂)</i>	21
3.1.3. <i>Les PLA₂ indépendantes du Ca⁺⁺ (iPLA₂)</i>	23
3.2. EFFETS DE L'IL-1 SUR LES PHOSPHOLIPASES A ₂	23
4. L'ATHÉROSCLÉROSE	25
4.1. LES ARTÈRES ET LEUR CLASSIFICATION	25
4.2. LES LIPOPROTÉINES ET LE TRANSPORT DU CHOLESTÉROL	25
4.2.1. <i>Les chylomicrons et les VLDL</i>	26
4.2.2. <i>Les LDL</i>	27
4.2.3. <i>Les HDL</i>	27
4.3. ORIGINES DE L'ATHÉROSCLÉROSE.....	28
4.3.1. <i>Modèle hypothétique</i>	28
4.3.2. <i>Événements moléculaires liés à l'athérosclérose</i>	28
4.4. ÉVOLUTION DES LÉSIONS ATHÉROSCLÉROTIQUES	30

5. LES VEINES VARIQUEUSES	32
5.1. LE SYSTÈME VEINEUX.....	32
5.2. DESCRIPTION DES VEINES VARIQUEUSES	32
5.2.1. <i>La barrière endothéliale est conservée</i>	33
5.2.2. <i>La présence d'enzymes lysosomiales</i>	34
5.2.3. <i>Altérations de la matrice extra-cellulaire</i>	34
5.2.4. <i>Épaississement de la paroi veineuse</i>	34
5.2.5. <i>Désorganisation totale de la paroi vasculaire</i>	34
5.3. ALTÉRATIONS DE LA CELLULE ENDOTHÉLIALE AU COURS DE L'HYPOXIE	35
6. OBJECTIFS DU MÉMOIRE	36

MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE DE CELLULES	37
A. Culture des HCAEC	
1.1. MATÉRIEL.....	37
1.1.1. <i>Repiquage</i>	37
1.1.2. <i>Congélation-décongélation</i>	37
1.2. MÉTHODE	38
1.2.2. <i>Congélation</i>	38
1.2.3. <i>Décongélation</i>	39
B. Culture des HMEC-1	
1.1. MATÉRIELS.....	39
1.2. MÉTHODE	40
2. TESTS DE CYTOTOXICITÉ.....	40
2.1. MATÉRIELS.....	40
2.2. MÉTHODE	41
3. DOSAGE DES PROTÉINES.....	41
3.1. MATÉRIELS	42
3.2. MÉTHODE	42
4. ESTIMATION DE L'ACTIVITÉ DES PHOSPHOLIPASE A₂ (PLA₂) PAR LE TEST DE RELARGAGE D' ACIDE ARACHIDONIQUE	43
4.1. MATÉRIELS.....	43
4.2. MÉTHODE	44
5. SYNTHÈSE PROTÉIQUE : INCORPORATION DE LEUCINE TRITIÉE	44
5.1. MATÉRIELS.....	44
5.2. MÉTHODE	45

6. ELISA DE SURFACE POUR LES PROTÉINES ICAM-1 ET VCAM-1.....	46
6.1. MATÉRIELS.....	46
6.1.1. <i>ELISA de surface</i>	46
6.1.2. <i>Dosage des protéines selon la méthode au Folin</i>	47
6.2. MÉTHODES.....	47
6.2.1. <i>ELISA de surface</i>	47
6.2.2. <i>Dosage des protéines selon la méthode au Folin</i>	48
7. MISE SOUS HYPOXIE.....	48
7.1. MATÉRIELS.....	48
7.2. MÉTHODE.....	48
8. DOSAGE DE L'ATP.....	49
8.1. MATÉRIELS.....	49
8.2. MÉTHODE.....	49
9. PRÉPARATION DES LDL.....	50
9.1. MATÉRIELS.....	50
9.1.1. <i>Isolement des LDL</i>	50
9.1.2. <i>Oxydation des LDL par radiolyse</i>	51
9.2. MÉTHODES.....	51
9.2.1. <i>Isolement des LDL</i>	51
9.2.2. <i>Oxydation des LDL par radiolyse</i>	52
10. TRANSCRIPTION INVERSE SUIVIE D'UNE AMPLIFICATION PAR PCR (RT-PCR).....	52
10.1. MATÉRIELS.....	53
10.1.1. <i>Extraction d'ARN totaux à partir de cultures cellulaires (HCAEC)</i>	53
10.1.2. <i>RT-PCR en 1 étape</i>	54
10.1.3. <i>Analyse des produits PCR</i>	55
10.2. MÉTHODES.....	56
10.2.1. <i>Extraction d'ARN totaux à partir de cultures cellulaires(HCAEC)</i>	56
10.2.2. <i>RT-PCR en 1 étape</i>	58
10.2.3. <i>Analyse des produits PCR</i>	59
11. MARQUAGE DU MARQUEUR DE POIDS MOLÉCULAIRE.....	61
11.1. MATÉRIELS.....	61
11.2. MÉTHODE.....	61
12. EXTRACTION D'ADN D'UN GEL D'AGAROSE.....	62
12.1. MATÉRIELS.....	62
12.2. MÉTHODE.....	62
13. LE SÉQUENÇAGE.....	63
13.1. MATÉRIELS.....	63
13.1.1. <i>La réaction de PCR</i>	63

13.1.2. Purification des produits PCR.....	64
13.2. MÉTHODES	64
13.2.1. La réaction PCR.....	64
13.2.2. Purification des produits PCR.....	64

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. ETUDE BIOCHIMIQUE DES PLA ₂	66
1.1. ETUDE SUR LES HMEC-1	67
1.1.1. Expression des protéines d'adhérences ICAM-1 et VCAM-1	67
1.1.2 Dosage des PLA ₂ par relargage d'acide arachidonique.....	67
1.1.3. Discussion	70
1.2. ETUDE SUR LES HCAEC.....	71
1.2.1. Stimulation par l'IL-1.....	71
1.2.2. Stimulation avec les LDL oxydées.....	74
1.2.4. Discussion	75
2. ASPECT MOLÉCULAIRE DE L'ÉTUDE DES PLA ₂	78
2.1. MISES AU POINT DES CONDITIONS RT-PCR.....	79
2.2. ANALYSE SEMI-QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DE LA CPLA ₂	81
2.3. DISCUSSION	82

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

Les phospholipases A₂ sont des enzymes catalysant l'hydrolyse de la liaison sn-2 des phospholipides, libérant ainsi des acides gras et des lysophospholipides. Ces enzymes sont impliquées dans bon nombre de processus dont les processus inflammatoires. Leur activité augmente en conditions pro-inflammatoire, par exemple après traitement à l'IL-1 et elles jouent également un rôle dans certaines pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose et les varices. Mais étant donné l'hétérogénéité des PLA₂ d'une part et la complexité des processus pathologiques d'autre part, la nature des PLA₂ impliquées sont généralement inconnues d'autant plus que des divergences existent entre types cellulaires .

Ce travail a pour objectif de tenter de répondre à cette question, en se focalisant sur les cellules endothéliales, et en combinant une approche biochimique et moléculaire.

Mais avant d'entrer dans le vif du sujet, nous exposerons le contexte plus global de ce travail dans l'introduction qui suit.

L'introduction de ce mémoire est composée donc de six parties:

- La première partie sera consacrée à l'étude de la cellule endothéliale. Nous étudierons sa structure et ses rôles.
- En second lieu, une étude approfondie de l'interleukine-1 sera envisagée. Nous passerons en revue sa structure, sa transduction du signal et ses effets sur les cellules endothéliales.
- Troisièmement, nous décrirons en profondeur les phospholipases A₂ (PLA₂), famille hétérogène en nous focalisant sur trois sous groupes : les PLA₂ cytosoliques, les PLA₂ sécrétées et les PLA₂ calcium indépendante
- Ensuite, nous passerons en revue les phénomènes liés à l'athérosclérose et les rôles des phospholipases A₂ dans cette pathologie seront envisagés.
- Nous décrirons succinctement la pathologie des veines variqueuses.
- Enfin, nous exposerons les objectifs de ce travail.

1. La cellule endothéliale

Les cellules endothéliales tapissent en une monocouche cellulaire, l'intérieur de tous les vaisseaux des systèmes circulatoires. La surface qu'elles recouvrent atteint une superficie supérieure à 7000 m².

L'endothélium constitue à l'interface du flux sanguin et des tuniques sous-jacentes une immense barrière, dont on a cru longtemps qu'elle était biologiquement inerte. On sait aujourd'hui que les cellules endothéliales jouent des rôles très importants : elles contrôlent l'hémostase, elles répondent à des altérations pathophysiologiques comme l'inflammation, la coagulation... Les cellules endothéliales ne constituent donc pas qu'une simple barrière mais une couche cellulaire active, capable d'intégrer des signaux, d'en émettre puis de réagir aux situations et aux altérations auxquelles elles doivent faire face.

Dans ce chapitre, nous allons passer en revue les caractéristiques cytologiques et les rôles de la cellule endothéliale.

1.1. Structure de l'endothélium

Les cellules endothéliales forment une monocouche de cellules pavimenteuses aplaties, l'endothélium. Elles représentent une véritable mosaïque de cellules polygonales.

L'épaisseur d'une cellule endothéliale varie de 1 à 3 µm en fonction de la proximité du noyau. Leur longueur va de 25 à 50 µm et leur largeur de 10 à 15 µm.

Leur taille, leur arrangement et leur forme peuvent varier en fonction du type de vaisseau et leur structure est affectée par les forces hémodynamiques (Thorgeirsson, 1983).

Les cellules sont polarisées, comportant une face luminale en contact avec les cellules du sang et un pôle basal sous-endothélial par lequel elles sont attachées aux constituants de la matrice subendothéliale.

In vitro, les cellules endothéliales répondent au phénomène d'inhibition de contact : lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules vont arrêter de se diviser plutôt que de se chevaucher. Il en résulte donc une monocouche de cellules jointives. Les études faites sur les

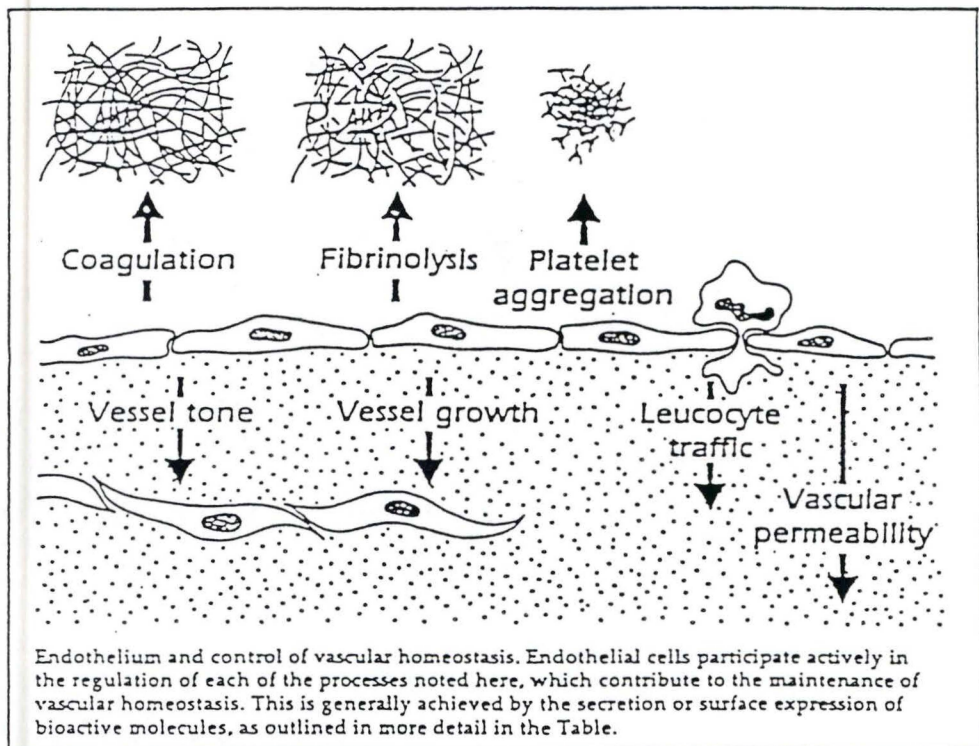


Figure I.1: Illustration des fonctions de l'endothélium vasculaire dans le contrôle de l'homéostasie du vaisseau sanguin (d'après, Pearson, 1991).

capacités de prolifération et le vieillissement des cellules endothéliales humaines en culture ont montré qu'elles avaient une durée de vie limitée.

1.2. Caractéristiques cytologiques de la cellule endothéliale

Malgré la grande variabilité qui existe entre les cellules endothéliales, plusieurs structures communes peuvent être citées: le glycocalyx, le cytosquelette, les vésicules transendothéliales et les corps de Weibel-Palade qui sont un marqueur spécifique pour les cellules endothéliales et le lieu de stockage du facteur de Von Willebrandt. Elles présentent également des complexes jonctionnels (jonctions serrées, jonctions adhérentes, complexes adhérents) qui assurent la cohésion de l'endothélium ainsi que des jonctions communicantes.

1.3. Les rôles de l'endothélium (figure I.1)

1.3.1. Barrière à perméabilité sélective

Vu leurs localisation et organisation, les cellules endothéliales forment une véritable barrière entre les éléments circulants du sang et les tissus. Elles sont dotées d'une perméabilité sélective, ce qui rend possible le passage des solutés et ce, grâce aux phénomènes de pinocytose.

Il existe une seconde barrière, la membrane basale sous-endothéliale, que rencontrent les liquides et les éléments formés dans le compartiment extravasculaire.

1.3.2. Contrôle de la thromborésistance

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le contrôle de la coagulation et de la fibrinolyse en synthétisant toute une panoplie de substances dont les actions sont soit antithrombotiques, soit prothrombotiques.

En conditions normales, les plaquettes sont inactives et circulent à la périphérie du flux sanguin à proximité des cellules endothéliales. Le fait que les plaquettes restent inactivées en dépit des forces de cisaillements est dû aux cellules endothéliales qui relarguent continuellement des inhibiteurs des plaquettes comme l'oxyde nitrique (NO) (Lüscher et Noll, 1994). Mais, suite à différents stimuli, l'endothélium peut devenir pro-coagulant et sera rapidement recouvert par une couche de plaquettes. Celles-ci, une fois actives, vont dégranuler et déclencher tout le processus de la coagulation.

L'agrégation plaquettaire est favorisée par une série de facteurs différents :

- le contact avec des constituants de la matrice extracellulaire, dont les collagènes, la fibronectine, la thrombospondine.
- plusieurs dérivés cyclooxygénasiques de l'acide arachidonique : c'est le cas du thromboxane A₂ (TXA₂) qui cause la vasoconstriction et l'agrégation des plaquettes, mais aussi des endopéroxydes comme le PGG₂ et PGH₂, précurseurs instables des prostaglandines .
- le facteur de Von Willebrandt est également une substance provoquant l'adhésion des plaquettes : libéré dans le sang, il s'associe rapidement au facteur VIII de la coagulation.

Inversement, l'endothélium secrète aussi des substances anti-coagulantes. Une des plus puissantes est la prostacycline (PGI₂). Celle-ci est produite grâce à la prostacycline synthase à partir des endoperoxides; ceux-ci proviennent de la métabolisation de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase. D'autres molécules comme l'adénosine et l'endothélium derived relaxing factor (EDRF) qui n'est autre que l'oxyde nitrique sont des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. Les cellules endothéliales portent aussi un récepteur de surface pour la thrombine, appelé thrombomoduline. Ce complexe thrombine/thrombomoduline augmente l'activation de la protéine C anticoagulante. L'endothélium peut également synthétiser et sécréter la protéine S, un facteur dépendant de la vitamine K. La protéine S fonctionne comme un cofacteur pour la liaison de la protéine C activée aux phospholipides membranaires et accélère ainsi l'inactivation du facteur Va et VIIIa par la protéine C. Les cellules endothéliales produisent aussi des glycosaminoglycans avec des activités anti-coagulantes comme l'héparine. Elles ont aussi une activité ADPase, convertissant l'ADP, l'agent agrégeant, en AMP et adénosine ce qui limite ainsi la taille des agrégats plaquettaire à la surface des cellules endothéliales (pour une revue : Borsum, 1991). L' α_2 macroglobuline et

l'antithrombine III sont des inhibiteurs de protéases qui participent aux processus de coagulation et fibrinolyse (Giddings, 1983). Les cellules endothéliales sécrètent également le u-PA (urokinase plasminogen activator) et le t-PA (tissu plasminogen activator), deux activateurs du plasminogène. Ces activateurs du plasminogène sont des sérines protéases qui convertissent le plasminogène zymogène en plasmine, une sérine protéase active. La liaison du t-PA à sa protéine de liaison est protégée par son inhibiteur naturel, le PAI-1 (Boeynaems et Piroton, 1994).

1.3.3. Contrôle de la vasodilatation/vasoconstriction

A court terme, l'endothélium module le tonus vasculaire par la production de substances vasorelaxantes et vasoconstrictrices. A long terme, il influence la structure de la paroi vasculaire en produisant ces mêmes facteurs qui peuvent stimuler ou inhiber la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Corvol *et al*, 1993).

Les substances vasodilatatrices principales sont la prostacycline, l'oxyde nitrique et peut-être la bradykinine (Corvol *et al*, 1993). La prostacycline cause la vasodilatation en augmentant l'AMP cyclique dans les cellules musculaires lisses (Lusher et Noll, 1994). L'oxyde nitrique est formé à partir de L-arginine via l'oxyde nitrique synthase (NOS) et cause la relaxation via l'activation de guanylyl cyclase dans les cellules musculaires lisses (Inagami *et al*, 1995).

Les substances vasoconstrictrices majeures sont les radicaux superoxyde, le platelet-derived growth factor (PDGF), la prostaglandine PFG₂ α ainsi que l'angiotensine II et l'endothéline (Corvol *et al*, 1993).

1.3.4. Les molécules d'adhérence

Les molécules d'adhérence sont des molécules membranaires qui permettent à 2 cellules voisines d'interagir entre elles. Ce sont souvent des glycoprotéines transmembranaires que la cellule va utiliser comme point d'ancrage sur d'autres cellules et sur la matrice extracellulaire, pour pouvoir adhérer ou se déplacer.

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes de la circulation jusqu'aux tissus périphériques pendant la réponse inflammatoire. Ces événements sont médiés par des interactions entre les molécules d'adhérence exprimées à la surface des leucocytes et les contre-récepteurs exprimés pour les cellules endothéliales (Collins, 1996).

Les neutrophiles expriment des glycoprotéines spécifiques à la surface de leur membrane plasmique.

Parallèlement aux intégrines des neutrophiles, il existe des contre récepteurs exprimés par les cellules endothéliales :

ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) est une glycoprotéine de 90 kDa qui est exprimé par une grande variété de cellules. Elle possède 5 domaines de type immunoglobuliniques (Collins, 1996) et se lie aux intégrines des neutrophiles, lymphocytes et monocytes (Boeynaems et Piroton, 1994). Son expression augmente pendant les réponses inflammatoires. ICAM-2 est également la cible des mêmes intégrines. C'est une protéine de 40 kDa avec avec 2 domaines immunoglobuliniques. Son expression n'est pas modulée par les cytokines inflammatoires comme le TNF ou l'IL-1 (Collins, 1996).

VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) est une glycoprotéine de 110 kDa; son expression est augmentée par les cytokines inflammatoires et elle se lie préférentiellement aux lymphocytes et monocytes (Boeymaens et Piritton, 1994).

ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1) est une glycoprotéine monomérique transmembranaire appartenant à la famille des sélectines et appelée E-sélectine. Elle n'est pas exprimée constitutivement et son expression est induite par des

cytokines inflammatoires, dans les heures qui suivent la stimulation. Elle médie l'adhésion des neutrophiles et des monocytes. Les membres de ce groupe partagent une structure similaire avec un domaine de type lectine, dépendant du calcium dans la partie amino terminale, suivi par un domaine EGF et un nombre variable de domaines. Les ligands pour les sélectines sont des glycoprotéines ou glycolipides portant des motifs olygosaccharidiques, dans le motif sialyl Lewis X.

1.3.5. Les facteurs de croissance

Les différents facteurs de croissance que la cellule endothéliale secrète jouent des rôles importants dans le contrôle de la multiplication, la migration et la différenciation des cellules musculaires lisses.

Les cellules endothéliales libèrent donc plusieurs substances peptidiques stimulant la croissance des cellules musculaires lisses. Parmi celle-ci, on trouve le platelet derived growth factor (PDGF). Ce facteur provient surtout des plaquettes mais on sait actuellement qu'il est également synthétisé par les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sécrètent également un facteur de croissance ressemblant à celui qui est sécrété par les fibroblastes (FGF); un facteur de croissance dérivé des cellules endothéliales (ECDGF); un facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-like) et l'endothéline (ET).

Nous pouvons dire en conclusion que les cellules jouent des rôles très importants à beaucoup de niveaux différents. Elles sont le lieu de bons nombres de régulations et de contrôles.

Nous allons à présent passer à l'étude d'une cytokine pro-inflammatoire, l'interleuline-1 (IL-1). C'est une cytokine ubiquitaire, à effets pléiotropique et qui exerce ses effets sur une multitude de type cellulaire différents, mais dont les effets sur le cellules endothéliale sont particulièrement importants.

2. L'interleukine-1

2.1. Caractéristiques biochimiques

L'IL-1 appartient à une classe de polypeptides appelé cytokines. Ces polypeptides jouent un rôle actif dans la phase effective des réponses immunes et inflammatoires, par exemple suite à une infection ou à d'autres perturbations de l'hôte (Dinarello, 1994a). Il fut décrit pour la première fois comme un facteur activant les lymphocytes par Gery et Waksan.

Il existe deux formes d'IL-1: l'IL-1 α et l'IL-1 β . Ces 2 formes d'IL-1 ne partagent que 26 % d'homologie; chacune est codée par un gène séparé, les deux gènes étant tous les deux sur le chromosome 2 et chaque gène contient 7 exons. Les deux formes sont d'abord synthétisées sous la forme d'un précurseur. Ceux-ci, pro IL-1 α et pro IL-1 β ont chacun un poids moléculaire de 31 kDa. Le pro IL-1 α et sa forme mature de 17 kDa sont tous deux biologiquement actifs. Par contre, la pro IL-1 β est relativement inactive et requiert un clivage pour son activation (Dinarello, 1994). Ce clivage est assuré par l'enzyme ICF (IL-1 converting enzyme) ou caspase-1.

L'ARNm codant pour l'IL-1 β prédomine sur celui codant pour l'IL-1 α et cette prévalence de l'IL-1 β est également observée dans la circulation (Dinarello, 1988).

Les deux formes possèdent les mêmes propriétés et induisent en général les mêmes réponses biologiques, mais dans certaines cellules, il existe des différences dans les réponses à l'IL-1 α ou β (Dinarello, 1994).

L'IL-1 est produit par beaucoup de types cellulaires mais le producteur majeur est le macrophage.

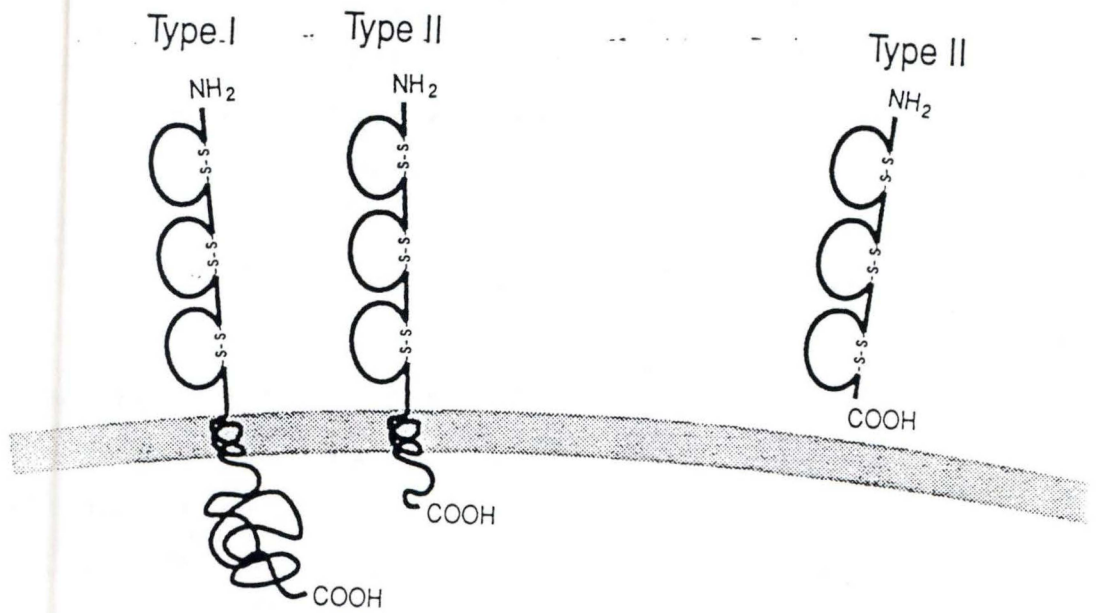


Figure 1.2: Représentation schématique des récepteurs à l'IL-1, avec leur domaines immunoglobuline. Le récepteur de type II existe également sous forme soluble (d'après Nicola, 1994).

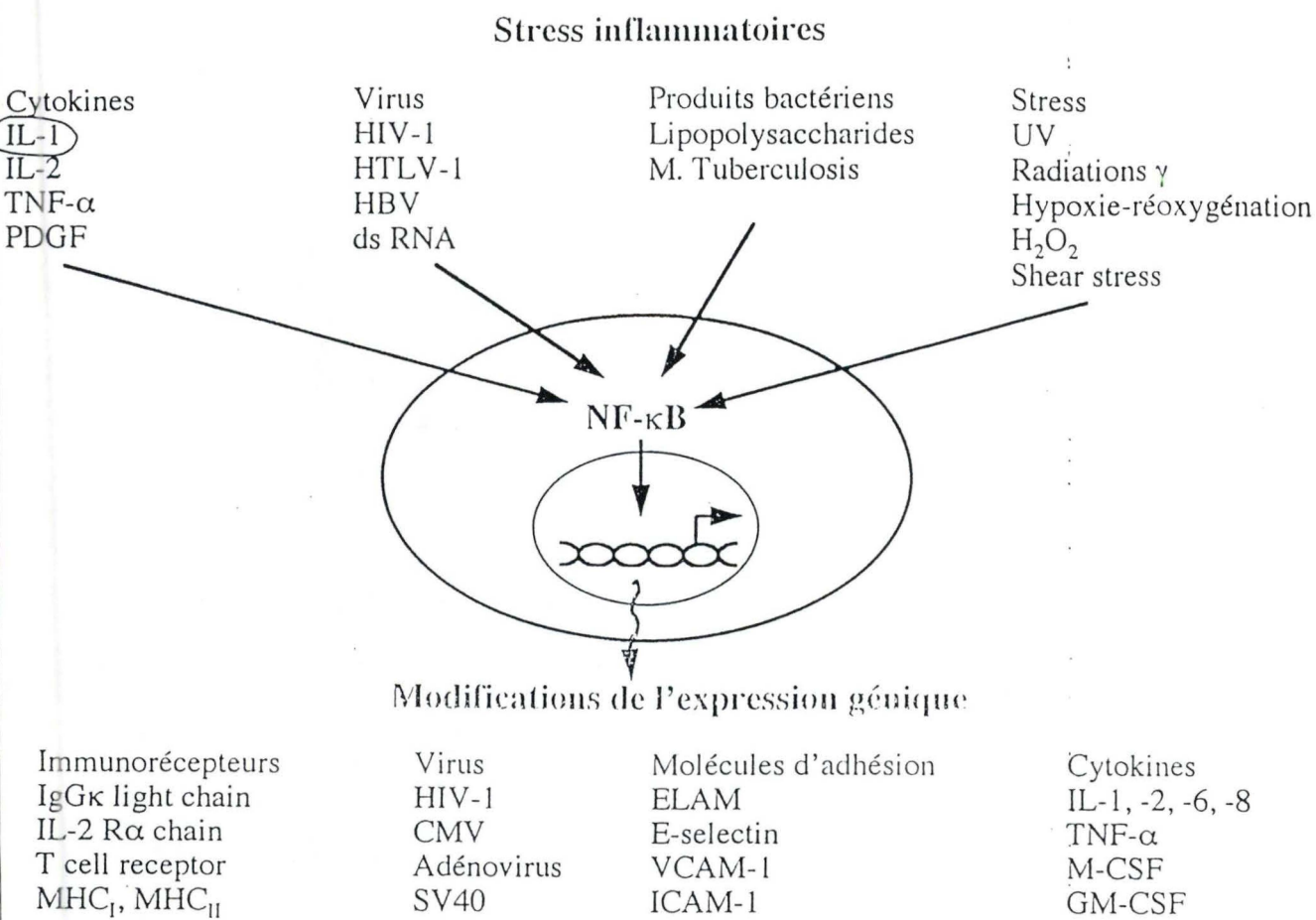


Figure I.3: Rôles du facteur de transcription NF κ B dans la régulation de l'expression génique, après différents stimuli pro-inflammatoires (d'après Renard, 1997).

2.2. Les récepteurs à l'IL-1

Il existe trois récepteurs différents à l'IL-1 : l'IL-1 RI qui est exprimé dans presque toutes les cellules; l'IL-1 RII principalement exprimé dans les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes B; et le récepteur T1/ST₂/Fit-1 (Dinarello, 1994).

Les portions extracellulaires de ces récepteurs sont homologues entre elles à 26-28 % et contiennent trois domaines Ig-like (immunoglobuline-like) (voir figure I.2). Bien que le domaine extracellulaire de T1/ST₂/Fit-1 partage 26 % d'homologie avec les deux autres récepteurs, il n'y a actuellement pas de preuves qu'il lie l'IL-1 (Dinarello, 1994).

L'IL-1 RI est exprimé constitutivement mais le nombre de récepteurs par cellule est bas. Malgré cela, une réponse biologique se déroule quand seulement 2 à 3 % des récepteurs sont occupés.

L'IL-1 RII serait quant à lui un récepteur "leurre". En se liant à l'IL-1, ce type de récepteur détournerait l'IL-1 du récepteur de type I. L'augmentation de l'expression d'IL-1 RII pourrait donc être un mécanisme pour diminuer l'effet biologique de l'IL-1 (Dinarello, 1994). Enfin, l'IL-1 RII, existe également sous une forme soluble qui jouerait le même rôle "leurre" circulant (figure I.2).

2.3. Transduction du signal liée à l'IL-1

Parce qu'il y a moins de 100 IL-1 RI par cellule et que moins de 5 % ont besoin d'être occupés pour donner une réponse biologique, la transduction du signal liée à l'IL-1 doit être hautement amplifiée (O'Neill, 1995).

Paradoxalement, alors que l'IL-1 est connue depuis bien longtemps, la transduction du signal lié à cette cytokine est restée longtemps mal comprise et controversée, même si on sait depuis longtemps que l'IL-1 est l'un des activateurs physiologiques du facteur NF- κ B. Ce dernier est reconnu pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux stress, qu'il s'agisse d'infections bactériennes, virales,... ou de stress liés aux radiations,... (figure I.3). Pour être activé, un facteur transcriptionnel dimérique, doit se libérer d'une unité

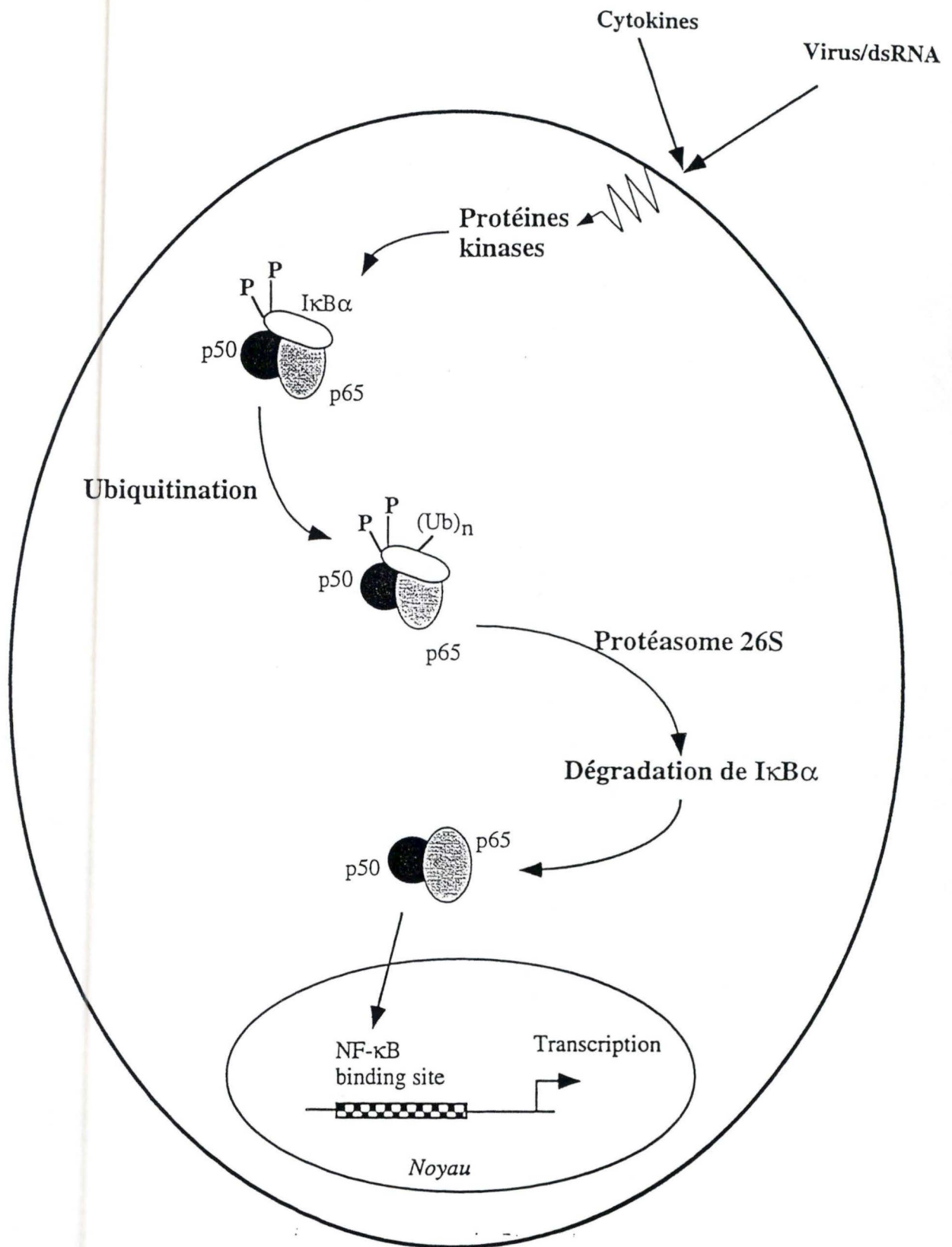


Figure I.4: Représentation schématique de l'activation du facteur NF-κB.

Des protéines kinases activées par divers stimuli phosphorylent IκBα sur les sérines 32 et 36. En réponse à cette phosphorylation, des chaînes d'ubiquitine sont liées aux lysines 21 et 22 de IκBα, marquant cette protéine pour être dégradée par le protéasome 26S. IκBα dégradée, le dimère p50/p65 pénètre dans le noyau et se lie aux motifs κB (d'après Renard, 1997).

inhibitrice IκB. Cela suppose la phosphorylation d' IκB, et sa dégradation par le protéasome 26 S (voir figure I.4). NF-κB peut alors gagner le noyau, grâce à une séquence de localisation nucléaire (NLS) et y active les gènes dont il reconnaît les promoteurs, via une séquence consensus caractéristique. La kinase responsable de la phosphorylation d' IκB est restée longtemps inconnue.

Nous allons donc passer en revue les différents mécanismes moléculaires proposés pour la transduction du signal lié à l'IL-1.

2.3.1. Les protéines G

Plusieurs auteurs ont suggéré que les protéines G pouvaient être importantes dans la transduction du signal à l'IL-1. Mais cette voie reste controversée car les données varient d'un modèle cellulaire à l'autre (Bankers-Fulbright *et al.*, 1996) et l'argument principal repose sur l'effet inhibiteur de la toxine pertussique modifiant les protéines G. Le rôle d'une protéine G sensible à la toxine pertussique dans la transduction du signal lié à l'IL-1 reste ambigu bien qu'un motif en accord avec un couplage à une protéine G soit présent au niveau du récepteur et qu'une mutation dans ce motif inhibe le signal (pour une revue: O'Neill, 1995).

2.3.2. l'AMP cyclique (AMPc)

Le rôle de l'AMPc dans la transduction du signal lié à l'IL-1 a été souvent proposé mais reste largement controversé. En effet, l'AMPc est augmentée sous IL-1 dans différents types cellulaires alors que dans d'autres cet effet n'est pas observé (pour une revue : Rossi, 1993). La raison de ces discordances n'est pas claire. Beaucoup d'études ont été menées sur des types cellulaires transformés et des différences entre types ou souches cellulaires ne sont pas à exclure.

En outre l'augmentation en AMPc pourrait être indirecte et suite à la production de prostaglandines induite par l'IL-1. En effet, les prostaglandines libérées peuvent à leur tour se fixer sur les récepteurs correspondants. Ceux-ci sont couplés via une protéine G à l'adénylate cyclase.

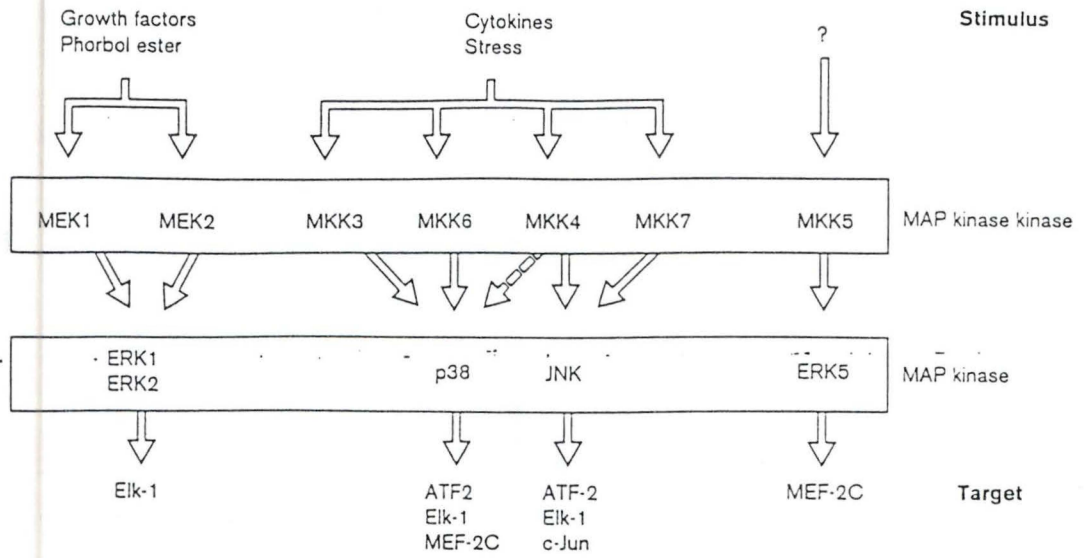


Figure I.5: Vue globale de différentes cascades des MAP kinases induites par différents stimuli dont l'IL-1(d'après Ip et Davis, 1998).

2.3.3. Phosphorylations protéiques

L'IL-1 modifie le pattern de phosphorylation protéique dans les cellules. De tels changements ont été étudiés surtout dans les fibroblastes (Guy *et al.*, 1994). Ces phosphorylations se font sur les résidus sérine et thréonine et sur un petit nombre de résidus tyrosine, grâce respectivement à de Ser/ Thr kinases et des Tyr kinases.

- PKC

Des membres de la famille des PKC ont été proposés comme candidats responsable des phosphorylations observées sous IL-1. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'IL-1 augmente le contenu en diacylglycérol (DAG) et la synthèse de phosphatidylsérine, activateur reconnu par plusieurs PKC. Il a été montré que certaines PKC étaient activées dans certains types cellulaires mais pas dans d'autres (pour une revue: Rossi, 1993). L'activation de ce type d'enzyme dans la transduction du signal lié à l'IL-1 reste donc controversée.

Une augmentation de l'activité des tyrosines kinases a également été observée dans différents types cellulaires et il a été suggéré que ces protéines appartenaient à la famille des MAP kinases (O'Neill, 1995).

- Tyrosines kinases

L'intervention de tyrosines kinases dans la transduction du signal à l'IL-1 a également été proposée. Cette hypothèse se base essentiellement sur les effets d'inhibiteurs de tyrosine kinases, tels les tyrphostines, l'hudimyéine A (O'Neill, 1995). Encore une fois, les résultats obtenus peuvent varier selon le type cellulaire.

- MAP kinases

Les cascades de MAP kinases identifiées à l'heure actuelle se sont multipliées bien qu'elles fonctionnent sur le même schéma (figure I.5).

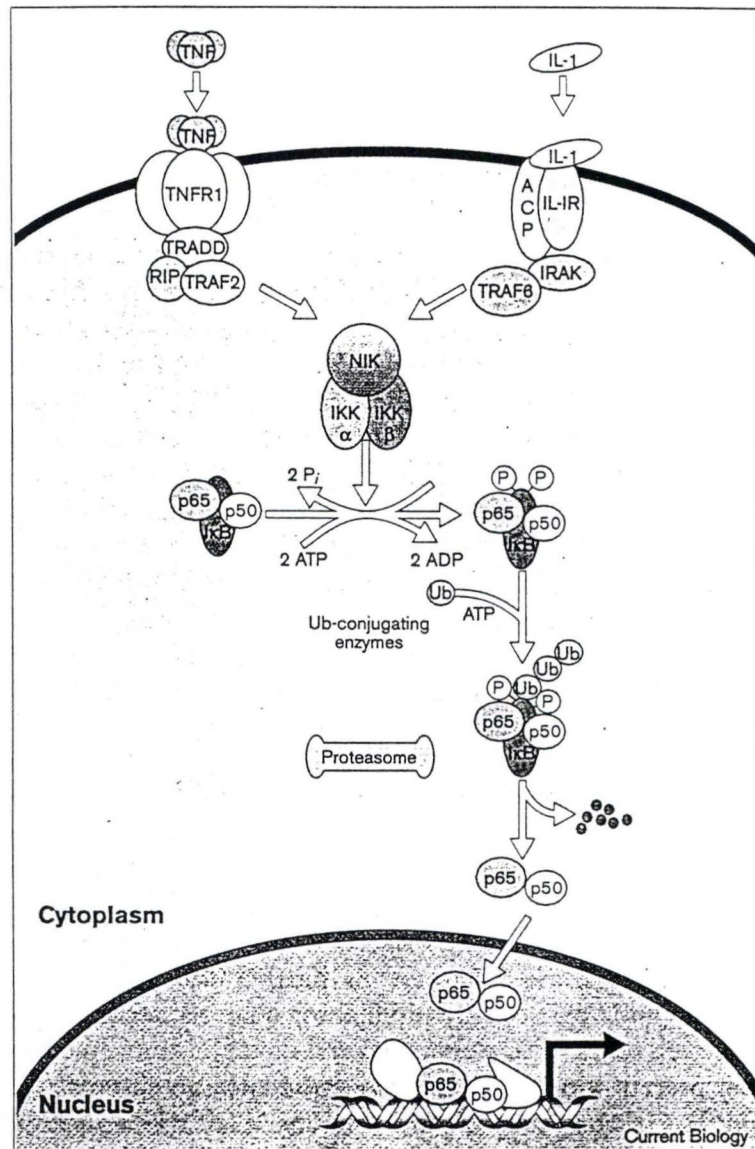


Figure I.6: Mécanisme de transduction du signal lié à l'IL-1, aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B lors d'une stimulation à l'IL-1 (d'après Baeuerle, 1998).

L'IL-1, ainsi que certains stress, active principalement la MAP kinase p38 et la MAP kinase p54, encore appelée SAPK (stress-activated protein kinase) ou JNK (jun amino-terminal kinase). p38 entraîne entre autre la phosphorylation de HSP-27, une protéine de choc thermique, mais la signification physiologique de cette phosphorylation reste inconnue. Selon certains auteurs (pour une revue, voir O'Neill, 1995), les MAP kinases p42/p44 (ERK1/ERK2), principalement activées par les facteurs de croissance, pourraient aussi être activées par l'IL-1.

- Le complexe IKK

Des découvertes récentes ont bouleversé notre compréhension de la transduction du signal à l'IL-1, en tous les cas en ce qui concerne les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation du facteur NF- κ B (pour une revue récente, voir Baeuerle, 1998).

Brièvement, une fois activé, le récepteur RI à l'IL-1 recrute une kinase appelée IRAK (IL-1 receptor associated kinase) et une protéine adaptative TRAF-6. TRAF-6, à son tour, interagit avec NIK (NF- κ B inducing kinase), une kinase appartenant à la famille des MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Enfin, NIK forme avec IKK- α et IKK- β (IKK=I κ B kinase) un complexe kinasique de haut poids moléculaire, indispensable pour la phosphorylation de I κ B (figure I.6).

2.3.4. Messagers secondaires lipidiques

L'IL-1 active plusieurs enzymes du métabolisme lipidique dans beaucoup de types cellulaires. Parmi ces enzymes, signalons tout d'abord les phospholipases A₂, relarguant de l'acide arachidonique. Les phospholipases C seraient également activées avec production de diacylglycérol (DAG). L'augmentation en DAG a effectivement été observée, bien que la source des lipides varie.

L'IL-1 provoque aussi l'augmentation de la synthèse de phosphatidylsérine, laquelle, en conjonction avec le DAG pourrait participer à l'activation de l'activité des PKC.

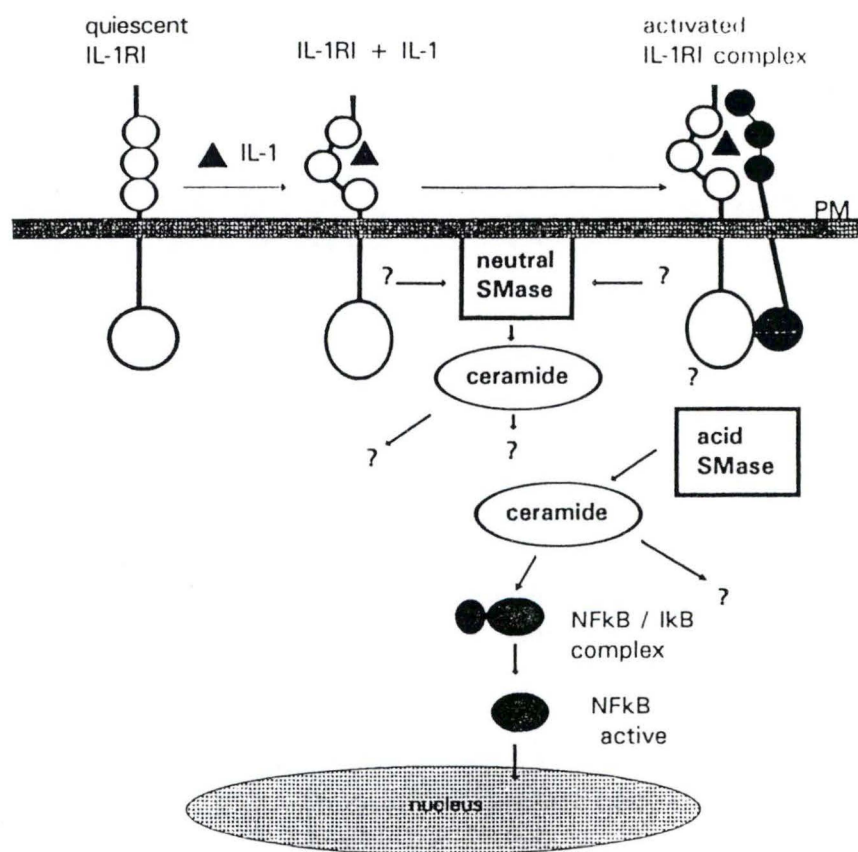


Figure I.7: Rôle des sphingomyélinases (SMase) acides et neutres dans la transduction du signal lié à l'IL-1 (d'après Martin et Falk, 1997).

Systemic Effects of IL-1

Central nervous system	Metabolic
Fever	Hypozincemia, hypoferrremia
Brain PGE-2 synthesis	Decreased cytochrome P450 enzyme
Increased ACTH	Increased acute phase proteins
Increased corticosteroid	Decreased albumin synthesis
Increased slow wave sleep	Increased survival rate in mice
Decreased appetite	Increased bacterial clearance
	Increased (high dose decreased) insulin
	Lipoprotein lipase inhibition
	Increased sodium excretion
Hematologic	Vascular wall
Neutrophilia	Increased leukocyte adherence
Lymphopenia	Increased PGI and PGE synthesis
Neutrophil TbxA generation	Increased platelet-activating factor
Tumor necrosis	Increased procoagulant activity
Bone marrow release	Increased plasminogen activator
Inhibitor	
	Hypotension
	Decreased systemic vascular resistance
	Decreased central venous pressure
	Increased cardiac output
	Increased heart rate
	Decreased blood pH (lactic acidosis)

Local Effects of Interleukin-1

Attraction of neutrophils, lymphocytes, and monocytes (*in vivo*)
 Basophil histamine release
 Eosinophil degranulation
 Proliferation of dermal fibroblasts
 Increased collagen synthesis
 Increased collagenase production
 Chronodrocyte protease release
 Induction of fibroblast and endothelial GM-CSF activity
 Production of PGE₂ in dermal and synovial fibroblasts
 Increased neutrophil and monocyte thromboxane synthesis
 Cytotoxic for human melanoma cells
 Cytotoxic for human beta islet cells (insulin producing)
 Cytotoxic for thyrocytes
 Increased bone resorption (osteoclast activating factor)
 Stimulation of fibroblast interferon-beta synthesis
 Stimulation of hybridoma growth factor (IL-6) synthesis
 Keratinocyte proliferation
 Mesangial cell proliferation
 Gliosis

Immunologic Effects of IL-1

T-cell activation
 IL-2 production
 Increased IL-2 receptor number or binding
 B-cell activation
 Synergism with B-cell growth factor (BSF-1/IL-4)
 Induction of interferon-beta-2/IL-6/B-cell-stimulating factor-2
 Increased IgM synthesis
 Natural killer cells
 Synergism with IL-2 and interferon for tumor killing
 Increased natural killer cell-tumor binding
 Production of IL-1 and TNF from natural killer cells
 Increased lymphokine production
 IL-2, IL-3, GM-CSF
 Interferon-beta-1, Interferon-beta-2 (IL-6)
 Interferon-gamma
 Leukocyte inhibitory migration factor
 Macrophage cytotoxicity
 Increased IL-1 production
 Increased TNF production

Tableau I.1: Propriétés biologiques de l'IL-1 (d'après Dinarello et Savage, 1989).

L'IL-1 induit aussi le néosynthèse de cyclooxygénase inductible ou COX-2, avec production concomitante de PGE₂.

Récemment, les céramides provenant de l'hydrolyse de sphingomyéline ont également été proposés comme participant à la transduction du signal à l'IL-1 (Pour une revue: Rossi, 1993) (figure I.7).

2.4. Effets biologique de l'IL-1

L'IL-1 possède bon nombre d'effets biologiques : on distingue des effets neurologiques, métaboliques et endocriniens; il agit comme un inducteur de cytokines, comme un médiateur de l'inflammation; il a également des effets hématopoiétiques (voir tableau I.1) (Dinarello, 1989).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons plus à ses effets sur les cellules endothéliales. L'IL-1 oriente les fonctions des cellules endothéliales dans un sens prothrombotique et proinflammatoire (Mantovani *et al.*, 1992).

2.4.1. Effets sur l'hémostase

Les propriétés antithrombotiques des cellules endothéliales sont profondément altérées par l'exposition à l'IL-1. La formation de thrombine est facilitée par la synthèse de nouvelle thromboplastine et par une suppression de la voie anti-coagulante médiée par la thrombomoduline/protéine C. De plus, l'IL-1 induit la synthèse de PAF. Celui-ci est un activateur des plaquettes et des leucocytes et est un vasoconstricteur. L'IL-1 perturbe aussi les propriétés fibronolytiques des cellules endothéliales en augmentant la production de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). Cette cytokine peut également stimuler la synthèse de prostacycline et inhiber ainsi l'agrégation plaquettaire.

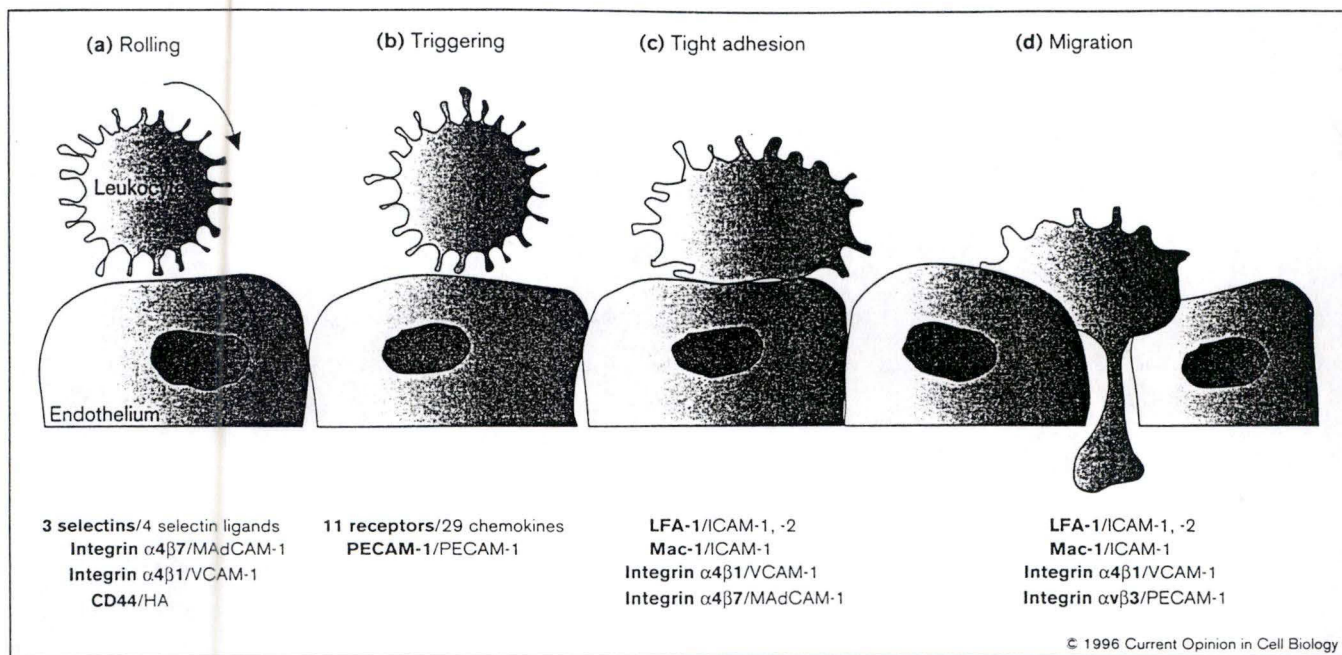


Figure I.8: Etapes et mécanismes impliqués dans le recrutement des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire (d'après Duron *et al.*, 1996).

2.4.2. Effets sur le recrutement des cellules circulantes

L'IL-1 cause l'infiltration des leucocytes dans les tissus; les cellules endothéliales produisent des chémoattractants qui activent et attirent les leucocytes en exprimant des molécules d'adhésion et en changeant le flux sanguin.

Les cellules endothéliales expriment faiblement ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1 (Comme vu précédemment). L'IL-1 augmente la synthèse de ICAM-1 et VCAM-1 mais pas de ICAM-2. De plus, la cytokine induit la synthèse de ELAM-1 (ou sélectine-E), membre de la famille des sélectines. Cette induction joue un rôle uniquement dans les premières phases du recrutement des leucocytes (figure I.8).

2.4.3. Effets sur le tonus vasculaire et la perméabilité

L'IL-1 induit dans les cellules endothéliales la production de prostacycline, un puissant vasodilatateur; il n'est donc pas étonnant que l'administration par intraveineuse d'IL-1 induise une hypotension significative (Platanias et Vogelzang, 1990).

L'induction d'oxyde nitrique peut aussi être vu comme une réponse locale ou systémique vasodilatatrice. Il y a aussi induction d'endothéline, un régulateur du tonus vasculaire, et une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales aux macromolécules.

Après avoir décrit l'IL-1 et sa biologie, nous allons maintenant passer à l'étude des phospholipases A₂ et de leur activité.

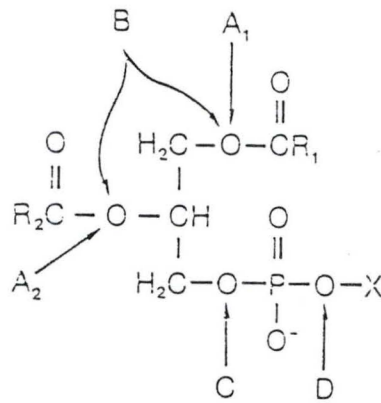


Figure I.9: Sites d'hydrolyse des phospholipides par les phospholipases majeures (d'après Vance et Vance, 1996).

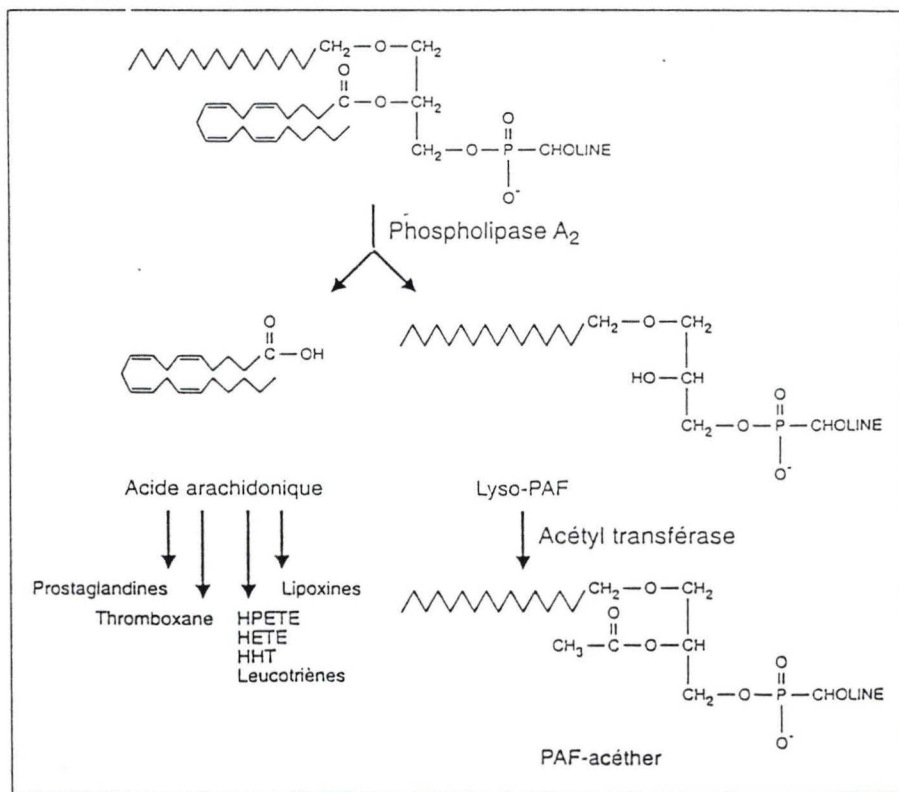


Figure I.10: Rôle de la PLA₂ dans la production de médiateurs lipidiques (d'après Fourcade *et al.*, 1996).

Table I. Characteristics of the major groups of phospholipase A₂

Group	Sources	Location	Size (kDa)	Ca ²⁺ requirement	Disulfides	Molecular characteristics
A	Cobras, kraits	Secreted	13-15	mM	7	His-Asp pair
B	Porcine/human pancreas	Secreted	13-15	mM	7	His-Asp pair, elapid loop
A	Rattlesnakes, vipers, human synovial fluid/platelets	Secreted	13-15	mM	7	His-Asp pair, carboxyl extension
B	Gaboon viper	Secreted	13-15	mM	6	His-Asp pair, carboxyl extension
C	Rat/mouse testes	Secreted	15	mM	8	His-Asp pair, carboxyl extension
	Bees, lizards	Secreted	16-18	mM	5	His-Asp pair
	Raw 264.7, rat kidney, human U937/platelets	Cytosolic	85	< μM		Ser228 in GLSGS consensus sequence, Arg200, Asp549 required; Ser505 phosphorylation site; CaL 8 domain
	Human/rat/mouse heart/lung, P388D ₁ macrophages	Secreted	14	mM	6	His-Asp pair, no elapid loop, no carboxyl extension
	P338D ₁ macrophages, CHO cells	Cytosolic	80-85	None		GxSxG consensus sequence, ankyrin repeats, 340 kDa complex
	Human plasma	Secreted	45	None		GxSxG consensus sequence, Ser273, Asp296, His351
	Bovine brain	Cytosolic	29	None		Ser47
	Marine snail	Secreted	14	< mM	6	His-Asp pair

Tableau I.2: Caractéristiques des principaux groupes de phospholipases A₂ (d'après Dennis, 1997).

3. Les phospholipases A₂

Les phospholipases sont un groupe d'enzymes ubiquistes qui partagent la propriété d'hydrolyser un substrat commun, les phospholipides. Elles diffèrent entre elles par leur site d'action sur les phospholipides ainsi que leur régulation. Elles sont nécessaires tant au niveau de l'hémostase des membranes, qu'au niveau de la digestion des aliments et la formation de molécules bioactives.

La classification de ces enzymes est basé sur le site d'attaque des phospholipides (figure I.9). Les phospholipases A sont des acyl hydrolases classées suivant que l'hydrolyse se fasse au niveau de la liaison ester 1-acyl (PLA₁) ou de la liaison ester 2-acyl (PLA₂). D'autres phospholipases hydrolysent les 2 groupes acyl et sont appelés phospholipase B (PLB). Le clivage de la liaison glycérophosphate est catalysé par la phospholipase C (PLC) tandis la phospholipase D (PLD) clive le phospholipide en libérant l'acide phosphatidique d'une part et la choline par exemple (Vance et Vance, 1996).

Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux PLA₂.

3.1. Les phospholipases A₂ (PLA₂)

A l'origine, les PLA₂ ont été identifiées comme des enzymes particulièrement abondantes dans les venins de serpent où elles contribuent aux propriétés lytiques de ceux-ci et dans le suc pancréatique, où elles jouent un rôle digestif évident, doublé d'un rôle toxique dans le premier cas. Mais l'intérêt biologique de ces enzymes repose également sur leur implication dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques (figure I.10) (Fourcade *et al*, 1996), dont plusieurs jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal. C'est le cas par exemple du PAF et des éicosanoïdes. Mais les PLA₂ jouent également un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides et le remodelage membranaires. Leur action sur les hydroperoxydes lipidiques est également indispensable.

Les PLA₂ catalysent l'hydrolyse de la liaison de la position sn-2 des phospholipides pour produire des acides gras et des lysophospholipides. Elles constituent une famille d'enzymes assez hétérogène, différant par leur site d'action, leur poids moléculaire mais aussi par leur propriétés biochimiques, telle que la dépendance ou non vis-à-vis du calcium (tableau I.2).

Elles font l'objet de nombreux travaux étant donné leurs rôles possibles dans les maladies inflammatoires, entre autres.

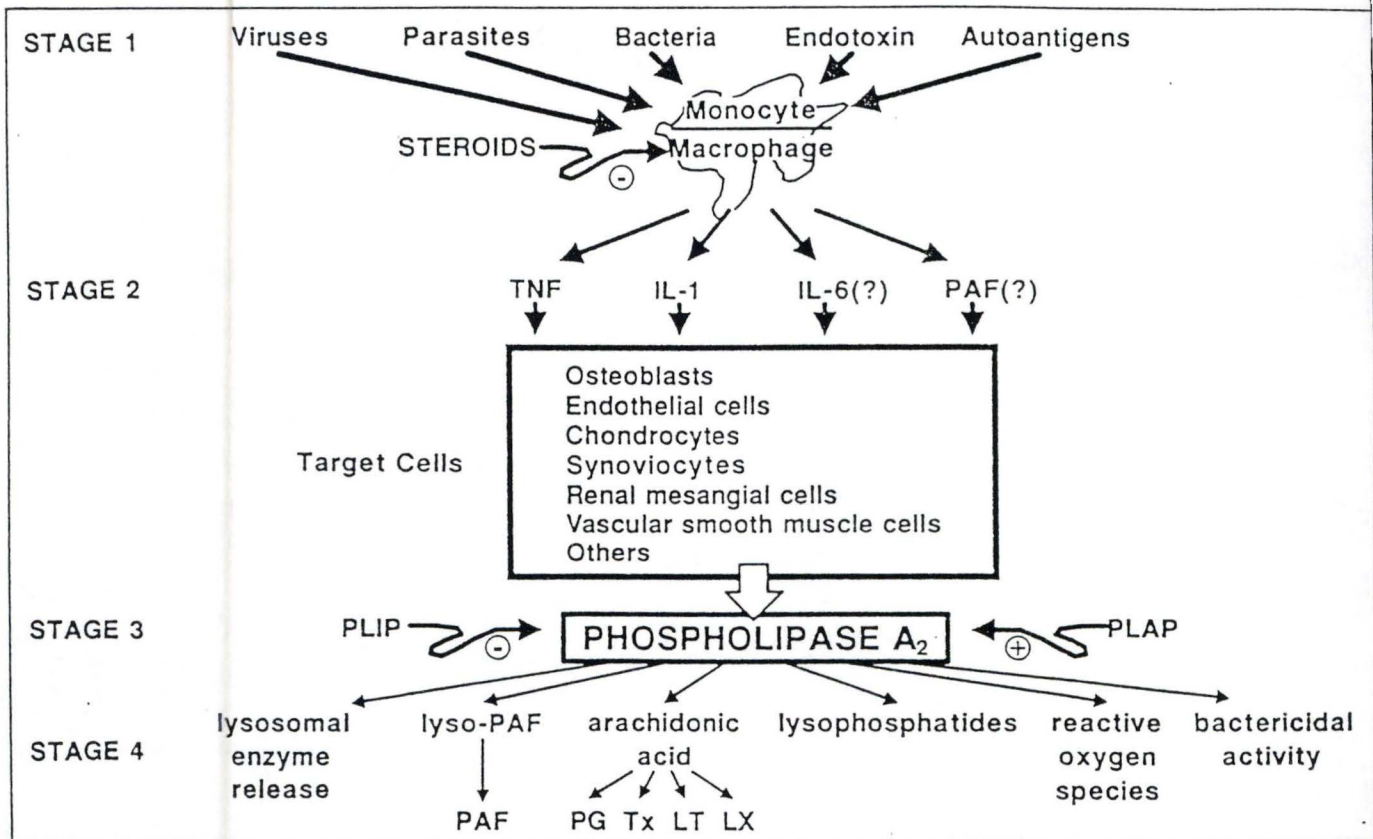


Figure I.11: Représentation schématique des différentes étapes du processus inflammatoire et ses relations avec les PLA₂ (d'après Pruzanski et Vadas, 1991).

Tx: thromboxanes; LT: leucotriènes; LX: lipoxins; PLIP: phospholipase inhibitory protein; PLAP: phospholipase activating protein.

Dans le cadre de ce travail, nous nous limiterons à 3 groupes de PLA₂ : les PLA₂ solubles ou sécrétées, les PLA₂ cytosoliques et les PLA₂ Ca⁺⁺ indépendantes.

3.1.1. Les PLA₂ solubles (sPLA₂)

Les PLA₂ sécrétées sont fortement homologues; elles ont en commun un faible poids moléculaire (14 kDa), la présence d'au moins 5 ponts disulfures qui les rend particulièrement stables et d'un peptide signal (Kudo *et al*, 1993). Celui-ci permet leur sécrétion par une voie classique mais sans glycosylation. On a proposé comme mécanisme catalytique le mécanisme suivant: la paire Asp99-His48 prend un proton à l'eau, produisant un groupe hydroxyle nucléophile qui attaque la liaison ester. Le calcium interagit avec les groupes phosphates et carbonyle de la liaison ester aussi bien qu'avec le carboxyle de l'Asp49 et lie les acides gras libres formés jusqu'à ce que les acides gras diffusent du site actif (Vance et Vance, 1996). L'état de transition est stabilisé par un ion Ca⁺⁺, qui participe donc directement au fonctionnement du site actif et qui est requis à une concentration de l'ordre du millimolaire (Fourcade *et al*, 1996).

La classification en différents types de sPLA₂ repose sur la position de certains ponts disulfures (Vance et Vance, 1996) mais il existe entre autre deux groupes majeurs de sPLA₂: le premier qui regroupe les sPLA₂ pancréatiques (qui ne sont pas abordées dans ce travail) et le second qui comprend les sPLA₂ non pancréatiques.

Ces dernières années, la majorité des travaux ont été consacré aux sPLA₂ non pancréatiques. Elles ont plusieurs sites de production et sont parfois synthétisées de manière constitutive mais le plus souvent en réponse à des cytokines pro-inflammatoires dont les plus puissantes semblent être le TNF α et l'IL-1. L'AMP cyclique et des facteurs de croissance modulent également l'expression de la sPLA₂.

Les sPLA₂ semblent jouer un grand rôle dans le processus inflammatoire (figure I.11) (Pruzanski et Vadas, 1991) et seraient, d'après certains auteurs, responsables de la production de médiateurs lipidiques.

Les sPLA₂ ont été localisées dans les compartiments cellulaires et extracellulaires d'exsudats inflammatoires; ce qui est corrélé à leur rôle dans la destruction de phospholipides bactérien pendant la réponse inflammatoire (Wright *et al.*, 1990).

Les sPLA₂ pourraient également rester associées à la membrane cellulaire. L'enzyme, une fois sécrétée, pourrait être retenue à la surface cellulaire, probablement en se liant aux protéoglycans de type heparan sulfate (Murakami *et al.*, 1993).

D'après Fourcade et ses collaborateurs (1996), l'asymétrie phospholipidique pourrait moduler l'activité de la sPLA₂. Une caractéristique de la sPLA₂ est sa préférence pour les phosphatidyléthanolamines et les phospholipides anioniques; en revanche, l'enzyme est peu active sur les phosphatidylcholines. Lorsqu'on tient compte de l'asymétrie des membranes, on constate que les meilleurs substrats de la sPLA₂ sont confinés dans le feuillet interne des membranes. La régulation se passerait donc comme suit : la sPLA₂ serait peu active vis-à-vis des phospholipides du feuillet externe. Lors d'une entrée massive de Ca⁺⁺ dans la cellule, des phospholipides du feuillet interne sont transférés massivement vers le feuillet externe. L'expansion de celui-ci aux dépens du feuillet interne est responsable d'une évagination qui se solde par l'émission d'une microvésicule ayant perdu son asymétrie phospholipidique et sur laquelle les sPLA₂ peuvent alors agir. L'altération de cette asymétrie membranaire est réversible dans les cellules, grâce à l'action de l' amino-phospholipide translocase ou flippase.

3.1.2. Les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂)

Les PLA₂ cytosoliques sont des enzymes distinctes des sPLA₂, dépendantes du calcium, avec un poids moléculaire de 85 kDa. Elles clivent préférentiellement les phospholipides possédant spécifiquement l'acide arachidonique en position sn-2 (Clark *et al.*, 1991) et de ce fait, certains auteurs lui accordent un rôle privilégié dans la biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes, dérivés métaboliques de l'acide arachidonique, respectivement via les cyclooxygénases (COX) et lipoxygénases.

Les cPLA₂ peuvent être activées par une large variété de stimuli tels que des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF α , le MCSF... Vu cette diversité, on peut s'attendre à ce que cette enzyme participe à bon nombre de processus cellulaires (Clark *et al.*, 1995).

Des études ont d'ailleurs montré que la prostaglandine PGF_{2 α} agit comme amplificateur autocrine, en augmentant l'expression de la cPLA₂ et de la COX-2, forme inductible de COX, ce qui génère une boucle de feed back positif au niveau de la voie de synthèse des prostaglandines (Murakami *et al.*, 1997).

Les cPLA₂ jouent également un rôle dans l'activation plaquettaire; d'ailleurs les plaquettes expriment un taux significatif de cPLA₂ (Kramer *et al.*, 1990).

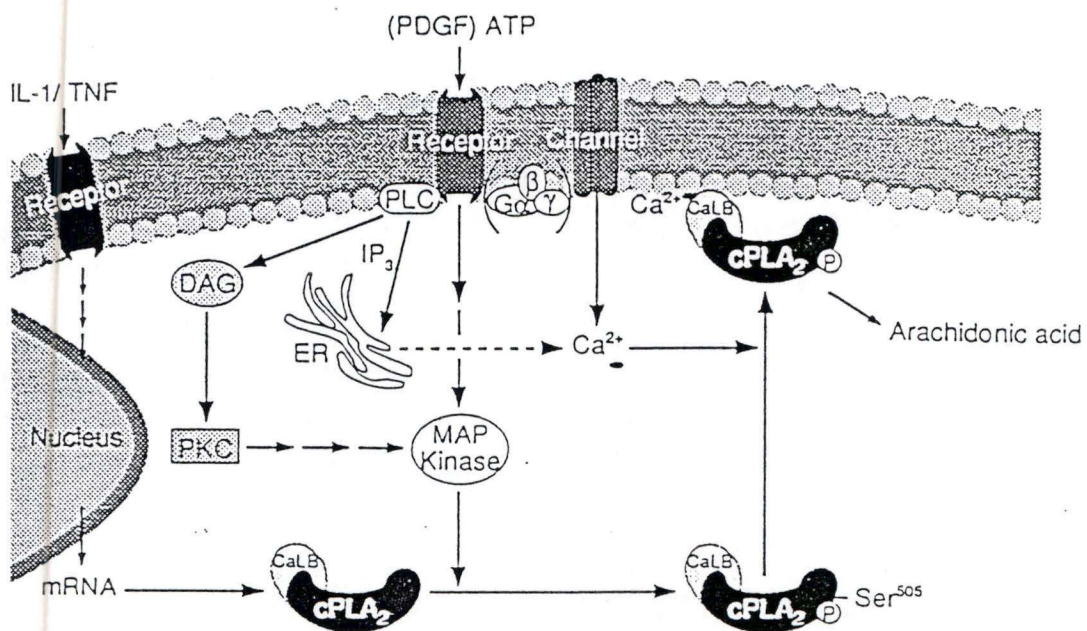


Figure I.12: Mécanisme hypothétique d'activation de la cPLA₂ (d'après Clark *et al.*, 1995).

Il est aussi évident que l'acide arachidonique joue un rôle dans la prolifération cellulaire. La cPLA₂ peut être induite par différents mitogènes dont l'EGF, le PDGF, le bFGF (Clark *et al.*, 1995). Il a d'ailleurs été montré que les cPLA₂ et non les sPLA₂, influencent la prolifération des cellules musculaires lisses (Anderson *et al.*, 1997).

Les cPLA₂ sont activées par des quantités micromolaires de Ca⁺⁺ mais à l'inverse des sPLA₂, le Ca⁺⁺ ne participe pas au fonctionnement du site actif (Fourcade *et al.*, 1996). Ce Ca⁺⁺ interagit avec un domaine retrouvé dans d'autres protéines de la signalisation cellulaire et responsable de leur association aux membranes, le Ca LB domain. Quand l'enzyme est soumise à du Ca⁺⁺, elle est transportée du cytosol jusqu'aux membranes où elle interagit avec les phospholipides. Cette translocation est médiée par le domaine Ca LB (Clark *et al.*, 1991). D'autres études suggèrent que les cPLA₂ pourraient également être dans le réticulum endoplasmique (Clark *et al.*, 1995).

Clark *et al.* (1995) ont proposé un modèle de régulation de la cPLA₂ (figure I.12). Dans ce modèle, l'enzyme est régulée par de multiples voies incluant celles qui contrôlent la concentration en Ca⁺⁺, les phosphorylations et le taux d'expression de l'enzyme. La cPLA₂ est rapidement activée par une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca⁺⁺, mais elle est aussi phosphorylée par les MAP kinases, dont les p42/p44 et la p38 selon le type cellulaire et les agents stimulants (Robinson et Cobb, 1997). Quand les cellules sont stimulées avec des activateurs comme l'ATP ou le PDGF, une phospholipase C (PLC) est activée via un processus dépendant ou non des protéines G, conduisant à la production de diacylglycérol et inositols triphosphate. Le diacylglycérol active certaines protéine kinases C (PKC) endoplasmiques et les inositols phosphates mobilisent le Ca⁺⁺ à partir du réticulum. Alternativement, l'augmentation intracellulaire en Ca⁺⁺ peut également résulter d'un flux de Ca⁺⁺ provenant du milieu extracellulaire. L'augmentation de Ca⁺⁺ agit sur le CaLB domain pour permettre le transport de la cPLA₂ du cytosol jusqu'à la membrane où les substrats phospholipidiques sont localisés. Cette étape est essentielle pour l'activation de l'enzyme. L'activation de la MAP kinase peut se passer par un mécanisme dépendant ou non de la PKC. Dans beaucoup de cas, cette voie est dépendante des protéines G. La MAP kinase activée phosphoryle la cPLA₂ sur la sérine 505, augmentant ainsi l'activité enzymatique de la cPLA₂. L'activation totale de la cPLA₂ requiert donc l'augmentation en Ca⁺⁺ cytosolique ainsi que la phosphorylation sur la sérine 505.

Dans les réponses à plus long terme, l'activité de la cPLA₂ peut aussi être contrôlée par un changement dans le taux d'expression en réponse à des cytokines ou à certains facteurs de croissance.

3.1.3. Les PLA₂ indépendantes du Ca⁺⁺ (iPLA₂)

Ce type de PLA₂ n'est pas régulé par le Ca⁺⁺, à l'inverse des deux groupes précédents et reste moins bien connue que les autres PLA₂. Plusieurs iPLA₂ furent découvertes, chacune avec des propriétés différentes.

Gassama-Diagne *et al.* (1989), purifièrent une iPLA₂ dans l'intestin de cobaye ayant une double activité : celle de PLA₂ et celle de lysophospholipase, laquelle pourrait être impliquée dans la digestion des phospholipides, convertissant le diacyl phosphorylcholine en phosphorylcholine glycérol. Cette PLA₂ fait un poids moléculaire de 97 kDa.

Une autre iPLA₂ fut purifiée, mais sans préférence pour l'acide arachidonique en position sn-2 ou sn-1. Elle est activée par l'ATP, possède aussi secondairement une activité lysophospholipase et une activité PLA₁. Elle pourrait jouer un rôle central dans le métabolisme des phospholipides (Ackerman *et al.*, 1994).

Une iPLA₂ a également été décrite dans le coeur de hamster. Cette enzyme hydrolyse les acides gras aussi bien en position sn-1, qu'en position sn-2. Son poids moléculaire est de 14 kDa (Cao *et al.*, 1987).

Il existe également une iPLA₂ myocardiale. Elle est sensible à l'ATP, a un poids moléculaire de 4000 daltons et a une préférence pour les acides gras en position sn-1 (Hazen *et al.*, 1990).

Il a été démontré sur un modèle de cellules endothéliales de cochon stimulées avec du vanadate qu'il y avait une augmentation d'une activité PLA₂ requérant une synthèse de protéines *de novo* et pas de phosphorylation. Les résultats obtenus suggèrent la présence d'une protéine G liée à une voie indépendante du Ca⁺⁺. Ces résultats sont significatifs car ils mettent l'accent sur un mécanisme par lequel l'activation d'une protéine G conduit à la synthèse d'une iPLA₂ (Bucklet et Whorton, 1994).

3.2. Effets de l'IL-1 sur les phospholipases A₂

Comme nous l'avons vu précédemment, l'IL-1 exerce de nombreux effets biologiques dont celui de favoriser le métabolisme de l'acide arachidonique. Mais les mécanismes moléculaires et la nature des PLA₂ impliquées sont loin d'être clairement établis et on constate des divergences selon les modèles cellulaires étudiés.

Par exemple, il a été démontré que l'IL-1 était capable de stimuler la sécrétion d'une PLA₂ par des fibroblastes synoviaux humains (Gilman *et al*, 1988), tout comme par des chondrocytes de lapins (Chang *et al*, 1986) ainsi que par des cellules endothéliales bovines et des fibroblastes de poumon humains (Jackson *et al*, 1993).

Certaines équipes ont essayé de préciser quel(s) type(s) de PLA₂ étai(en)t activée(s), mais ce travail est rendu difficile par le fait que les données semblent très variables, voire contraires d'un modèle cellulaire à l'autre.

Lin *et al* (1992) ont démontré que dans des fibroblastes de poumons, l'IL-1 induisait l'augmentation de l'activité de la PLA₂ cytosolique (cPLA₂) et non de la PLA₂ soluble (sPLA₂), cette cPLA₂ étant importante dans la production d'eicosanoïdes, également induite par l'IL-1. Des données similaires ont été obtenues dans des macrophages alvéolaires de cochon d'Inde (Mugnai *et al*, 1997).

Par contre, dans des cellules mésangiales, l'IL-1 stimule la synthèse de prostaglandines par l'intermédiaire d'une PLA₂ soluble non pancréatique (Nakazato *et al*, 1991). Il en est de même dans des cellules ostéoblastiques, où l'IL-1 augmente la synthèse et la sécrétion de ce même groupe de PLA₂ (Vadas *et al*, 1991).

On constate donc que même pour un activateur bien connu comme l'IL-1, fonctionnant via un récepteur et une cascade de transduction identifiée, l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique par les PLA₂ est loin d'être comprise au niveau moléculaire. Or, l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique par les PLA₂ joue probablement un rôle important dans plusieurs pathologies vasculaires. Au laboratoire, il a été clairement démontré que les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) sous hypoxie, voyaient leur métabolisme augmenter. Ce modèle cellulaire est exploité pour comprendre l'origine des veines variqueuses. Plus récemment, des cultures de cellules endothéliales d'artère coronaire humaine ont également été lancées, dans le cadre d'un programme PAI centré sur les processus d'athérogenèses.

Après avoir passé en revue les trois groupes de PLA₂, nous allons donc aborder ces deux pathologies pour lesquelles nous tenterons d'étudier le rôle des PLA₂.

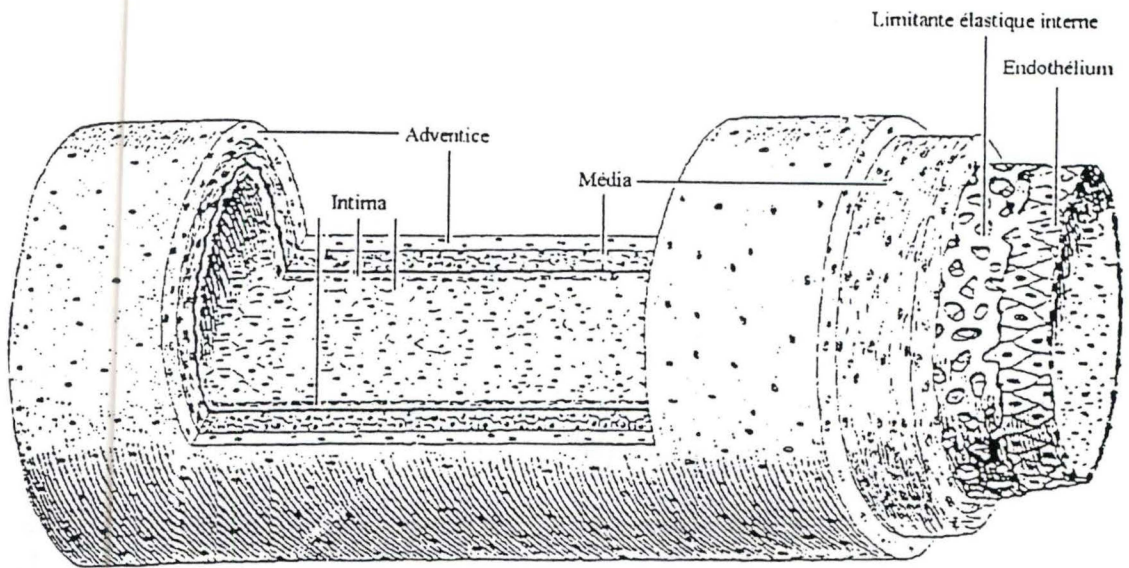


Figure I.13: Schéma d'une artère de moyen calibre (artère musculaire) montrant les différentes tuniques (d'après Junqueira et Carneiro, 1971).

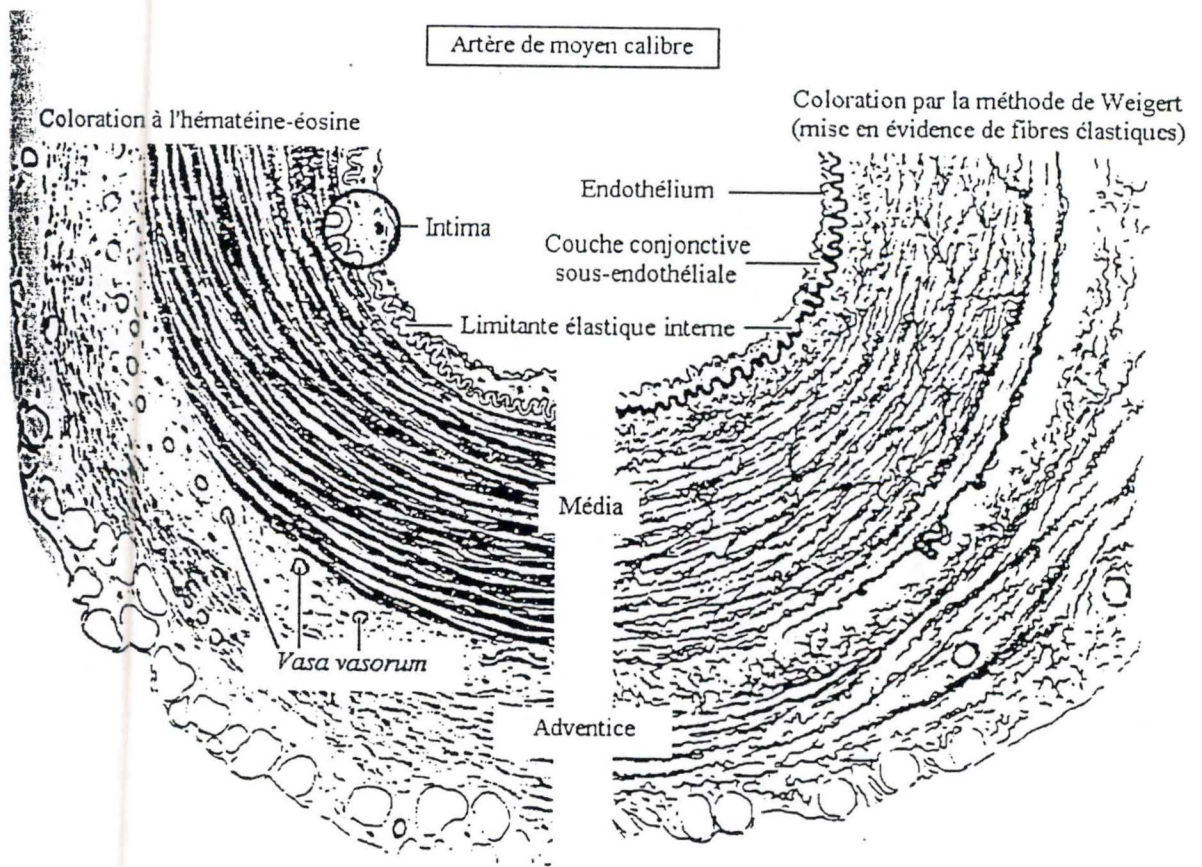


Figure I.14: Schémas comparatifs d'une artère de moyen calibre, par coloration classique à l'hématéine-éosine (à gauche), et par la coloration selon Weigert (à droite), qui révèle spécifiquement les fibres élastiques (d'après Junqueira et Carneiro, 1971).

4. L'athérosclérose

Dans nos pays industrialisés, l'athérosclérose peut être considérée comme étant responsable de la mort de plus de 50 % de la population. Ces personnes meurent de différentes complications liées à la maladie : angine de poitrine, infarctus du myocarde, cardiopathies ischémiques, arrêts cardiaques, ischémie périphérique, embolie pulmonaire et cérébrale, accidents vasculaires...

L'athérosclérose consiste en un rétrécissement progressif des artères de moyens et grands calibres, dans lesquelles l'intima devient plus épaisse avec des accumulations de macrophage, de cellules musculaires lisses, de lymphocytes et de lipides. Ces éléments forment la plaque athérosclérotique.

4.1. Les artères et leur classification

Toutes les artères suivent un modèle commun d'organisation. Leur paroi est constituée de trois tuniques: l'intima, la média et l'adventice (figures I.13 et 14).

La structure et l'épaisseur relative de chacune des trois tuniques varient selon le type et la taille du vaisseau. Les vaisseaux artériels peuvent être classés en trois groupes : les grandes artères ou artères élastiques, les petites et moyennes artères contenant surtout des éléments musculaires et les artérioles.

Dans la pathologie qui nous intéresse, ce sont les grandes artères élastiques qui sont principalement touchées.

4.2. Les lipoprotéines et le transport du cholestérol

Au niveau biochimique, le développement de l'athérosclérose est fortement lié au métabolisme du cholestérol et à son transport. Celui-ci est transporté grâce à des lipoprotéines plasmatiques.

Les lipides, dont le cholestérol, étant insolubles dans l'eau, doivent se complexer avec des protéines, les apolipoprotéines, ce qui forme les lipoprotéines. Les apolipoprotéines

	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 I.3: Tableau comparatif des quatre classes de lipoprotéines plasmatiques et leur caractéristiques (d'après Rawn, 1990).

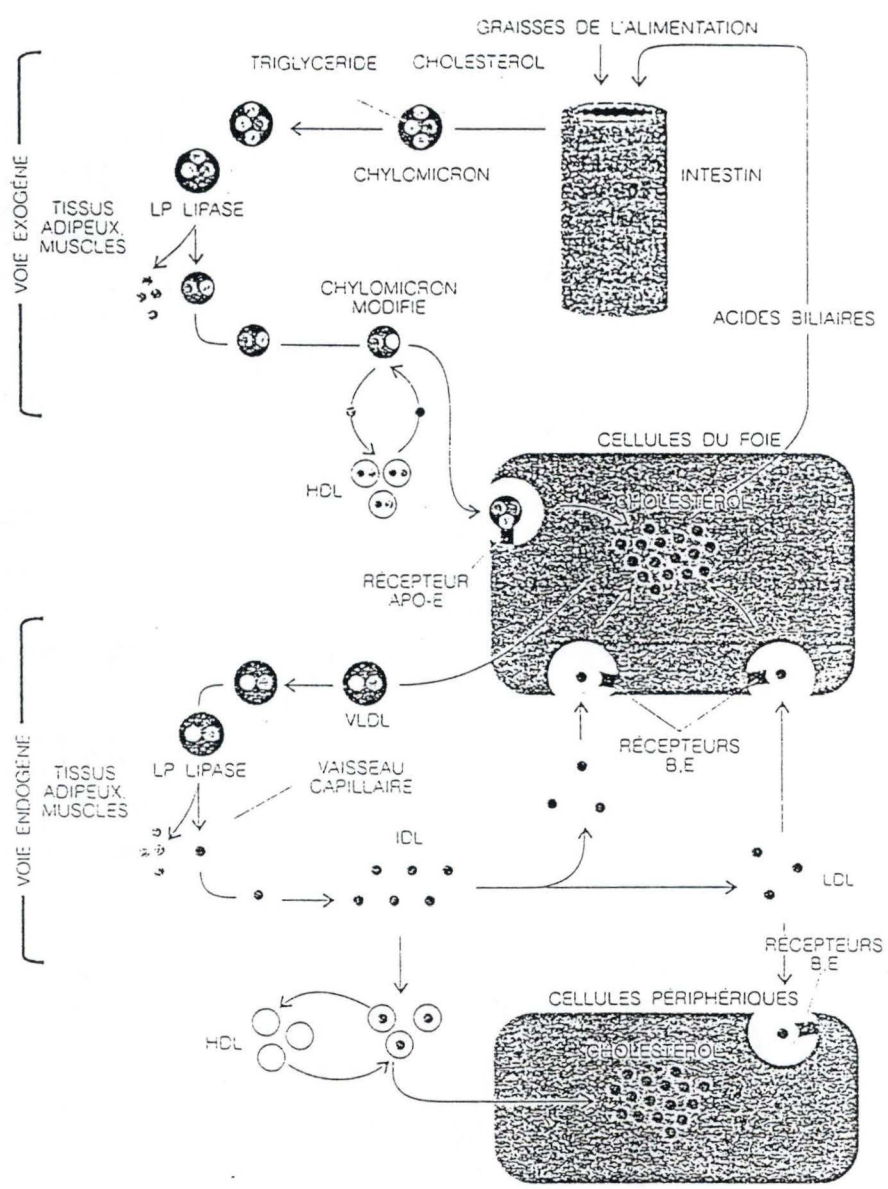


Figure I.15: Voie métabolique du transport du cholestérol (d'après Fruchart, 1992).

servent à structurer l'ensemble des complexes lipoprotéiniques et jouent également le rôle de ligands de récepteurs portés par les cellules.

L'apolipoprotéine B est l'apolipoprotéine majeure des lipoprotéines athérogènes, les LDL et VLDL tandis que l'apolipoprotéine A est la principale apolipoprotéine des lipoprotéines anti-athérogènes, les HDL.

Il existe 4 types principaux de lipoprotéines qui sont différentes par leur densité, leur composition lipidique, leur taille ainsi que leur proportion relative protéines/lipides (voir tableau I.3).

- les lipoprotéines de haute densité ou HDL (High Density Lipoprotein).
- les lipoprotéines de faible densité ou LDL (Low Density Lipoprotein).
- les lipoprotéines de très faible densité ou VLDL (Very Low Density Lipoprotein).
- les chylomicrons, particules lipoprotéiniques de très grandes tailles et de très faibles densités.

Toutes ces lipoprotéines présentent la même structure : un noyau central formé de triglycérides et d'esters de cholestérol et une gaine faite de phospholipides, de cholestérol et d'apoprotéines périphériques et structurales.

4.2.1. Les chylomicrons et les VLDL

Les acides gras et les monoacylglycérols sont estérifiés en triacylglycérol dans les cellules épithéliales de l'intestin; ces triacylglycérols s'associent alors aux esters d'acides gras du cholestérol, au cholestérol libre, aux phospholipides et à l'apolipoprotéine B-48, pour constituer les chylomicrons qui passent dans la lymphe et le sang (Rawn, 1990) .

Les VLDL sont principalement synthétisés par le foie à partir des triglycérides d'origine endogène (figure I.15).

Chylomicrons et VLDL vont subir l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) qui dégradera leurs triglycérides en acides gras et glycérol. La LPL est activée par l'apolipoprotéine (apo) CII cédée préalablement par les HDL, véritables réservoirs d'apolipoprotéine C.

Après l'action de la LPL, les chylomicrons sont transformés en particules résiduelles ou "remnant" et les VLDL en lipoprotéines intermédiaires, les IDL. Les "remnants" sont reconnus par le récepteur à apo B/E du foie et sont dégradés.

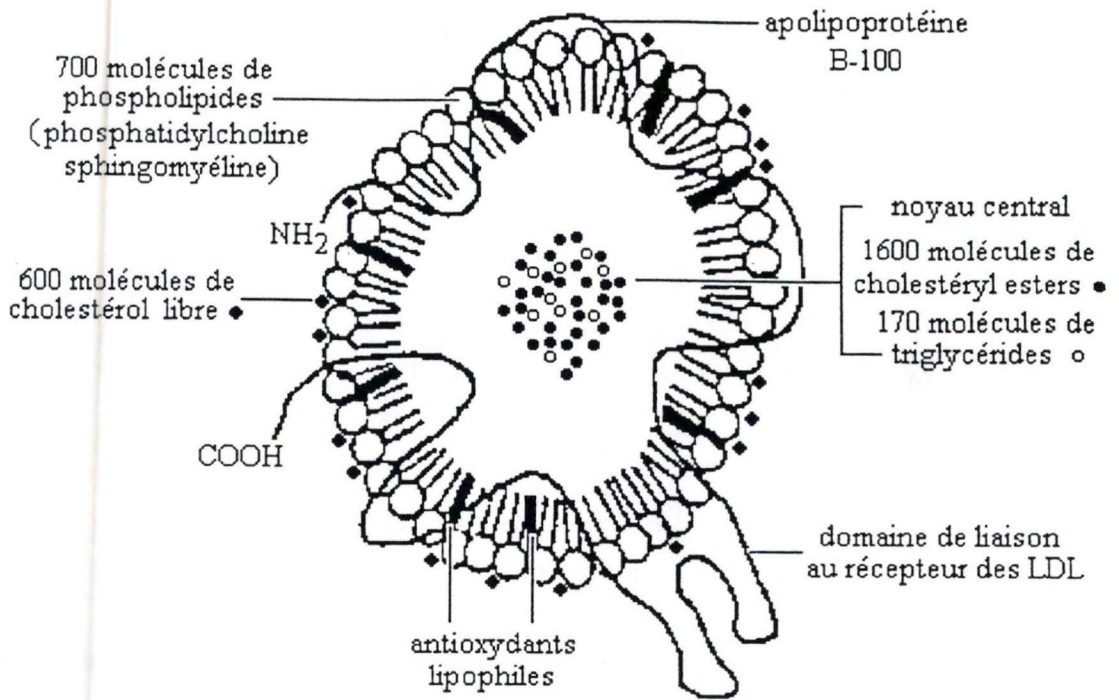


Figure I.16: Représentation schématique de la particule de LDL (Cox et Cohen, 1996).

Les IDL tout en continuant à subir l'action de la LPL, viendront également se fixer sur le récepteur hépatique. Les IDL subissent alors l'action probable de la triglycéride lipase hépatique pour être transformés en LDL (Valdiguié, 1993).

4.2.2. Les LDL

Les LDL ainsi formés se composent d'apo B, de cholestérol libre et estérifié (figure I.16). Elles circulent dans le sang vers les tissus périphériques et le foie. Elles sont reconnues par les récepteurs à apo B/E.

Après fixation sur le récepteur, la particule LDL est internalisée et dégradée en cholestérol libre, acides gras et acides aminés de l'apo B.

Le cholestérol libre pourra :

- être utilisé pour la structure des membranes.
- être stocké sous forme de cholestérol estérifié. L'ACAT (Acyl Cholesterol transférase) permet d'estérifier le cholestérol intracellulaire avec des acyls CoA.
- inhiber la β hydroxy β méthylglutaryl CoA réductase, enzyme régulatrice de la synthèse de cholestérol.
- inhiber la synthèse des récepteurs à apo B/E.
- servir de précurseurs pour les stéroïdes.

Dans les tissus périphériques, le cholestérol libre en excès pourra être pris en charge par les HDL pour être ramené du foie et y être dégradé et excrété sous forme de sels biliaires.

4.2.3. Les HDL

Les HDL plasmatiques sont synthétisées et sécrétées par l'intestin et par le foie.

Les premières HDL libérées dans la circulation sanguine ou les HDL naissantes sécrétées par les hépatocytes ne contiennent pas de cholestérol estérifié. Elles ont une forme de disque. Au fur et à mesure, la particule s'enrichit en cholestérol et phospholipides. Le cholestérol subira une estérification par la LCAT (lecithin cholesteryl acyl transferase) et le cholestérol estérifié s'accumulera au centre. Les HDL changent progressivement leur forme, de disque en sphère.

Les HDL reçoivent continuellement du cholestérol et continuent à l'estérifier avec la LCAT. Elles se transforment alors en HDL de plus grandes tailles et de plus faibles densités qui sont des transporteurs d'esters de cholestérol vers les autres lipoprotéines.

4.3. Origines de l'athérosclérose

4.3.1. *Modèle hypothétique*

Russel Ross (1976) proposa une hypothèse suivant laquelle l'athérosclérose débute par une réponse à une blessure endothéliale, ce qui conduirait localement à un dysfonctionnement de l'endothélium. En 1995, Wayne Alexander, proposa une version plus affinée de l'hypothèse de Ross : l'endothélium recouvrant la lésion peut être morphologiquement intact, mais fonctionnellement altéré. Une fois l'endothélium altéré, il y a augmentation de la perméabilité de l'endothélium; ce qui conduit à toute la cascade d'événements conduisant aux lésions athérosclérotiques.

Une autre hypothèse, qui est complémentaire à la première, est celle où, lorsque la concentration plasmatique en LDL augmente, ceux-ci traversent la barrière endothéliale et s'accumulent dans l'intima, étant donné la perméabilité augmentée de l'endothélium. Il s'en suit une oxydation progressive des LDL qui conduit à la formation des cellules spumeuses à partir des macrophages. Ces cellules spumeuses ("foam cells") sont remplies de lipides et leur accumulation conduit à la formation des stries lipidiques, première étape des lésions athérosclérotiques.

4.3.2. *Événements moléculaires liés à l'athérosclérose*

L'adhérence des monocytes et lymphocytes à l'endothélium des artères de grand calibre est l'un des premiers événements associés à l'athérosclérose. De récentes observations suggèrent que ces processus reflètent l'expression de molécules d'adhérences spécifiques aux leucocytes et de molécules chémoattractantes par les cellules endothéliales.

Ainsi, l'expression de molécules d'adhérences pour les leucocytes, a été observée *in situ* dans un modèle de lapin hypercholestérolémique. L'expression de VCAM-1 fut trouvée dans les cellules endothéliales artérielles malades. L'induction de VCAM-1 était d'ailleurs le premier événement se passant une semaine après l'initiation d'un régime hypercholestérolémique. Cette expression induite était corrélée avec une accumulation de cellules mononuclées dans

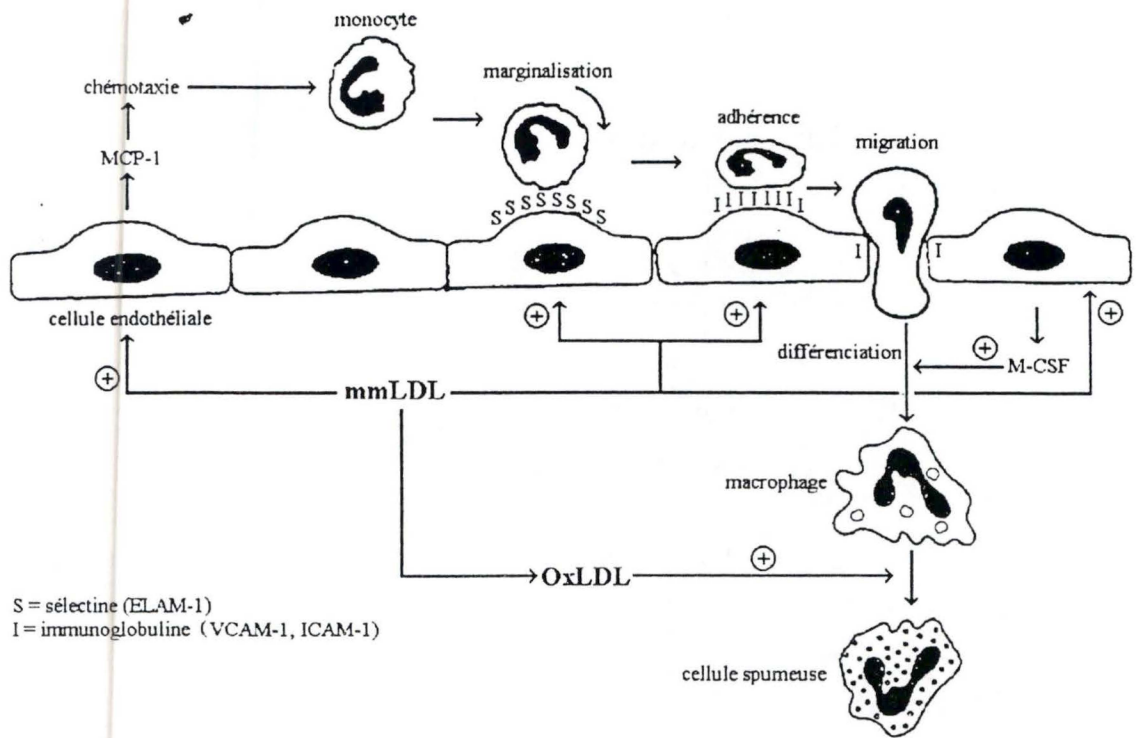


Figure I.17: Modèle hypothétique résumant les effets biologiques des LDL oxydées sur les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages (d'après O'Brien et Chait, 1994).

l'intima (Collins, 1996). Des résultats similaires ont été obtenus pour ICAM-1 dans les cellules endothéliales adjacentes aux lésions.

L'expression de chémoattractants spécifiques pour les monocytes semble aussi importante : en effet, si ces cellules abondent dans les plaques athéromateuses, ce n'est pas le cas des neutrophiles. Ces activités pourraient être dérivées de deux sources : des chémokines sont effectivement produites localement par les cellules endothéliales comme le MCP-1 ou le M-CSF, le MCP-1 étant chémoattractant pour les monocytes et le M-CSF favorisant leur différenciation en macrophages. Mais l'activité chimotactique pour les monocytes pourrait aussi résulter de modifications oxydatives des lipoprotéines du plasma (Collins, 1996).

Une fois ces leucocytes, principalement des monocytes mais aussi des lymphocytes, sont adhérents à l'endothélium, ces cellules migrent à travers les cellules endothéliales et s'accumulent subendothélialement dans l'intima (Raines et Ross, 1991).

Parallèlement, les LDL traversent également l'endothélium et se retrouvent dans la couche sous-endothéliale où ils ne sont plus protégés par les antioxydants plasmatiques. Elles subissent alors un processus d'oxydation : il y a d'abord les LDL faiblement puis moyennement oxydées (mmLDL) qui sont modifiées uniquement dans la partie lipidique et puis, pour finir, les LDL fortement oxydées (oxLDL) modifiées dans la partie lipidique et protéique. Les mmLDL reconnaissent encore les récepteurs natifs tandis que les oxLDL sont reconnues par les récepteurs éboueurs ou "scavenger", exprimés par les macrophages.

Cette oxydation des LDL semble être l'événement central dans l'initiation et la progression des lésions athérosclérotiques. L'extension de l'oxydation des LDL natives est corrélée avec une diminution de leur capacité à reconnaître le récepteur B/E (Penn et Chilsom, 1994).

Les LDL oxydées seraient capables d'affecter la production de facteurs de croissance et de cytokines, d'induire le recrutement des monocytes et leur adhésion à l'endothélium et d'altérer la migration et la croissance cellulaire (Penn et Chilsom, 1994), bien que les données de la littérature restent controversées à ce sujet.

Les mmLDL seraient chimotactiques pour les monocytes qui s'accumulent donc dans l'intima et elles induisent ensuite leur différenciation en macrophages. Par contre, les LDL fortement oxydées sont reconnues par les récepteurs "scavengers" des macrophages dont l'expression n'est pas inhibée par le contenu lipidique des macrophages. Ceux-ci continuent donc d'internaliser les LDL et deviennent des cellules bourrées de lipides, que l'on appelle les cellules spumeuses (figure I.17). Les cellules spumeuses relarguent une variété de facteurs de croissance et des cytokines qui activent les cellules endothéliales aussi bien que les cellules musculaires lisses et recrutent d'autres monocytes, contribuant ainsi à un cercle vicieux (Collins, 1996).

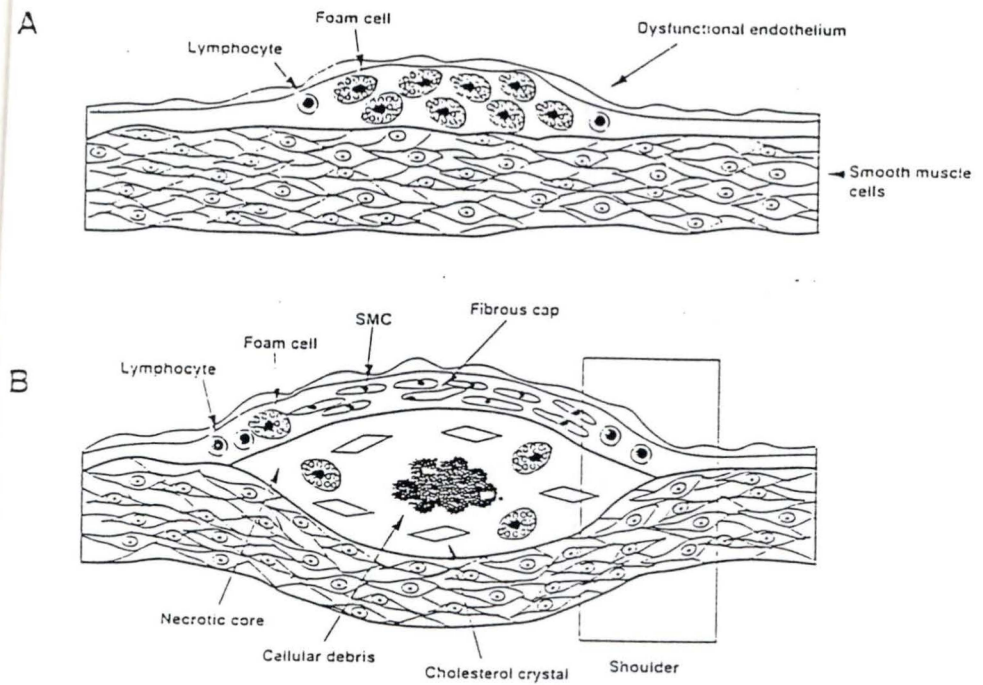


Figure I.18 : Les lésions athérosclérotiques. **A :** La strie lipidique et ses composants. **B :** La plaque fibreuse et son architecture (d'après, Collins, 1996).

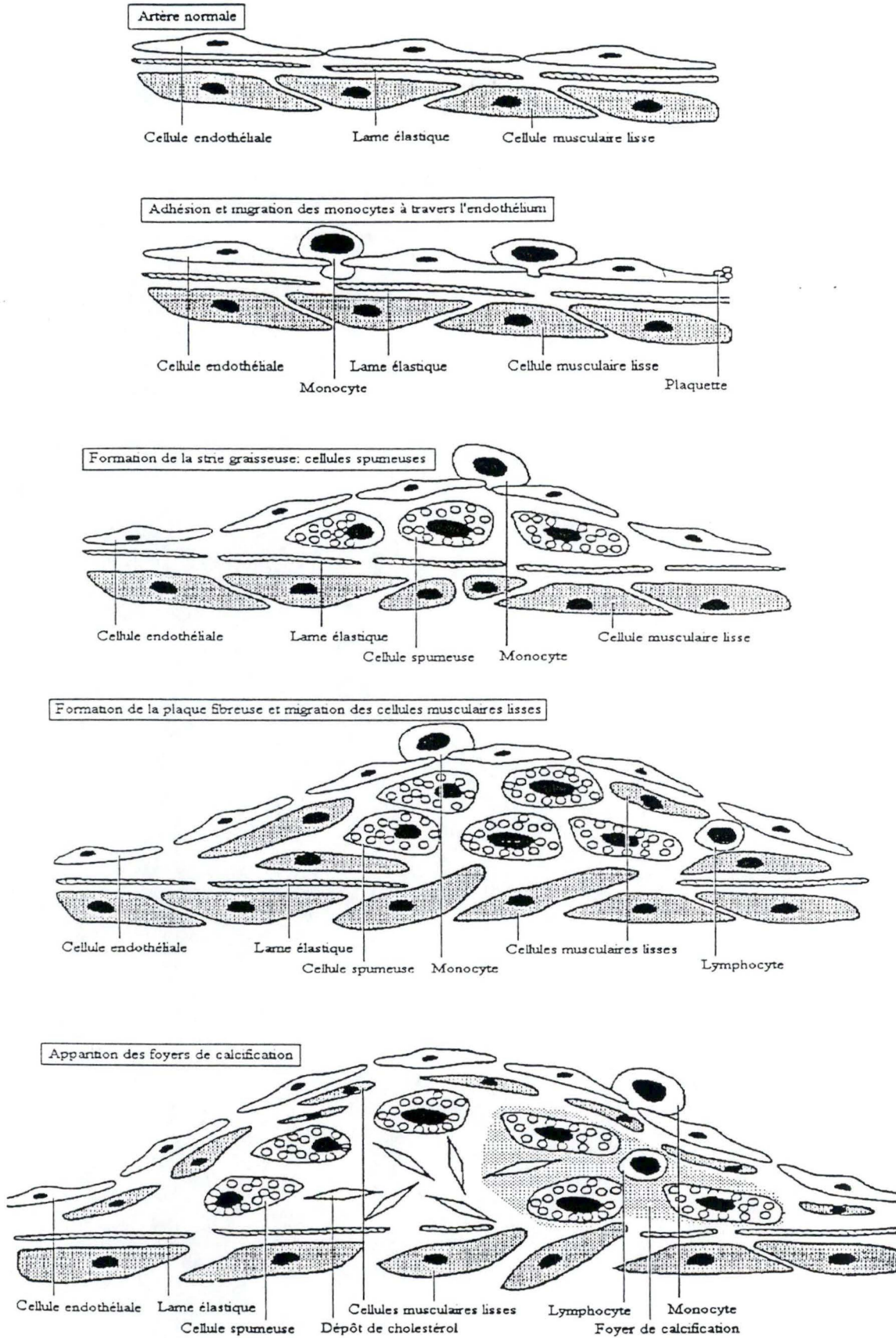


Figure I.19: Les différentes étapes au cours de l'athérogenèse, d'un point de vue histopathologique (d'après, Collins, 1996).

Les cellules musculaires lisses sont également capables d'internaliser des oxLDL et de devenir ainsi des cellules spumeuses.

Ces cellules spumeuses forment alors les stries lipidiques, première étape des lésions athérosclérotiques (figure I.18).

4.4. Evolution des lésions athérosclérotiques

La strie graisseuse ou lipidique est donc le premier événement dans la formation de la lésion athérosclérotique. Leur formation commence très tôt dans la vie. Ces lésions sont caractérisées par un intima plus fin et une augmentation dans la population cellulaire. Il y a déjà accumulation de cellules spumeuses (figure I.19).

La strie graisseuse peut progresser en une lésion intermédiaire et ensuite en une plaque fibreuse. La plaque fibreuse a une structure caractéristique. La coiffe fibreuse, située entre la lumière artérielle et le corps lipidique, est composée de cellules musculaires lisses prolifératrices, de macrophages, de lymphocytes, de cellules spumeuses et de matrice extracellulaire.

Les lésions athéromateuses avancées, avec une fine coiffe fibreuse, une nécrose centrale et une calcification sont associées avec les complications classiques de la maladie: la calcification rigidifie le vaisseau; la formation d'un thrombus peut se faire s'il y a ulcération ou fissuration de la plaque, associés avec une perte d'élasticité du tissu; dans ce cas, il peut y avoir obstruction de la lumière du vaisseau (Collins, 1996).

4.5. Rôle des PLA₂ dans l'athérosclérose

Nous avons vu que l'oxydation des LDL est un des points cruciaux de la pathologie. *In vivo*, le processus d'oxydation est complexe et reste mal compris, même s'il existe de nombreux modèles d'oxydation des LDL *in vitro*.

Parmi les différentes modifications impliquées, la peroxydation des acides gras est une des premières étapes qui conduit aux LDL oxydées. La vitesse et l'extension de cette peroxydation est dramatiquement augmentée par l'activité de la PLA₂. L'une des hypothèses avancée est que cette activité serait intrinsèque à la LDL et pourrait être spécifique d'une

partie de l'apolipoprotéine B100. Il semble que cette activité agirait spécifiquement sur les phospholipides oxydés à la surface des LDL, libérant des hydroperoxydes d'acides gras et leur permettant de se disperser à travers la LDL, accélérant donc la réaction d'oxydation. L'utilisation d'inhibiteurs de PLA₂ inhibe d'ailleurs l'oxydation des LDL (Young et Parthasarathy, 1994). De plus, couplée à une lipoxgénase, l'activité PLA₂ est utilisée comme méthode d'oxydation des LDL *in vitro* (Sparrow *et al.*, 1988).

Des données récentes de la littérature nous apprennent que la cPLA₂ est présente dans l'intima de vaisseaux athérosclérotiques, dans des régions avec un infiltrat inflammatoire et moins dans la média. La sPLA₂ de type II est trouvée dans la média d'artères normales et dans les lésions athérosclérotiques. La présence de la sPLA₂ dans des artères normales pourrait être importante pour les premières étapes du processus inflammatoire et la formation des stries graisseuses au stade précoce de la maladie (Schäfer Elinder *et al.*, 1997).

Les PLA₂ forme le lysophosphatidylcholine pendant l'oxydation des LDL. Des données suggèrent que celui-ci pourrait médier certains des effets attribués aux LDL oxydées, tels que l'effet chimotactique sur les monocytes (Penn et Chilsom, 1994). De plus, la PLA₂ augmente l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales par l'expression de molécules d'adhésion (Yokote *et al.*, 1993).

Des données suggèrent que les LDL, à leur tour, aurait un effet sur le métabolisme de l'acide arachidonique. En effet, il a été montré que des LDL modifiées augmentaient la production de prostacycline (PGI₂) à court terme qu'elles provoquaient une inhibition de la production de PGI₂ à long terme (Myers *et al.*, 1996). Par contre, Kabayashi *et al.* (1996) ont suggéré que des LDL modifiées par le glucose avaient la capacité d'augmenter la production de PGI₂ avec un effet plus grand que les LDL natives. De plus, Thorin *et al.* (1994) ont montré que les LDL, aussi bien que les oxLDL avaient la capacité d'augmenter la formation d'inositol phosphates. Il semble donc que les LDL affecteraient le métabolisme de l'acide arachidonique mais les données divergent quant à l'effet produit et la nature des PLA₂ impliquées reste à préciser.

Après avoir étudié l'athérosclérose, pathologie affectant typiquement les cellules artérielles, nous allons évoquer rapidement les varices, pathologie affectant les veines.

5. Les veines variqueuses

Les veines variqueuses constituent un problème de santé majeur : environ une personne sur trois en souffre dans les pays occidentaux. L'étiologie de cette pathologie n'est pas encore totalement élucidée mais on sait qu'elle fait intervenir des déterminants génétiques et des facteurs environnementaux. Mais avant toute chose, il est nécessaire de rappeler la structure du système veineux.

5.1. Le système veineux

Excepté les constituants veineux de la microcirculation, le système veineux fonctionne essentiellement comme collecteur à basse pression assurant le retour d'un gradient de pression négative vers le cœur. A chaque inspiration, une pression négative est créée dans le thorax et par suite dans l'oreillette droite. Le retour veineux à partir des extrémités est facilité par la contraction des muscles squelettiques qui compriment les veines. A chaque expiration, les gradients de pression sont inversés, et le sang tend à circuler en sens contraire. Ce retour est empêché par la présence de valvules dans les veines de moyen diamètre. Les valvules résolvent également le problème d'inversion du flux sanguin lié à la gravité, en particulier dans les membres inférieurs.

La structure du système veineux est conforme à la structure générale de tout le système circulatoire, mais les constituants élastiques et musculaires sont beaucoup moins importants que pour les artères. Tout comme l'artère vu au chapitre précédent, la veine est composée des trois mêmes tuniques : l'intima, la média et l'adventice. Mais pour les veines de gros calibres, c'est l'adventice qui est la couche la plus épaisse.

5.2. Description des veines variqueuses

Les varices sont caractérisées par une dilatation irrégulière et permanente d'une veine. Parmi les facteurs environnementaux intervenant dans l'apparition de la maladie, la station debout prolongée est souvent incriminée et des mécanismes comme des insuffisances des valvules évitant normalement le reflux veineux sont associées à l'apparition des veines variqueuses (Michiels *et al.*, 1995).

Dans la plupart des cas où des veines variqueuses se développent, une stase sanguine est observée. Lors d'une stase veineuse, l'apport en O₂ du tissu veineux est limité : l'endothélium

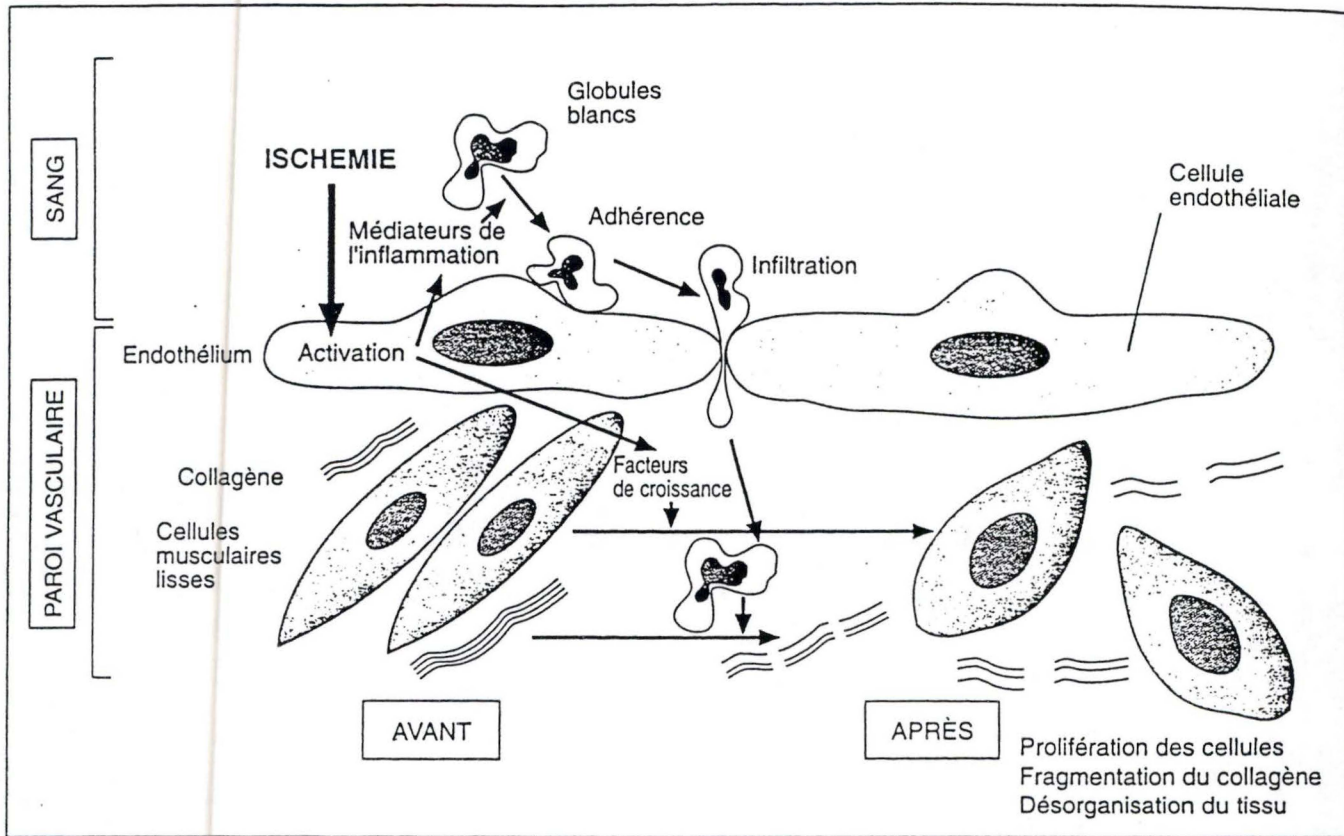


Figure I.20: Modèle proposé pour expliquer la désorganisation de la paroi d'une veine variqueuses (d'après, Michiels *et al.*, 1994).

vasculaire étant la première barrière entre le sang et le tissu veineux, il est le premier affecté par cette situation hypoxique (Michiels *et al.*, 1994).

L'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie initie une cascade d'événements impliquant les neutrophiles et les cellules musculaires lisses qui peut, lorsqu'elle est transposée *in vivo*, expliquer le développement des veines variqueuses. L'adhérence des polymorphonucléaires aux cellules endothéliales est notamment fortement augmentée par l'hypoxie. Cette adhérence n'est que la première étape du processus de diapédèse qui conduit à l'infiltration des polymorphonucléaires dans l'intima et dans la média des veines (Montefort *et al.*, 1991). Ces polymorphonucléaires adhérents aux cellules endothéliales hypoxiques actives, peuvent relarguer différentes molécules actives tels les radicaux libres et les éicosanoïdes. Ces médiateurs, en conjonction avec ceux libérés par les cellules endothéliales elles-mêmes, se retrouvent dans la paroi veineuse où ils peuvent induire des altérations en conjonction avec des modifications des caractéristiques des cellules musculaires lisses. (Michiels *et al.*, 1994) (figure I.20).

Au moins 5 caractéristiques principales des parois des veines peuvent être analysées à la lumière de cette hypothèse :

5.2.1. La barrière endothéliale est conservée

Dans la paroi des veines variqueuses, l'endothélium est toujours présent. Une hypoxie sévère *in vitro* induit de profonds changements métaboliques au niveau des cellules endothéliales : il y a synthèse de médiateurs de l'inflammation et des facteurs de croissance. Cependant, si la présence d'hypoxie n'est pas trop longue, lorsque la cellule est remise en conditions de normoxie, elle retrouve son hémostasie et la viabilité est préservée (Arnould *et al.*, 1992). Cet effet de l'hypoxie permet d'expliquer le recrutement des neutrophiles et la prolifération des cellules musculaires lisses alors que la barrière endothéliale reste intacte. Ceci est différent de ce que l'on peut observer dans l'athérosclérose où l'endothélium est abîmé et où les altérations de la paroi artérielle sont liés à l'intervention des monocytes et des plaquettes, comme nous l'avons vu précédemment.

5.2.2. La présence d'enzymes lysosomiales

Une grande quantité de ces enzymes se retrouvent dans les couches cellulaires sous-jacentes aux cellules endothéliales dans les veines variqueuses. Ces enzymes sont relarguées par les polymorphonucléaires (PMN) activés. Cette activation et cette infiltration des PMN dans le tissu veineux proviennent de leur adhérence aux cellules endothéliales activées par l'hypoxie. Une fois dans la média, ils relarguent leurs protéases par dégranulation.

5.2.3. Altérations de la matrice extra-cellulaire

Le collagène et les protéoglycans sont altérés dans la paroi des veines variqueuses. On y retrouve par exemple une proportion augmentée de collagène soluble. Les radicaux libres et certaines protéases sont capables d'induire la fragmentation de ces deux types de constituants (Borel *et al.*, 1988). Ces fragments ont été mis en évidence dans la paroi des veines variqueuses et pourraient provenir des neutrophiles activés par les cellules endothéliales qui ont subi une hypoxie.

5.2.4. Épaississement de la paroi veineuse

Cet épaississement est explicable par la prolifération des cellules musculaires lisses qui sont alors le type cellulaire majeur de l'intima. *In vitro*, cette prolifération est causée par les différentes molécules relarguées par les cellules endothéliales activées par l'hypoxie. De plus, dans les veines variqueuses, les cellules musculaires lisses passent d'un état de contractile à un état synthétique où elles sont prolifératives, secrètent plus de matrice extra-cellulaire et perdent l'expression de la myosine et de l' α -actine, en réponse probablement à des molécules relarguées par les cellules endothéliales activées, notamment par l'hypoxie.

5.2.5. Désorganisation totale de la paroi vasculaire

La veine variqueuse est caractérisée surtout par une désorganisation totale de la paroi vasculaire (figure I.20) qui peut être expliquée par la prolifération des cellules musculaires lisses, les changements dans la synthèse des protéines de la matrice extra-cellulaire et leur hydrolyse partielle par les molécules relarguées par les PMN infiltrés. Cette désorganisation, en plus de la perte de contractilité des cellules musculaires lisses, conduit à des altérations du tonus vasculaire (Michiels *et al.*, 1995).

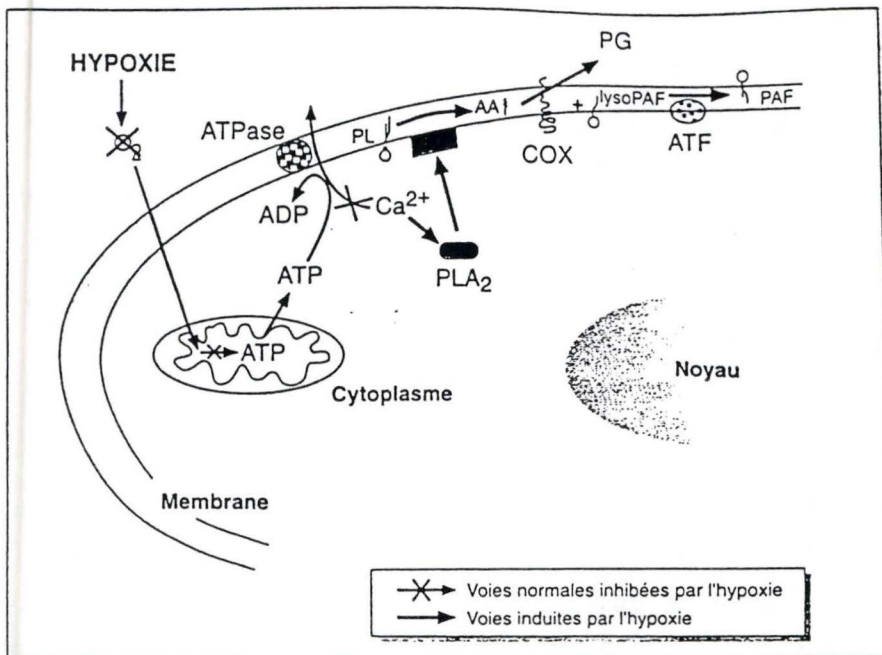


Figure I.21: Schémas des principales réactions des cellules endothéliales à l'hypoxie (d'après, Michiels *et al.*, 1994).

En conclusion, nous pouvons dire que les cellules endothéliales jouent un rôle très important dans la pathologie variqueuse; c'est pourquoi il est intéressant d'étudier les changements qui se déroulent dans les cellules endothéliales au cours de l'hypoxie.

5.3. Altérations de la cellule endothéliale au cours de l'hypoxie

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules endothéliales jouent un rôle très important dans le développement des veines variqueuses.

La figure I.21 illustre les principales réactions des cellules endothéliales à l'hypoxie (Michiels *et al.*, 1994).

Durant l'hypoxie, la première modification métabolique observée est la diminution de la concentration en ATP résultant de la diminution des phosphorylations mitochondriales due au déficit en O₂.

Ce déficit en ATP conduit à des perturbations de l'activité de certaines pompes ioniques, ce qui entraîne une perturbation de l'homéostasie ionique de la cellule avec une augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Le calcium est capable d'activer bons nombres d'enzymes dont plusieurs PLA₂ qui, dans les cellules endothéliales conduisent à la formation de médiateurs pro-inflammatoires.

Il a été démontré que, sous hypoxie et dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC), l'activité PLA₂ augmentait fortement (Michiels *et al.*, 1993). Cette activité accrue conduit au relargage d'acide arachidonique et de lyso-PAF. L'acide arachidonique est transformé en prostaglandines par la cyclooxygénase et le lyso-PAF est transformé en PAF par l'acétyltransférase. Le PAF, qui reste associé à la membrane plasmique des cellules endothéliales intervient dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales.

En conclusion, nous pouvons dire que les cellules endothéliales occupent une position centrale dans cette pathologie ainsi que dans l'athérosclérose vu au chapitre précédent.

Les phospholipase A₂ jouent également un rôle dans les deux pathologies, sans qu'on sache quel est (ou sont) la (les) PLA₂ impliquée(s), ce qui exclut toute approche rationnelle d'intervention médicamenteuse à l'heure actuelle.

6. Objectifs du mémoire

Les phospholipases A₂ (PLA₂) sont une famille d'enzymes hétérogènes dont les rôles semblent cruciaux tant dans les processus inflammatoires où elles libèrent des médiateurs lipidiques, que dans certaines pathologies vasculaires telles que veines variqueuses et que dans l'athérosclérose. Si on se limite aux cellules endothéliales, on sait que l'IL-1 et l'hypoxie entraînent une augmentation de l'activité PLA₂, mais paradoxalement la nature exacte des PLA₂ impliquées reste controversée, ce qui rend difficile toute tentative d'intervention médicamenteuse. De même, certains auteurs suggèrent que les LDL modifiées puissent également favoriser le métabolisme de l'acide arachidonique.

Nous avons donc voulu tester sur des cellules endothéliales en culture, diverses conditions plus ou moins bien reconnues, pour augmenter l'activité PLA₂ dans les cellules, soit l'IL-1, cytokine pro-inflammatoire, l'hypoxie et des LDL plus ou moins oxydées.

Après avoir vérifié les effets de ces stimuli sur l'activité PLA₂, nous tenterons d'identifier la ou les PLA₂ impliquées.

Pour ce faire, deux approches seront réalisées: une étude biochimique de ces enzymes et une approche plus moléculaire, les deux étant indispensables et indissociables.

L'approche biochimique sera réalisée sur deux modèles cellulaires différents: les HMEC-1 (human microvascular endothelial cells, cellules immortalisées), et les HCAEC (human coronary arterial endothelial cells). Cette approche consiste en un dosage indirect de l'activité PLA₂, en mesurant la libération d'acide arachidonique tritié (voir au point 4 des "Matériels et Méthodes"). En vue d'identifier le type de PLA₂ impliqué, des inhibiteurs de trois groupes de PLA₂ (cPLA₂, sPLA₂ et iPLA₂) seront testés sur l'activité PLA₂ induite par l'IL-1. Les LDL ainsi que l'hypoxie seront testés également sur l'activité PLA₂.

Le seconde approche sera réalisée uniquement sur les HCAEC. Nous étudierons, par RT-PCR, l'effet de l'IL-1 sur l'expression de différents gènes encodant les PLA₂, dans des cellules stimulées à l'IL-1. Concrètement, cette partie du travail ne sera réalisée que pour la cPLA₂.

*Matériels et
méthodes*

1. Culture de cellules

A. Culture des HCAEC

Les cellules utilisées sont des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines (HCAEC), fournies par Bio Whittaker. Cette firme fournit des ampoules. Chaque ampoule correspond à des HCAEC provenant d'un seul donneur.

1.1. Matériel

1.1.1. Repiquage

1. Milieu de culture (Bio Whittaker) : EBM2 auquel est rajouté 0.5 ou 2% de serum ainsi que des facteurs de croissance et des antibiotiques (=EGM2): hydrocortisone, hFGF, VEGF, R³-IGF-1, acide ascorbique, hEGF, héparine.
2. Trypsine-EDTA : 0.25 mg/ml (Bio Whittaker).
3. TNS : "Trypsine neutralizing solution", solution utilisée pour inhiber la trypsine (BioWhittaker).
4. HBSS : solution saline de Hanks, tamponnée avec de l'hépes 30 mM (Bio Whittaker).
5. Tubes stériles de 10 ml en plastique (Sterilin, Staffordshire, Grande - Bretagne).
6. Boîtes de cultures T75 (Nunc, Roskilde, Danemark ou Corning ,75 cm², New-York, NY,USA).
7. Microscope à contraste de phase (Zeiss, Allemagne).

1.1.2. Congélation-décongélation

1. EGM2 + 80 % S : milieu de culture EGM2 auquel on ajoute 80 % de sérum de veau fœtal.
2. EGM2 + 15% DMSO: milieu de culture EGM2 auquel on ajoute 15 % de DMSO (Diméthyl sulfoxyde , Merck , Darmstad, Allemagne).
3. Trypsine-EDTA : 0.25 mg/ml (Bio Whittaker).
4. HBSS (Bio Whittaker).

5. TNS (Bio Whittaker).
6. Ethanol absolu (Merck, Darmstad, Allemagne).
7. Ampoules stériles de 1.8 ml (Cryotubes, Nunc)
8. Milieu de culture EGM2 + 2 % S
9. Boîtes de cultures T25 (Corning, 25 cm²)

1.2. Méthode

1.2.1. Repiquage

Le repiquage est réalisé lorsque les cellules sont à confluence dans les T25 . Les cellules sont rincées avec 3 ml d'HBSS qui sont décantés, puis remplacés par 3 ml de trypsine-EDTA. L'évolution de la trypsinisation est suivie au microscope à contraste de phase.

Lorsque les cellules sont détachées, on ajoute 3 ml de TNS pour inhiber la trypsine. Les cellules sont resuspendues au moyen d'une pipette Pasteur et récoltées dans un tube stérile de 10 ml. La suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 10.000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture. Les cellules sont ensuiteensemencées à raison de 300000 cellules par T75. Le milieu est changé après 24 heures, ensuite il est changé tous les deux jours . On réalise au maximum trois passages dans les T75. Au delà, la firme ne garantit plus les propriétés de ses cellules.

1.2.2. Congélation

Après avoir été trypsinisées et centrifugées , les cellules sont resuspendues dans 500 µl de milieu + 80 % S auquel on ajoute 500 µl de milieu + 15 % DMSO. Le tout est transféré dans une fiole à congélation. L'ampoule est placée dans un récipient contenant de l'alcool absolu et le tout est mis à -70°C.

1.2.3. Décongélation

L'ampoule contenant les cellules congelées est placée dans de l'eau à 38°C. Quand l'ampoule est décongelée, les cellules sont placées dans 45 ml de EGM2 + 2% S. Les 45 ml sont mises dans 9 T25 à raison de 5 ml par boîte. Les milieux sont changés après 24 heures une première fois, ensuite tous les deux jours et ce, jusqu'à confluence. Les cellules sont alors mises dans des T75. Il ne peut y avoir que trois passages dans des T75.

B. Culture des HMEC-1

Les HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells) sont des cellules endothéliales microvasculaires transformées par l'antigène grand T du virus SV 40. Elles nous ont été fournies par le Professeur Lawley, directeur du département de Dermatologie à l'Université d'Emory (Atlanta, USA).

1.1. Matériels

1. MCDB 131 : milieu de culture auquel on ajoute les additifs suivants :
 - EGF (10 ng/ml)
 - Glutamine(10 mM) .
 - Hydrocortisone (1 µg/ml).
2. MCDB 131 + 15% S : milieu de culture MCDB 131 auquel est ajouté 15 % de sérum de veau foetal préalablement inactivé pendant 30 minutes à 56°C .
3. Milieu de rinçage : milieu de culture minimum essentiel basal de Eagle (Gibco,).
4. Trypsine-EDTA : solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0.2 g/l préparée dans une solution de Puck (Gibco,
5. Boîtes de cultures T75 (Corning, 75 cm², USA).
6. Microscope à contraste de phase (Zeiss, Allemagne).

1.2. Méthode

Tous les milieux sont préalablement incubés à 37°C.

Le milieu est décanté et les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de milieu de rinçage ; on ajoute ensuite 1 ml de trypsine-EDTA qui est décanté puis remplacé par 2 ml de cette même solution . La trypsinisation est suivie au microscope à contraste de phase. La trypsine est alors inhibée avec 5 ml de MCDB + 15 % S. Les cellules sont récoltées dans un tube stérile et centrifugées pendant 10 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml de MCDB 131 + 15 % S. Pour un repiquage en 4 , les 10 ml de la suspension cellulaire sont placés dans 4 T75 à raison de 2.5 ml par boîte auquel on ajoute 12.5 ml de MCBB 131 + 15 % S. Les boîtes sont alors placées dans l'étuve à 37°C + 5 % de CO₂ .

2. Tests de cytotoxicité

Avant d'évaluer l'impact de diverses molécules sur l'activation des cellules, nous avons vérifié que ces molécules n'étaient pas cytotoxiques, en utilisant la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange. Cette méthode permet de vérifier si les molécules testées altèrent ou non la perméabilité membranaire. Elle a été décrite par Parks et ses collaborateurs (1979) . L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore leur noyau en vert fluorescent. Par contre, alors qu'il ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, le bromure d'éthidium colore en orange le noyau des cellules mortes.

2.1. Matériels

1. Milieu de culture + 0.5 % S .
2. Milieu de culture + 2 % S.
3. PBS : Phosphate Buffered Saline, tampon phosphate 10 mM contenant 0.9 % de NaCl et à pH 7.4.

4. Solution de coloration : 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma Chemical Company, USA) et 15 mg d'acridine orange (Sigma Chemical Company, USA) sont dissout dans 1 ml d'éthanol à 95 % et 49 ml d'eau. Cette solution est fractionnée en aliquots de 1 ml et stockée à -20°C . Nous l'utilisons diluée 100 X dans du PBS : elle se conserve un mois à 4°C et à l'abri de la lumière.
5. Boîtes de Pétri : Stériles et de 35 mm de diamètre (Falcon, USA).
6. Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz, Allemagne).

2.2. Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri à raison de 250 000 cellules pour les HMEC-1 ou 100 000 cellules pour les HCAEC dans 2 ml de milieu de culture + 2 % S par boîte de Pétri .

Après 24 h, le milieu est décanté et remplacé par 2 ml de milieu de culture + 0.5 % S contenant la molécule dont nous voulons connaître la cytotoxicité. Les boîtes contrôles ne reçoivent que du milieu seul. Au terme de l'incubation , le milieu est décanté et remplacé par 2 gouttes de la solution de coloration. On dépose délicatement une lame porte-objet dans le fond de la boîte de Pétri. Les cellules sont alors rapidement observées au microscope à fluorescence et on réalise un comptage différentiel (cellules vertes et oranges séparément) sur un total de 500 cellules réparties sur l'ensemble de la boîte de Pétri.

Le pourcentage de survie est calculé comme étant égal au nombre de cellules vertes divisé par la somme du nombre de cellules oranges et du nombre de cellules vertes.

3. Dosage des protéines

Les protéines du tapis cellulaire 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.

3.1. Matériels

1. Solution d'étalon protéine (sérum albumine bovine) à 200 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Saint Louis, USA).
2. NaOH 0,5 N et NaOH 1 N (Merck, Darmstad, Allemagne).
3. Mixture alcaline (solution A) à préparer juste avant l'emploi :
 - 100 ml Na_2CO_3 0,19 M (Merck, Darmstad, Allemagne)
 - 1 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04 M (Merck, Darmstad, Allemagne)
 - 1 ml $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0,07 M (Merck, Darmstad, Allemagne)
4. Réactif de Folin à diluer 2 fois (Merck, Darmstad, Allemagne).

3.2. Méthode

Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 250 μl de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Après cette incubation, les protéines sont resuspendues et récoltées. Elles peuvent soit être congelées à -20°C pour un dosage ultérieur, soit être dosées directement.

Pour le dosage dans une plaque à 96 puits, on procède comme suit :

40 μl d'échantillon, 200 μl de solution A et 20 μl de Folin sont mélangés et incubés pendant minimum 30 minutes. Un blanc et un étalon sont également préparés : au lieu des 40 μl d'échantillon, on met 20 μl d'eau et 20 μl de NaOH 1 N pour le blanc et 20 μl d'étalon et 20 μl de NaOH 1 N pour l'étalon.

Après cette incubation de 30 minutes, la densité optique à 660 nm est lue au spectrophotomètre.

4. Estimation de l'activité des phospholipase A₂ (PLA₂) par le test de relargage d'acide arachidonique

Les cellules incubées à 37°C, en absence de stimulateur, ont la capacité d'incorporer de l' [³H]acide arachidonique dans leurs phospholipides membranaires . Ces cellules marquées, une fois stimulées, libèrent sous l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂), l' [³H]acide arachidonique estérifié en position sn-2 des phospholipides .Il est alors possible de doser (bien que indirectement) l'activité de cette enzyme en mesurant la quantité de radioactivité qui est libérée dans le milieu au cours d'une stimulation.

4.1. Matériels

1. Milieu de culture + 2% S : milieu de culture auquel on ajoute 2 % de sérum de veau foetal.
2. Milieu de culture + 0.5% S : milieu de culture auquel on ajoute 0.5 % de sérum de veau foetal.
3. [³H]-AA :0.25 mCi d'acide arachidonique tritié dissous dans 2.5 ml d'éthanol : l'activité spécifique est de 180 mCi/m mole (Nen Dupont, Belgique).
4. IL-1 β : intrleukine-1 β à une concentration finale de 5 ng/ml (R&D Systems).
5. Inhibiteurs des PLA₂:
 - AACOCF₃, inhibiteur de la cPLA₂, dilué dans du DMSO pour obtenir une concentration de 50 mM (Biomol, Plymouth, USA).
 - HELSS, inhibiteur de la iPLA₂, dilué dans du DMSO pour obtenir une concentration de 50 mM (Biomol, Plymouth, USA).
 - Oleyloxyethyl phosphorylcholine (OPC), inhibiteur de la sPLA₂, dilué dans du DMSO pour obtenir une concentration de 50 mM (Biomol, Plymouth, USA).
6. NaOH 1 N (Merck, Darmstad, Allemagne).
7. HCl 1 N (Merck, Darmstad, Allemagne).
8. Aqualuma : liquide scintillant (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).
9. Plaque multi- puits stériles de 24 cupules de 2 cm² (Corning, USA).
10. Fioles de comptage

4.2. Méthode

Les cellules endothéliales sont repiquées dans du milieu de culture + 2% S (à raison de 50 000 cellules par puit pour les HCAEC et de 200 000 cellules par puit pour les HMEC-1) et marquées radioactivement pendant 18 heures à 37°C + 5% de CO₂ en présence de 0.25 µCi d' [³H]-AA par ml de milieu de culture + 2% S. Après ce temps d'incorporation, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de milieu + 0.5% S et sont incubées selon les conditions de stimulations choisies, en présence ou non des inhibiteurs des PLA2. .

Pour estimer le pourcentage de radioactivité relarguée, nous procédons comme suit. Le milieu des cellules est récolté dans des fioles après la stimulation et la radioactivité relarguée dans le milieu est comptée en ajoutant 5 ml d'Aqua Luma. Pour chaque traitement, les cellules sont ensuite lysées avec 1 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes. 500 µl de ce lysat cellulaire sont prélevés et mis dans des fioles contenant le même volume de HCl 1 N et 5 ml d'Aqua Luma sont ajoutés. Toutes les fioles sont mises à compter pendant 3 minutes dans un compteur à scintillation β (Beckman, LS 6000 IC). Le pourcentage de radioactivité relarguée est calculé comme suit, pour chaque puit :

$$\text{Pourcentage de radioactivité relarguée} = \frac{\text{dpm milieu}}{\text{dpm milieu} + \text{dpm lysat cellulaire}} \times 100$$

5. Synthèse protéique : incorporation de leucine tritiée

5.1. Matériels

1. EGM-2 + 2 % S (Bio Whittaker).
2. EGM-2 + 0,5 % S (Bio Whittaker) .
3. [³H]-Leu : 5000 mCi (Nen Dupont, Belgique).
5. PBS: "Phosphate Buffered Saline", tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % de NaCl et à pH 7,4.
6. L-Leucine non marquée à une concentration de 10⁻⁴M (Merck, Darmstad, Allemagne).
7. TCA à 10 %: acide trichloroacétique (Merck, Darmstad, Allemagne).

8. Ethanol absolu (Merck, Darmstad, Allemagne).
9. Ether (Merck, Darmstad, Allemagne).
10. NaOH 1 N (Merck, Darmstad, Allemagne).
11. HCl 1 N (Merck, Darmstad, Allemagne).
12. Aqualuma : liquide scintillant (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).
13. Plaques multi-puits stériles de 24 puits de 2 cm² (Corning, USA).

5.2. Méthode

Les cellules sont repiquées à raison de 50 000 cellules par puit dans de l'EGM-2+2%S.

Les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de EGM-2 + 0,5 % S, elles sont ensuite marquées radioactivement avec 2 µCi d'[3H]-Leu par ml de milieu de culture . Les cellules sont incubées 4 heures à 37°C et 5 % de CO₂.

Les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de PBS + Leu 10⁻⁴ M froid. On ajoute 2 ml de TCA à 10 % + Leu à 10⁻⁴ M par puits et on incube à 4°C pendant 2 heures.

Les cellules sont lavées avec 1 ml de TCA à 10 % + Leu 10⁻⁴ M puis 2 fois avec 1 ml du mélange éthanol/éther. Les cellules sont ensuite séchées à l'air.

Le précipité est solubilisé dans 0,5 ml de NaOH 1 N à 37°C pendant une nuit.

Au terme de cette incubation, 200 µl de ce mélange sont prélevés et mis dans une fiole de comptage ainsi que le même volume d'HCl 1 N et 5 ml d'Aqualuma. Les fioles sont mises à compter pendant 3 minutes dans un compteur à scintillations β.

Un dosage de protéines selon Lowry est réalisé sur le reste des protéines cellulaires (voir le point 3).

Les résultats sont exprimés en dpm (incorporation de leucine tritiée) par mg de protéines.

6. ELISA de surface pour les protéines ICAM-1 et VCAM-1

6.1. Matériels

6.1.1. ELISA de surface

1. MCDB 131 + 2 % S .
2. MCDB 131 + 0.5 % S.
3. IL-1 β à une concentration finale de 5 ng/ml (R&D Systems ,).
4. PBS : "Phosphate Buffered Saline", tampon phosphate 10 mM contenant 0.9 % de NaCl et à pH 7.4.
5. PBS + BSA 1 % : PBS contenant 1 % de BSA (albumine sérique bovine, BOSERAL, Boxtel, Pays-Bas).
6. Anticorps monoclonaux primaires de souris anti-ICAM-1 et anti-VCAM-1 : 1 mg/ml (R&D Systems,)
7. Anticorps secondaires conjugués à la biotine (Boehringer n°1089285, Mannheim, Allemagne).
8. Steptavidine-phosphatase alcaline (Boehringer n° 1089161, Mannheim, Allemagne).
9. Diéthanolamide (BioRad, Hercules, USA).
10. P-nitrophénylphosphate (Biorad, Hercules, USA).
11. Levamisole (Sigma Chemical Company, USA).
12. Plaques multi-puits stériles de 24 puits de 2 cm² (Corning, USA).
13. Plaques multi-puits stériles de 96 puits de 0.32 cm² (Corning, USA).

6.1.2. Dosage des protéines selon la méthode au Folin

Les matériels utilisés ont été décrits au point 3.1

6.2. Méthodes

6.2.1. ELISA de surface

Les cellules sont repiquées à raison de 200 000 cellules par puits (dans les paques de 24 puits) dans du MCDB 131 + 2 % S.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de MCDB 131 + 2 % S et 1 fois avec 1 ml de MCDB 131 + 0.5 % S. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures avec 1 ml de MCDB + 0.5 % S, pour les contrôles, ou avec 1 ml de MCDB + 0.5 % S + 5 ng/ml d'IL-1 β .

Après l'incubation, les cellules sont mises sur glace pendant 10 minutes ; elles sont ensuite rincées 1 fois avec 500 μ l de PBS + BSA 1 % froid, puis incubées avec 200 μ l d'anticorps primaire dilué 1000 fois, pendant 2 heures à 4°C.

Les cellules sont rincées 3 fois avec 500 μ l de PBS + BSA 1 % froid et elles sont incubées avec 200 μ l d'anticorps secondaire conjugué à la biotine dilué 10000 fois, pendant 1 heure à 4°C.

On rince de nouveau les cellules 3 fois avec 500 μ l de PBS + BSA 1 % froid puis elles sont incubées pendant 30 minutes à 4°C avec 200 μ l de complexe streptavidine-phosphatase alcaline, dilué 10000 fois.

Au terme de cette incubation, les cellules sont rincées 3 fois avec 500 μ l de PBS + BSA 1 % froid et 1 fois avec 500 μ l de PBS froid ; elles sont ensuite incubées 30 minutes à température ambiante avec 200 μ l de diéthanolamide dilué 5 fois + 1 mg/ml de p-nitrophénylphosphate + 1 mM de levamisole.

Ces 200 μ l sont transférés dans une plaque à 96 puits et la densité optique à 405 nm est lue au spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en unités de DO par mg de protéines.

6.2.2. Dosage des protéines selon la méthode au Folin

Cette méthode a été décrite au point 3.2

7. Mise sous hypoxie

L'ischémie est stimulée en exposant les cellules endothéliales à une hypoxie sévère (atmosphère composée à 100 % d'azote) pendant un temps plus ou moins long.

7.1. Matériels

1. Tampon HBSS pH 7.36 porté à 37°C: NaCl 140 mM (Merck), D-glucose 5.5 mM (Merck), KCl 5 mM (Merck), MgSO₄ 0.4 mM (Merck), MgCl₂ 0.5 mM (Merck), Na₂HPO₄ 4.3 mM (Merck), KH₂PO₄ 0.4 mM (Merck), CaCl₂ 1 mM (Merck).
2. Bouteille d'azote (L'air Liquide).
3. Enceinte hermétique munie de deux ouvertures.
4. Boîtes de Pétri stériles de 35 mm de diamètre (Corning, USA).

7.2. Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes appropriées à la confluence voulue pour l'expérience.

Avant l'expérience, les cellules sont rincées trois fois avec du HBSS porté à 37°C, ensuite elles sont recouvertes de 0.7 ml de HBSS. Les boîtes sont déposées dans l'enceinte et exposées à un flux d'azote à 100 % pendant deux minutes. La casserole est alors fermée hermétiquement et placée dans la chambre à 37°C pour la durée de l'hypoxie. Des contrôles réalisés dans les mêmes conditions mais en normoxie sont toujours réalisés en parallèle.

8. Dosage de l'ATP

L'ATP relargué par les cellules endothéliales peut être dosé par une détermination bioluminescente. L'ATP est mis en présence d'une mixture réactionnelle contenant de la luciférine et de la luciférase.

Les réactions sont les suivantes:



C'est la lumière émise qui est dosée grâce à un luminomètre. Cette émission est proportionnelle à la quantité d'ATP présente au départ.

8.1. Matériels

1. Eau distillée à pH 7.8 stérilisée par filtration (filtre minisart NMC, 0.2 μm , Sartorius) utilisée pour le dosage et les dilutions d'ATP cellulaire.
2. ATP Assay Mix (Sigma): mixture de révélation contenant la luciférase et la luciférine.
3. Luminomètre (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).
4. Boîtes de Pétri de 3.5 cm^2 de diamètre (Corning).

8.2. Méthode

Les cellules endothéliales sont repiquées dans des boîtes de Pétri à la confluence voulue et mises sous hypoxie.

Après l'incubation sous hypoxie, le surnageant contenant l'ATP libéré par les cellules endothéliales est récolté en aliquots de 200 μl et les aliquots sont congelés à -70°C .

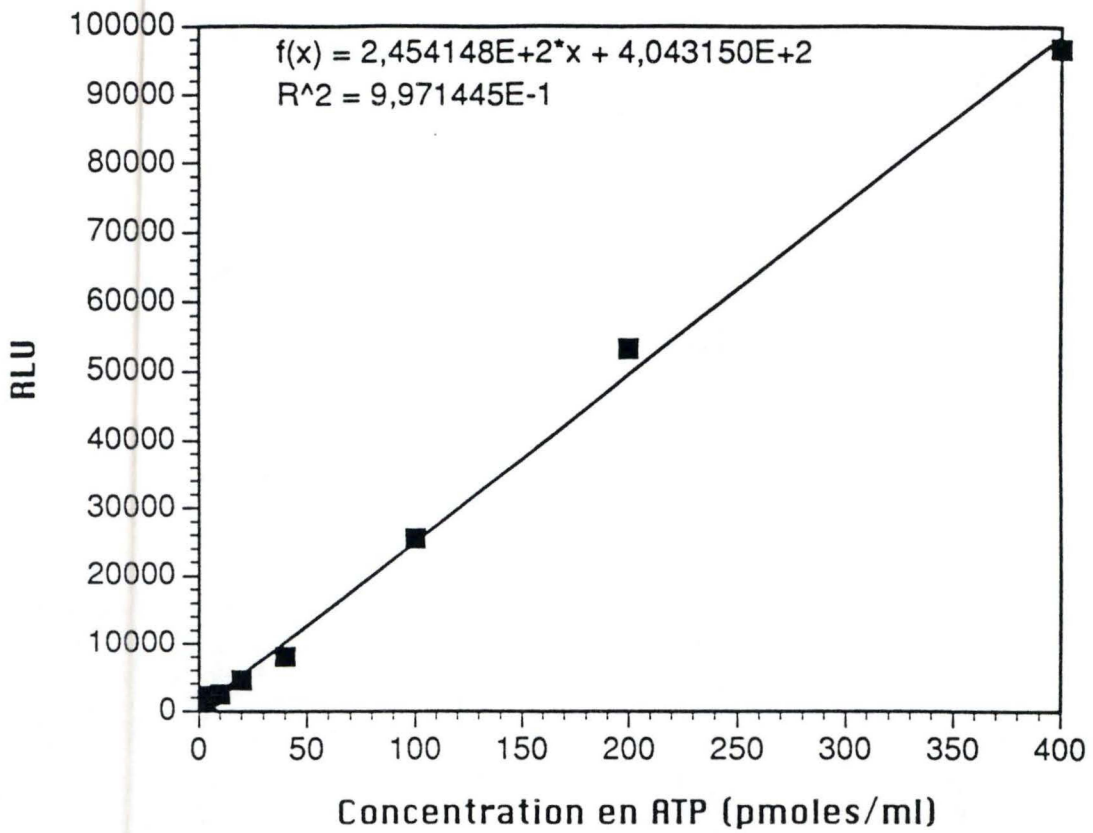


Figure II.1 : Droite d'étalonnage donnant la concentration en ATP en picomoles/ml en fonction des RLU (relative light units).

Les échantillons sont dégelés à 4°C ainsi que la mixture de révélation. Le tout est conservé dans la glace pendant la durée du dosage. Dans un tube adapté (Lumac), le mélange suivant est ajouté:

-400 µl d'eau distillée pH 7.8 à température ambiante.

-20 µl de mixture de révélation.

-10 µl d'ATP cellulaire dilué de façon adéquate dans de l'eau distillée pH 7.8 à 4°C.

L'intensité de la lumière émise est mesurée grâce au luminomètre.

La quantité d'ATP est calculée selon la droite d'étalonnage présentée à la figure II.1.

9. Préparation des LDL

9.1. Matériels

9.1.1. Isolement des LDL

1. EDTA (Merck) préparé à une concentration de 100 mg/ml dans de l'eau distillée
2. Tube d'ultracentrifugation Quick Seal de 3,2 ml (Beckman)
3. Bromure de potassium (Merck)
4. PBS
5. Centrifugeuse Optima TLX (Beckman)
6. Seringue de 1ml (Terumo, Leuven, Belgique)
7. Aiguille de 16 mm (Terumo)
8. Sac de dialyse (Belgolabo)
9. Pince de dialyse (Vel, Amsterdam)
10. Filtre de 0,45 µm (Millex-HV, Millipore, Gottingen, Allemagne)
11. Tubes de 15 ml gradués (Sarstedt)

9.1.2. Oxydation des LDL par radiolyse

1. PBS
2. Tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7
3. Tubes en verre
4. Irradiateur Gamma, la GammaCell (Cobalt 60) (Griffith-Mediris, Fleurus, Belgique)
5. Filtre de 45 μ m

9.2. Méthodes

9.2.1. Isolement des LDL

Les LDL sont isolées directement à partir d'un pool de plasma humain. Le pool de plasma (environ 200 donneurs) provient du Centre de Transfusion Sanguine de Namur. Un volume adéquat de EDTA 100mg/ml est ajouté au pool de plasma afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/ml en EDTA. L'EDTA est un chélateur de métaux, il est utilisé pour ralentir l'oxydation naturelle des LDL. Ensuite le plasma est 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 et un jour contre un litre de PBS contenant 0,01% de EDTA afin d'éliminer l'excès de bromure de potassium. Le tampon de dialyse est changé trois fois.

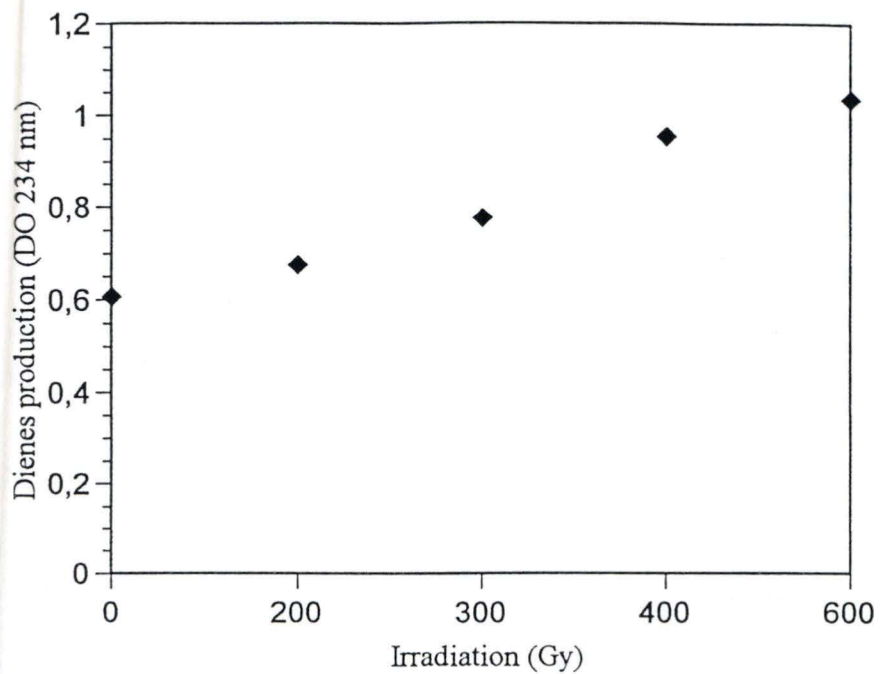


Figure II. 2: Quantité de diènes conjugués en fonction de l'oxydation des LDL. La mesure est réalisée au spectrofluorimètre à 234 nm.

9.2.2. Oxydation des LDL par radiolyse

Suite à la dialyse des LDL contre le tampon PBS/EDTA, les LDL sont encore dialysées pendant 48 h contre un litre de tampon phosphate de sodium 10 mM. Ce tampon constitue le milieu idéal pour réaliser la radiolyse. Le tampon de dialyse est changé 5 fois. Ensuite les LDL sont filtrées sur un filtre de 0,45 µm et leur concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford. La solution de LDL est alors diluée avec du tampon phosphate de sodium 10 mM afin d'obtenir une concentration finale en LDL de 300 µg/ml. Deux millilitres de cette solution de LDL sont déposés dans des tubes en verre préalablement traités par sonication pendant 10 minutes et stérilisés (8h à 180°C). Les tubes sont alors placés dans un irradiateur gamma le temps désiré afin d'obtenir l'irradiation attendue (99 sec=50 Gy) (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 1992). Afin de vérifier que l'oxydation des LDL s'est bien déroulée, la présence de diènes conjugués est mesurée au spectrofluorimètre à 234 nm. En effet, la quantité de diènes conjugués augmente avec le niveau d'oxydation des LDL (Figure II.2).

10. Transcription inverse suivie d'une amplification par PCR (RT-PCR)

Cette technique permet de détecter la présence et l'abondance d'un ARNm spécifique . Elle nécessite de très petites quantités d'ARN et est très sensible . Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARNm à détecter (transcription inverse ou reverse transcription (RT)). Ensuite ce brin d' ADNc servira de matrice pour la synthèse d'un 2^{ème} brin et ces 2 brins complémentaires seront amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR ou « Polymerase Chain Reaction »).

10.1. Matériels

10.1.1. Extraction d'ARN totaux à partir de cultures cellulaires (HCAEC)

Toutes les solutions sont RNase free

- Stimulation et extraction

1. EGM-2 + 0.5 % S : milieu de culture EGM-2 auquel on ajoute 0.5% de sérum de veau fœtal.
2. IL-1 β à une concentration finale de 5 ng /ml.
3. H₂O-DEPC
4. SDS : solution stock de SDS 10 % préparé avec de l'eau désionisée , RNase free
 5. PBS : Phosphate Buffer Saline, tampon phosphate 10 mM contenant 0.9 % de NaCl et à pH 7.4.
 6. Tampon de lyse: pour 500 ml: 250 g de thiocytate de guanidine
17.5 ml de citrate de sodium 0.75 M à pH 7.0
26.5 ml de sarkosyl 10 %
Compléter avec de l'eau traitée au DEPC (0.5 %) pour atteindre un volume de 500 ml. Aliquoter le tampon de lyse dans des tubes Falcon de 50 ml et conserver à 4°C.
7. β - Mercaptoéthanol (Sigma, Saint Louis, USA).
8. Acétate de sodium 2 M à pH 4.0
9. Phénol saturé en citrate de sodium 0.1 M
10. Chloroforme (Sigma, Saint Louis, USA).
11. Isopropanol (Sigma, Saint Louis, USA).
12. Acétate d'ammonium à pH 7.5
13. Ethanol 100 % (Merck, Allemagne).
14. Tubes en verres de 30 ml (Corex , USA) : préalablement nettoyés avec du SDS 1 % , rincés avec de l'eau désionisée et mis au stérilisateur à 180 °C pendant 8 heures.
15. Centrifugeuse (J- 21 B Beckman ; rotor JA-20(USA))

Gène	Paires d'amorces nucléotidiques	Taille des amplicons
cPLA2 (Newton <i>et al.</i> , 1997)	amorce-5': 5'- GAGCTGATGTTTGCAGATTGGGTTG-3' amorce-3': 5'- GTCACTCAAAGGAGACAGTGGATA AGA-3'	509 bp
sPLA2 (Newton <i>et al.</i> , 1997)	amorce-5': 5'-GCTGTGTCACTCATGACT-3' amorce-3': 5'-GGAGTACAGCTTCTTTGG-3'	478 bp
	amorce-5' : 5'-TGCTGTGTCACTCATGAC-3' amorce-3' : 5'-CGGAGTACAGCTTCTTTG-3'	
Tubuline α (Schmedtje <i>et al.</i> , 1997)	amorce-5': 5'-GGAAGATGCTGCCAATAACT-3' amorce-3': 5'-TGCCATAATCAACTGACAGG-3'	200 bp

Tableau II. 1 : Description des amorces utilisées lors des RT-PCR pour mettre en évidence l'expression des gènes codant pour les protéines cPLA2, sPLA2 et tubuline α .

-. Vérification de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose 1 %

1. SDS
2. H₂O-DEPC
3. Agarose : High Strength Analytical Grade Agarose (BioRad, Hercules, USA).
4. MOPS 20 X : 41.86 g de MOPS 0.4M
16.67 g d'acétate de sodium
20 ml d'EDTA 20 mM
Ajouter 370 ml d'H₂O-DEPC
Mettre à pH 7.0 et porter à 500 ml
5. Formaldéhyde 37 % (Sigma, Saint Louis, USA).
6. Formamide (Merck, Darmstadt, Allemagne).
7. DYE for RNA : 0.25 % de bleu de bromophénol
50 % de glycérol
1 mM d'EDTA
8. Bromure d'éthidium : 10 mg/ml, à conserver à l'abri de la lumière (Sigma, Saint Louis, USA).
9. Cuve d'électrophorèse: Horizon 11.14 (Gibco BRL, Gaithersburg , USA) .

10.1.2. RT-PCR en 1 étape

1. Amorces : voir tableau II.1.
2. Kit de RT-PCR (Access RT-PCR system, Promega, USA).Il contient
 - 500 unités d'*AMV reverse transcriptase*(Avian Myeloblastosis virus), 5 unités/ μ l .
 - 500 unités de *Tfl* ADN polymérase (de *Thermus flavus*), 5 unités/ μ l .
 - 1 ml de tampon de réaction 5 X.
 - 1.2 ml de MgSO₄ 25 mM.
 - 100 μ l d'un mélange de dATP , dCTP, dGTP, dTTP à une concentration de 10 mM.
 - 13 ml d'eau Rnase-free.
3. [α -³²P] dCTP : 100 μ Ci/10 μ l, avec une activité spécifique de 3000 Ci/mmol (NEN Dupont, Belgique).
5. Thermo-cycleur (GENE AMP 2400, Perkin Elmer, USA).

10.1.3. Analyse des produits PCR

- Gel d'agarose

1. Agarose (BioRad, Hercules, USA).
2. Tampon d'électrophorèse (TBE 1 X) dilué 10 X à partir d'une solution stock (TBE 10 X) qui est composée de :
 - TRIS 0.9 M (Acros Chimica, Belgique).
 - Acide borique 0.9 M (Merck, Allemagne).
 - EDTA 0.02 M (Merck, Allemagne).
3. Bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA).
4. Tampon d'échantillon 10 X . Il contient les éléments suivants:
 - Ficoll 25 % (type 400 ; Pharmacia, Suède).
 - Xylène cyanol 0.4 % (Sigma Chemical Company, USA).
 - Bleu de bromophénol 0.4 % (Across, Belgique).
5. Marqueurs de poids moléculaire d'ADN : Low DNA Mass Ladder (Gibco, Grande-Bretagne) : marqueurs à 2000, 1200, 800, 400 , 200 , 100 pb (voir figure II.1).
6. Système d'électrophorèse (Gibco BRL Life Technologies INC).

- Gel de polyacrylamide

1. Système d'électrophorèse (V15-17, Gibco, Grande- Bretagne).
2. Tampon d'échantillon. Il contient :
 - Ficoll 25 % (type 400 ; Pharmacia, Suède).
 - Xylène cyanol 0.4 % (Sigma Chemical Company, USA) .
 - Bleu de bromophénol 0.4 % (Acros Chimica, Belgique).
3. Tampon d'électrophorèse(TBE 1X) : dilué 10 X à partir d'une solution stock (TBE 10 X) qui est composé de :
 - TRIS 0.9 M (Acros Chimica, Belgique).
 - Acide borique 0.9 M (Merck, Darmstad, Allemagne).
 - EDTA 0.02 M (Merck, Darmstad, Allemagne).
4. Gel d'électrophorèse : tous ces produits proviennent de chez Bio-Rad (USA). Pour 100 ml de gel, il faut :

-26.6 ml d'une solution stock d'acrylamide 30 %/ 1 % de N,N'-méthylène bisacrylamide 1 % (concentration finale en acrylamide : 8 %).

-10 ml de TBE 10 X , ce qui donne une dilution finale de 1 X.

-63.4 ml d'eau distillée.

-50 µl de TEMED, concentration finale de 0.005 %, préparé fraîchement de même que :

-0.5 ml de persulfate d'ammonium (concentration finale de 0.05 %).

Ajouter le TEMED et le persulfate d'ammonium en dernier lieu : ils polymérisent le gel.

5. Sécheur de gel (Modèle 583, Biorad, USA).
6. Film MP : pour isotopes émettant des radiations β et γ (RPN6, Amersham, Belgique).
7. Révélateur dilué 5 X (PQ Universal, Ilford, Grande- Bretagne).
8. Fixateur dilué 5 X (Hypam, Ilford, Grande-Bretagne).
9. Instant Imager (Instant Imager electronic autoradiography, Packard Instrument Company, USA).

10.2. Méthodes

10.2.1. Extraction d'ARN totaux à partir de cultures cellulaires(HCAEC)

Les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de EGM-2 + 0.5 % S ; elles sont ensuite incubées avec 5 ml d'EGM-2 + 0.5 % S , pour les contrôles, et avec 5 ml d'EGM-2 + 0.5 % S + 5 ng /ml d'IL-1 β et ce, pour différents temps d'incubations. Après l'incubation, l'ARN peut alors être extrait selon la méthode suivante .

Le milieu des cellules est retiré et les cellules sont rincées 2 fois au moyen de 10 ml de PBS stérile refroidi sur glace (4°C) , le surnageant est ensuite enlevé. Pour la lyse cellulaire, 4 ml de tampon de lyse (additionné de β -mercaptoéthanol à raison de 0.35 ml par 50 ml de tampon de lyse) sont ajoutés par T75 pendant 2 à 5 minutes. La solution est alors transférée à l'aide d'un racloir dans un tube corex stérile de 30 ml . Pour précipiter les protéines, on ajoute à cette solution 0.4 ml d'une solution d'acétate de Na à pH 4.0, 4 ml de phénol saturé en citrate de Na 0.1 M (conservé à 4°C) et 0.8 ml de chloroforme. Après l'ajout de chaque réactif, la solution est vigoureusement mélangée, elle est ensuite refroidie sur glace pendant 20 minutes.

Après avoir équilibré les tubes , ceux-ci sont mis à centrifuger à 8000 rpm pendant 20 minutes à 4° C. La phase aqueuse (phase supérieure) est ensuite délicatement prélevée et déposée dans un nouveau tube corex , la phase organique est éliminée. Pour précipiter l'ARN, 4 ml d'isopropanol sont alors ajoutés et bien mélangés à la phase aqueuse ; le tout est placé pendant 1 heure à -20°C.

Les tubes, une fois équilibrés, sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est alors enlevé et le culot est dissous dans 2 ml de tampon de lyse . On ajoute ensuite 0.5 ml d'acétate d'ammonium à pH 7.5 et 7.5 ml d'éthanol. La solution est vortexée après l'ajout de chaque solution. Le tout est mis à précipiter à -20°C pendant la nuit .

Les tubes sont centrifugés à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé et le culot est lavé au moyen de 5 ml d'éthanol refroidi à 4°C ; les tubes sont ensuite mis à centrifuger, après avoir été équilibrés, à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est décanté au maximum et les tubes sont laissés à l'air pour laisser s'évaporer l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 100µl d'H₂O-DEPC.

La quantité d'ARN est estimée au spectrophotomètre.

- Vérification de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose 1%.

La cuve d'électrophorèse est tout d'abord traitée avec du SDS la veille de la migration. Le gel d'agarose est ensuite préparé : un bain est chauffé à 60°C ; 1.5 g d'agarose sont dissous dans 115.4 ml d'H₂O-DEPC mélangés avec 7.5 ml de MOPS 20 X. Le mélange est placé dans le bain à 60°C. Sous hotte , 27 ml de formaldéhyde 37 % sont ajoutés au mélange et le gel est coulé dans la cuve , puis rincé avec de l'eau désionisée . On laisse le gel polymériser pendant 1 heure sous hotte.

Les échantillons sont ensuite préparés : 3 µg d'ARN dilué dans un volume total de 4 µl d'H₂O-DEPC , 7.5 µl de formamide, 0.75 µl de MOPS 20 X et 2.7 µl de formaldéhyde sont mélangés et laissés 15 minutes à 65°C. Les échantillons sont déposés immédiatement sur glace pendant 5 minutes ; ils sont ensuite culotés à l'aide d'une microfuge.

2 µl de DYE pour RNA sont ajoutés par échantillon ainsi que 2 µl de bromure d'éthidium. Le tampon d'électrophorèse est ajouté dans la cuve et les échantillons sont déposés . On laisse migrer à 100 Volts pendant plus ou moins 30 minutes . Le gel est ensuite photographié.

10.2.2. RT-PCR en 1 étape

Le système RT-PCR de Promega permet de réaliser la transcription inverse et l'amplification par PCR d'un ARN spécifique à partir d'ARN totaux dans un seul tube. Ceci est réalisable grâce à un tampon de réaction qui permet une activité maximale pour les 2 enzymes : la transcriptase inverse d'AMV (« Avian Myeloblastosis virus ») et l'ADN polymérase d'une archéobactérie marine hyperthermophile : *Thermus flavus*. Il n'y a donc pas lieu de changer de tampon de réaction, ni d'ajouter l'ADN polymérase entre l'étape de reverse transcription et l'étape de PCR. Cela simplifie la procédure et réduit les risques de contamination éventuelle avec des brins d'ADN exogènes .

La transcriptase inverse d'AMV peut travailler à des températures élevées (48°C, dans le tampon de réaction) ce qui diminue les problèmes encourus avec les structures secondaires dans l'ARN et facilite donc la synthèse de longs brins d'ADNc. L'ADN polymérase de *Thermus flavus* n'a pas d'activité exonucléase 3'-5' ; elle réalise donc l'élongation de manière rapide.

On prépare le mélange réactionnel comme suit :

- 10 µl de tampon de réaction 5 X à une concentration finale 1 X.
- 1 µl de mélange de dNTP (10 mM chacun) à une concentration finale de 0.2 mM .
- 0.2 µl de primer 5' à une concentration finale de 50 pmole/50 µl.
- 0.2 µl de primer 3' à une concentration finale de 50 pmole/ 50 µl.
- 2 µl de MgSO₄ 25 mM à une concentration finale de 1 mM.
- 1 µl de AMV transcriptase inverse (5u/µl) à une concentration de 0.1 u/µl.
- 1 µl de *Tfl* ADN polymérase à une concentration finale de 0.1 u/µl.
- 30.6 µl d'eau RNase-free ou 30.6 µl de [α -³²P] ATP dilué dans de l'eau RNase-free à une concentration finale de 0.25 µCi/50µl.
- 4 µl d'échantillon d'ARN total à une concentration finale de 0.05 µg .

Le mélange est bien resuspendu avant d'ajouter, en dernier lieu, les 2 enzymes. Puis on agite fortement la solution ainsi préparée. Si on a plusieurs échantillons, on mélange chacun de ces composants en multipliant les volumes additionnés par le nombre d'échantillons. Puis on transfère 46 µl de ce mélange à chaque microtube de réaction auquel on ajoute 4 µl d'ARN.

On peut aussi ajouter des dATP marqués au ³²P (Dupont, Belgique) pour marquer l'ADN synthétisé. Nous l'avons fait pour augmenter la sensibilité de l'analyse des produits de la RT-PCR sur gel de polyacrylamide.

Les échantillons sont ensuite mis dans le thermo-cycleur qui réalise des cycles de températures comme suit :

- synthèse d'ADNc à partir de la séquence d'ARN : 1 heure à 48°C.
- inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc : 2 minutes à 94°C.
- x cycles :
 - dénaturation des doubles brins à 94°C pendant 30 secondes.
 - hybridation à 60°C pendant 30 secondes.
 - élongation à 72°C pendant 45 secondes.
- élongation finale à 72°C pendant 10 minutes .
- stockage à 4°C.

On stocke ensuite les produits de ces réactions a -20°C ou bien on les analyse directement soit sur gel d'agarose (pour une RT-PCR non radioactive) soit sur gel de polyacrylamide (pour une RT-PCR radioactive).

10.2.3. Analyse des produits PCR

- Gel d'agarose

Pour mettre au point les conditions de PCR (nombres de cycles, température d'hybridation, etc.), nous avons choisi d'analyser, dans un premier temps, les produits provenant de RT-PCR non radioactive sur gel d'agarose. L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode simple et rapide de séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Comme les produits RT-PCR que nous avons analysés ont une taille de 200 à 509 bp, nous avons réalisé des gel de 2 % en agarose.

2 g. d'agarose sont pesés et placés dans 100 ml de TBE 1 X ; le mélange est ensuite chauffé jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissout. Lorsque le mélange est légèrement refroidi, 12 µl de bromure d'éthidium sont ajoutés. Le gel est coulé et les peignes sont placés. Après la polymérisation, le gel est mis dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie de TBE 1 X .

Les échantillons sont ensuite préparés : 2 µl de tampon d'échantillon sont ajoutés à 20 µl de produits PCR et ils sont alors déposés dans les puits. La migration se déroule pendant environ 1 heure 30 à 100 volts. Le gel est visualisé sous UV et photographié.

- Gel de polyacrylamide

Après les mises au point des conditions PCR, nous avons réalisé les RT-PCR en présence de nucléotides radioactifs ; ce qui nous a permis de diminuer le nombre de cycles d'amplification lors de la PCR et de voir apparaître plus facilement les éventuelles bandes contaminantes, puisque la sensibilité est augmentée grâce à la radioactivité. Nous avons analysé ces produits de manière semi-quantitative sur gel de polyacrylamide.

Le système d'électrophorèse est tout d'abord monté. Le gel est ensuite préparé : le TBE 10 X , la solution d'acrylamide/N,N'-méthylène bisacrylamide 30/1, l'eau distillée et en dernier lieu le TEMED et le persulfate d'ammonium sont mélangés ; puis le gel est coulé. On le laisse polymériser 1 heure. Il s'agit d'un gel natif, c'est-à-dire sans SDS de façon à ne pas dénaturer les molécules d'ADN. Nous avons réalisé des gels dont la concentration en acrylamide est de 8 %, car cette concentration permet une résolution maximale de fragments d'ADN allant de 60 à 400 bp. La taille des différents fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer un marqueur de poids moléculaire. Celui-ci a été préalablement marqué au ^{32}P grâce à la T4 kinase, afin de permettre leur visualisation lors de l'autoradiographie du gel.

Lorsque le gel est polymérisé, on le place dans la cuve d'électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse (TBE 1 X) et on lui fait subir un « pré-run » d'une heure à 100 Volts. Pendant ce temps, 20 μl des produits de la RT-PCR (sur les 50 μl au total) sont ajoutés à 2 μl de tampon d'échantillon puis déposés au fond des puits, pour ensuite migrer pendant 2 heures 30 minutes à 100 Volts. Le gel est alors démoulé, placé sur un papier Whatman et recouvert par un papier cellophane. Il est directement lu à l'Instant Imager pendant 10 minutes puis séché sous vide à 80°C pendant 1 heure. Le gel est alors autoradiographé en présence d'un film MP pré- flashé. Après 24 à 48 heures, nous révélons le film en le plaçant 4 minutes dans le révélateur, puis 30 secondes dans de l'eau distillée, et enfin 4 minutes dans le fixateur. Le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

11. Marquage du marqueur de poids moléculaire

11.1. Matériels

1. Mélange réactionnel (pour 10 μ l) :
 - 1 μ l de marqueur "Low DNA mass Ladder".
 - 1 μ l de tampon kinase 10 X concentré (Boehringer, Allemagne).
 - 6 μ l d'eau.
 - 1 μ l de T4 kinase 10 U/ μ l (Boehringer, Allemagne).
 - 1 μ l [γ - 32 P] ATP (Adenosine 5'-triphosphate); 100 μ Ci/10 μ l; activité spécifique : 3000 Ci/mmol (NEN Dupont, Belgique).
2. EDTA 0,25 M : pH 8,0 (Merck, Allemagne) et autoclavé.
3. Colonnes Quick Spin Sephadex Q-25 Fine (Boehringer, Allemagne).
4. Tampon TE : Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM, autoclavé.
5. Centrifugeuse Jouan : B.311 (Jouan, France).
6. Liquide scintillant : Aqualuma (Lumac, Pays-Bas).
7. Compteur à scintillation β (Beckman LS 1801, USA).

11.2. Méthode

La polynucléotide kinase du bactériophage T4 est utilisé ici pour catalyser la phosphorylation des groupes hydroxyles des extrémités 5' des chaînes d'ADN à partir d'ATP dont le phosphate γ contient un atome de 32 P.

Le mélange réactionnel décrit dans les matériels est incubé 15 minutes à 37°C, puis la réaction est arrêtée en ajoutant 2 μ l d'EDTA 0,25 M. Le marqueur est ensuite séparé des nucléotides radioactifs grâce à une purification sur colonne Quick Spin : le gel de Sephadex est d'abord homogénéisé avant d'être asséché par une centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm. L'échantillon déposé au centre de la colonne subit ensuite une centrifugation similaire. La colonne est rincée 3 X avec 500 μ l de tampon TE, chaque rinçage étant suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm. Le marqueur est généralement récolté dans l'éluat du 2^{ème} rinçage.

Le marquage du marqueur est évalué, sue 3 X 1 µl de marqueur auquel on ajoute 5 ml d'Aqualuma, par comptage pendant une minute du nombre de désintégrations par minute (pendant 1 minute) à l'aide du compteur à scintillation.

12. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Un fragment d'ADN peut être extrait d'un gel d'agarose et purifié grâce à l'utilisation du kit " QIAEX II Agarose Gel Extraction"(Quiagen).

12.1. Matériels

1. Kit de Quiagen. Il comporte :
 - tampon QX I.
 - QIAEX II.
 - Acétate de sodium 3 M à pH 5.0 .
 - Tampon PE.
2. Eau stérile
3. Centrifugeuse (Heraus Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).

12.2. Méthode

La bande d'ADN qui nous intéresse est excisée du gel d'agarose grâce à un scalpel propre et bien coupant. Le morceau de gel est pesé et 3 volumes de tampon QX1 sont ajoutés par volume de gel pour des fragments de 100 bp à 4 kb. Le tout est resuspendu en vortexant 30 secondes. Pour des échantillons allant jusqu'à 2 µg, 10 µl de QIAEX 2 sont ensuite ajoutés et le tout est homogénéisé. Cette mixture est incubée à 50°C pendant 10 minutes et mélangée toutes les 2 minutes. L'échantillon est alors centrifugé pendant 30 secondes à 13 000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé , le culot est lavé avec 500 µl de tampon QX 1 et il est resuspendu en vortexant. Ce mélange est de nouveau mis à centrifuger pendant 30 secondes à 13 000 rpm et le surnageant est encore enlevé. Le culot est lavé 2 fois avec 500 µl

de tampon PE et le tout est mélangé au vortex, puis centrifugé 30 secondes à 13 000 rpm. Le culot est mis à sécher à l'air libre pendant 10 à 15 minutes ou jusqu'à ce qu'il devienne blanc. Pour éluer l'ADN, 20 µl de Tris-HCl 10 mM à pH 8.5 ou de l'eau sont additionnés et le culot est resuspendu en le vortexant. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à température ambiante, il est ensuite centrifugé pendant 30 secondes à 13 000 rpm. Le surnageant est mis dans un nouvel eppendorf. Cette dernière procédure est recommencée et les surnageant sont mis ensemble.

Pour finir, l'ADN est dosé au spectrophotomètre à 260 nm.

13. Le séquençage

La technique utilisée est un séquençage à fluorescence par PCR avec le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer, Branchburg, USA). Le fragment subit une réaction PCR en présence d'une seule amorce.

Le mélange PCR contient un pourcentage adéquat de didéoxynucléotides fluorescents inhibant ainsi l'élongation par des nucléotides non marqués. Suite à la réaction PCR, on obtient des amplicons de taille variable et terminés par un nucléotide marqué.

Ces amplicons sont placés sur un gel de polyacrylamide et migrent suivant leur taille. Un laser passe sur le banc de migration et excite les marqueurs fluorescents. Ceux-ci réémettent dans la lumière sous une autre longueur d'onde qui leur est propre. La succession des rayonnements est analysée et donne la séquence du fragment analysé .

13.1. Matériels

13.1.1. La réaction de PCR

1. Les produits de la RT-PCR.
2. Les amorces sens ou antisens .
3. Mélange : Terminator Ready Reaction Mix.
4. Eau.
5. Thermo-cycleur (GENE AMP 2400, Perkin Elmer, USA).

13.1.2. Purification des produits PCR

1. Acétate de sodium à pH 5.2 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
2. Ethanol 95 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
3. Produits de la réaction PCR.
4. Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
5. Centrifugeuse (Hepateus Sepatech, Biofuge 13).
6. Hétovaq.
7. Système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction cycle (Perkin-Elmer, Branchburg, USA).

13.2. Méthodes

13.2.1. La réaction PCR

Dans le tube PCR sont placés 10 à 30 ng/ μ l de produits RT-CR, 1 pmole d'amorce sens ou antisens, 4 μ l de Terminator Ready Reaction Mix et de l'eau pour atteindre un volume de 10 μ l. Ils sont ensuite placés dans le thermo-cycleur sous un programme correspondant à :

- une dénaturation 10 secondes à 96°C.
- une hybridation 5 secondes à 50°C.
- une élongation 4 minutes à 60°C.

Ce cycle est répété 25 X.

13.2.2. Purification des produits PCR

Pour chaque réaction de séquençage, 2 μ l d'acétate de sodium à pH 5.2 et 50 μ l d'éthanol 95 % sont placés dans un eppendorff ; les 10 μ l de la réaction PCR y sont ajoutés. Le tout est vortexé et placé sur glace pendant 10 minutes. Les eppendorffs sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 13 000 rpm . Le surnageant est alors enlevé, le culot est rincé en ajoutant 250 μ l d'éthanol 70 % et les échantillons sont mis à centrifuger 15 minutes pendant à 13 000 rpm. Le surnageant est enlevé et le culot est séché sous vide (Hétovaq).

Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel d'acrylamide 4 % et la lecture de la séquence est réalisée par l'appareil ABI.PRISM.

*Résultats et
discussion*

La partie expérimentale de ce mémoire se divise en deux parties. Dans un premier temps, nous étudierons l'activation des différentes PLA₂ d'un point de vue biochimique et ce, dans deux types cellulaires différents. Dans un deuxième temps, nous nous sommes consacrés à l'étude moléculaire de l'expression des PLA₂, par l'approche de la RT-PCR.

1. Etude biochimique des PLA₂

Les PLA₂ jouent un rôle essentiel dans l'inflammation par la production de différents médiateurs lipidiques mais aussi potentiellement par la libération d'espèces réactives de l'oxygène via la cyclooxygénase. L'IL-1, mais aussi l'hypoxie et peut-être les LDL oxydées induisent une augmentation de l'activité PLA₂ dans les cellules endothéliales mais la nature des PLA₂ impliquées n'est pas clairement établie.

Si les différentes PLA₂ commencent à être bien connues, très peu de données existent quant à leur régulation, que ce soit au niveau transcriptionnel ou au niveau post traductionnel. Ceci est d'autant plus vrai que les mécanismes responsables de la régulation de l'activité et de l'expression des différentes PLA₂ peuvent être différents soit qualitativement, soit quantitativement dans différents types cellulaires.

Comme premier modèle expérimental, nous avons étudié l'activation des PLA₂ par l'IL-1 dans deux types des cellules endothéliales. L'IL-1 a été choisie car elle constitue un modèle bien connu d'activation des cellules endothéliales.

Ensuite, nous sommes passés à l'étude des PLA₂ dans le contexte de l'athérosclérose. En effet, l'hypothèse que nous avons émise était que les LDL oxydées pourraient augmenter l'activité des PLA₂. Nous savons déjà que les PLA₂ peuvent jouer un rôle dans l'oxydation des LDL.

Pour finir, nous avons tenté d'étudier les PLA₂ lors de l'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie. L'activité de ces enzymes est en effet augmentée sous hypoxie. Ces résultats peuvent avoir une signification importante dans le cadre des pathologies variqueuses.

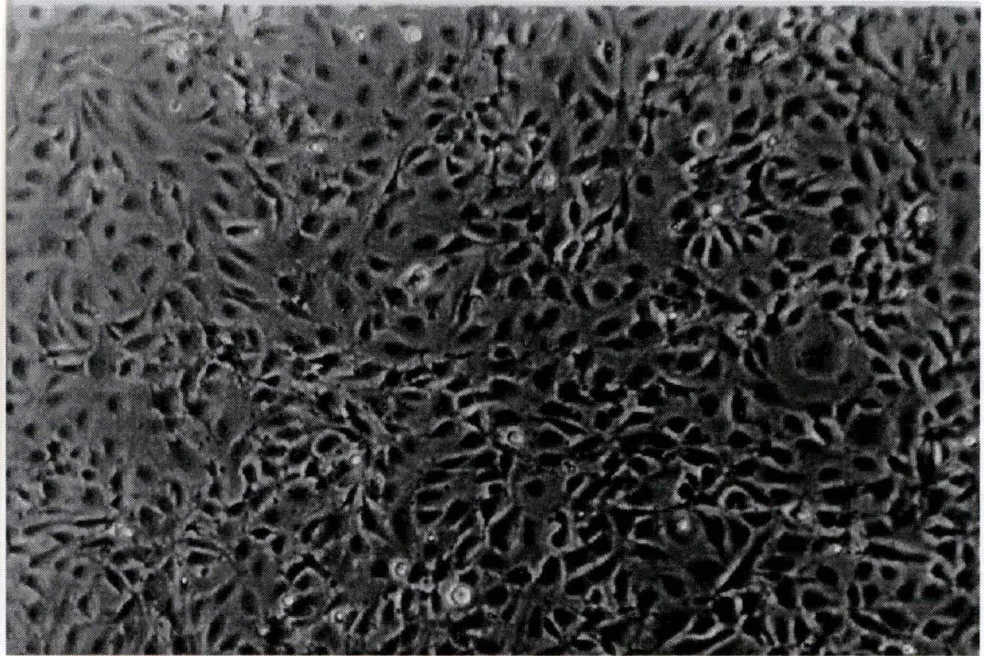


Photo III. 1: Photographie au microscope à contraste de phase (grossissement 115 X) des cellules HMEC-1.

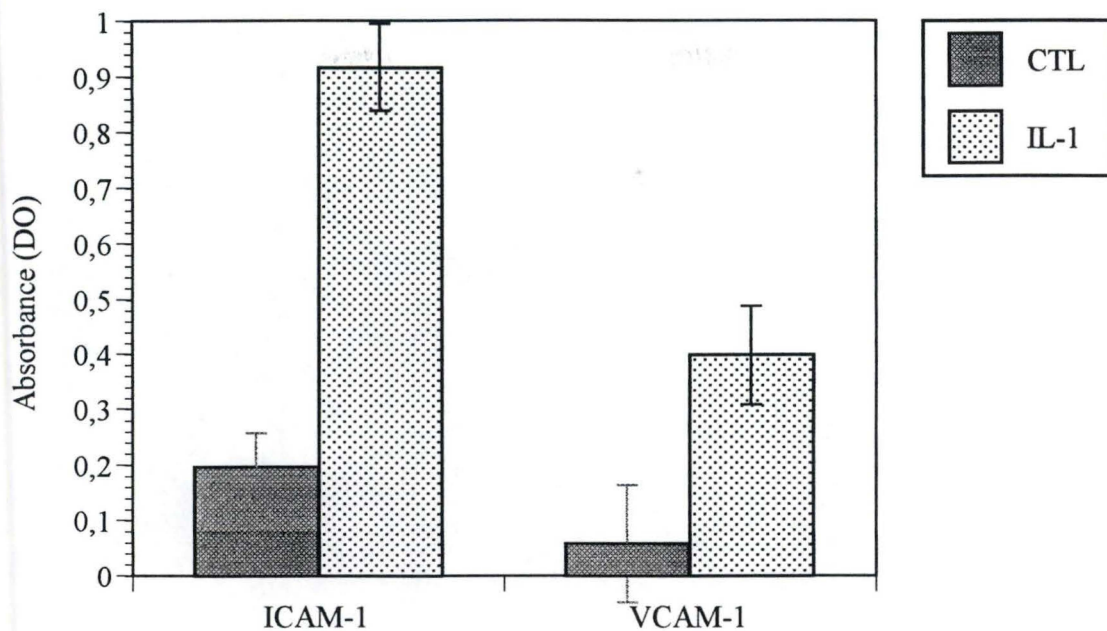


Figure III.1: Effet de l'IL-1 sur l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 sur les cellules HMEC-1. Les cellules ont été stimulées ou non avec 5 ng/ml d'IL-1 pendant 4 heures. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3)

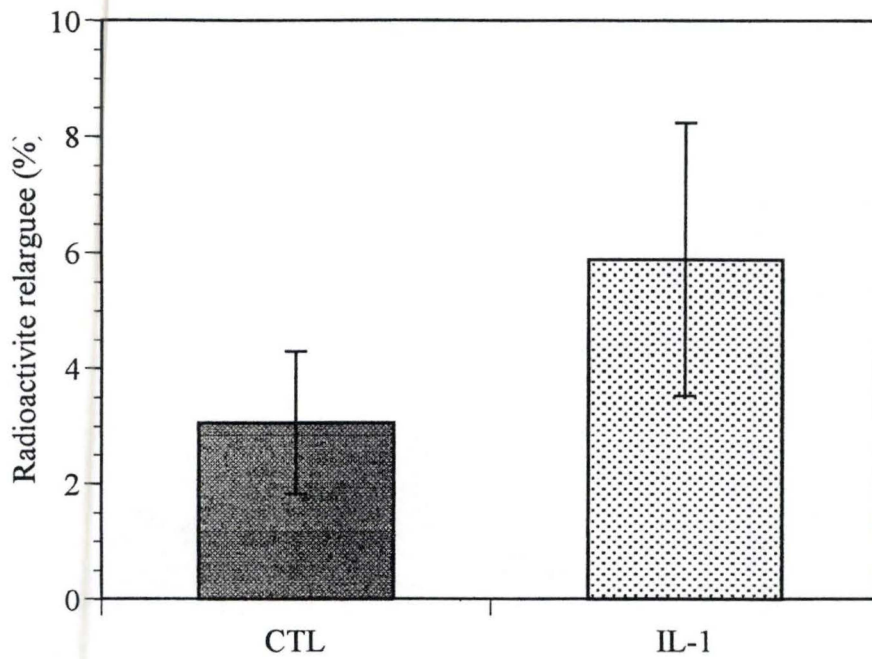


Figure III.2: Effet de l'IL-1 (5 ng/ml) sur l'activité PLA2 après une stimulation de 4 heures des cellules HMEC-1. Les cellules sont pré-incubées avec de l'acide arachidonique (AA) tritié pendant 18 h. Après stimulation des cellules, le surnageant est prélevé et la radioactivité relarguée est rapportée à la radioactivité totale (surnageant + lysat cellulaire) en %. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

1.1. Etude sur les HMEC-1

Dans un premier temps, nous avons utilisé les HMEC-1 (human microvascular endothelial cells) (photo III.1) comme modèle expérimental et ce, pour plusieurs raisons: ces cellules appartiennent à une lignée mais gardent un phénotype bien différencié. Il était donc plus facile de commencer à travailler avec de telles cellules. De plus, elles étaient disponibles au laboratoire, contrairement aux HCAEC qui ne l'étaient pas quand nous avons débuté ce travail.

1.1.1. Expression des protéines d'adhérences ICAM-1 et VCAM-1

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que l'IL-1 induisait bien une augmentation de l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 dans les HMEC-1, ce qui constitue un bon critère pour évaluer la capacité des cellules à répondre à un stimulus activateur.

Cette expression a été étudiée grâce à un test ELISA réalisé à la surface des cellules. Les cellules ont été incubées avec ou sans IL-1 β à une concentration finale de 5 ng/ml pendant 4 heures. La figure III.1 présente les résultats obtenus. Nous observons, comme prévu, une expression basale de ICAM-1 mais pas de VCAM-1 et une nette augmentation de l'expression des deux molécules d'adhésion par l'IL-1. Ces résultats montrent que les cellules répondent bien à l'IL-1.

1.1.2 Dosage des PLA₂ par relargage d'acide arachidonique

Pour estimer l'activité des PLA₂, nous avons utilisé la méthode de relargage de l'acide arachidonique tritié préalablement incorporé dans les membranes cellulaires, comme décrit au point 4 des "Matériels et méthodes". Ce test est une mesure indirecte de l'activité PLA₂.

Nous avons tout d'abord vérifié l'effet de l'IL-1 β sur l'activité des PLA₂ dans les cellules HMEC-1. Pour cela, les cellules ont été pré-incubées avec de l'acide arachidonique (AA) radioactif pendant 18 h, puis stimulées 4 heures en présence d'IL-1 β (5 ng/ml). On détermine ensuite la radioactivité libérée dans le milieu de culture. Les résultats, présentés à la

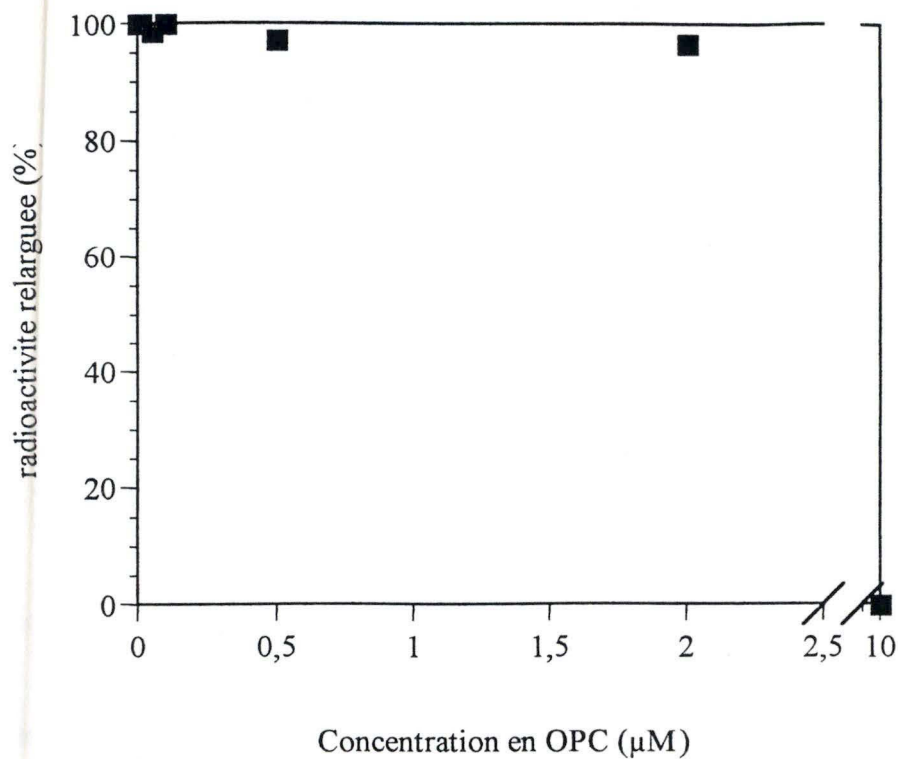


Figure III.3: Courbe de viabilité des cellules HMEC-1 en présence de différentes concentrations en AACOCF3 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2 et 10 μM) après une incubation de 4 heures, le AACOCF3 étant un inhibiteur de cPLA2. Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules, après coloration au bromure d'éthidium/acridine orange.

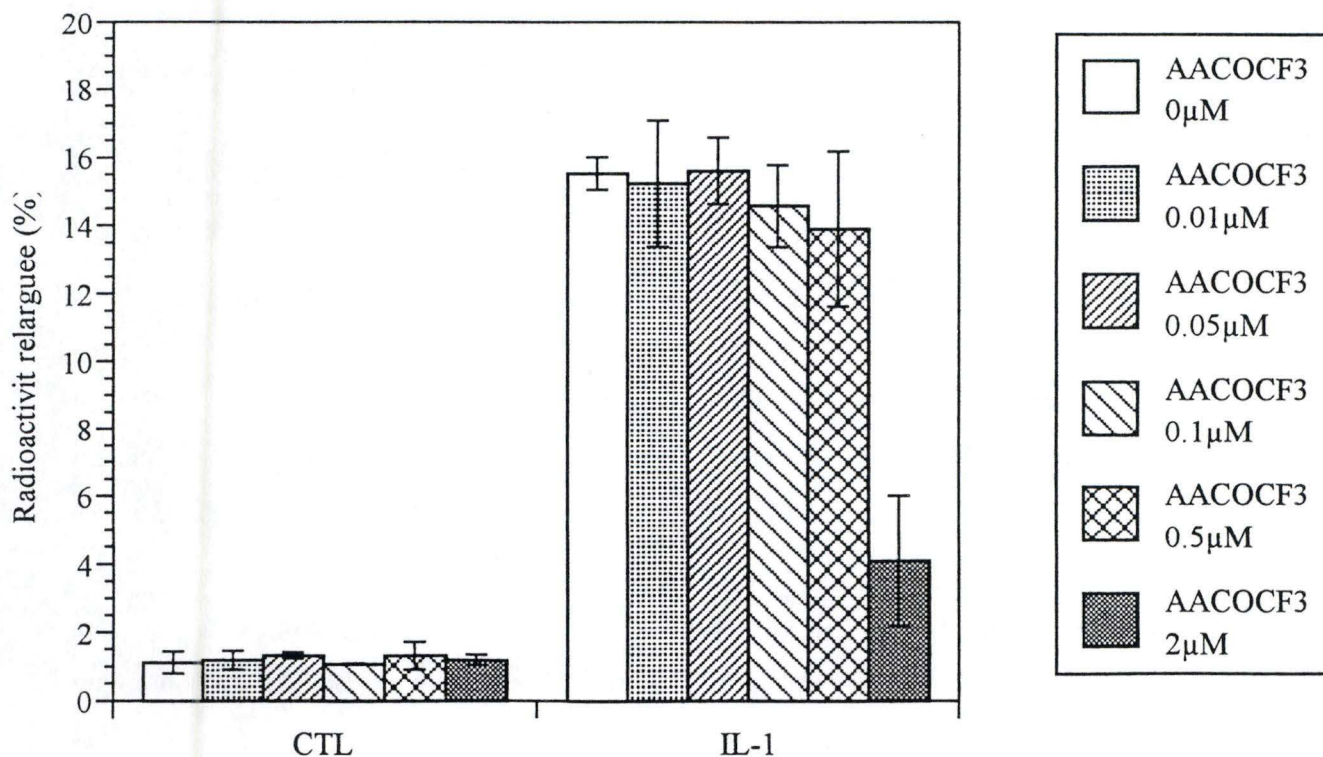


Figure III.4: Effet de différentes concentrations en AACOCF3 (inhibiteur de la cPLA2) sur l'activité PLA2 induite ou non par l'IL-1 (5 ng/ml) après une incubation de 4 heures des cellules HMEC-1. L'activité PLA2 est estimée par la radioactivité relarguée, rapportée à la radioactivité totale (surnageant - lysat cellulaire). Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

figure III.2, montrent que la libération de l'acide arachidonique double lorsque les cellules sont stimulées avec de l'IL-1.

- Dosage des PLA₂ en présence d'inhibiteurs des PLA₂

Nous avons ensuite tenté de savoir quel type de PLA₂ était activée par l'IL-1 dans les cellules HMEC-1. Pour ce faire, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques des 3 groupes principaux de PLA₂: le AACOCF₃, inhibiteur de la PLA₂ cytosolique (cPLA₂), le HELSS, inhibiteur de la PLA₂ indépendante du calcium (iPLA₂) et l'oleoyloxyéthyl phosphorylcholine (OPC), inhibiteur de la PLA₂ soluble (sPLA₂).

a) Effet du AACOCF₃

L'AACOCF₃ est un dérivé trifluoro méthylcétone de l'acide arachidonique. C'est un inhibiteur spécifique de la cPLA₂ et de la iPLA₂ avec une IC₅₀ dans les cellules myélocytaires de 8 μM .

Avant d'étudier l'effet de cette molécule sur l'activité PLA₂ des cellules, nous avons vérifié si elle n'était pas cytotoxique aux concentrations utilisées. Pour cela, nous avons réalisé un test de cytotoxicité au bromure d'éthidium-acridine orange en incubant les cellules HMEC-1 4 heures en présence de différentes concentrations en AACOCF₃. Les résultats, présentés à la figure III.3, montrent que cet inhibiteur est toxique pour les cellules à une concentration de 10 μM. Nous avons donc utilisé des concentrations plus faibles en AACOCF₃ dans la suite des expériences.

Nous avons ensuite étudié l'effet de cet inhibiteur sur l'activité PLA₂ induite ou non par l'IL-1. Concrètement, les cellules ont été incubées pendant 4 heures avec les concentrations choisies en inhibiteur et ce, avec ou sans IL-1β (5 ng/ml). Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.4. Nous observons que la libération de l'AA augmente de 1 à 15 % suite à stimulation à l'IL-1. L'AACOCF₃ ne modifie pas l'activité PLA₂ basale. Par contre, l'inhibiteur, à une concentration de 2 μM, inhibe l'activité de l'enzyme induite ou activée par

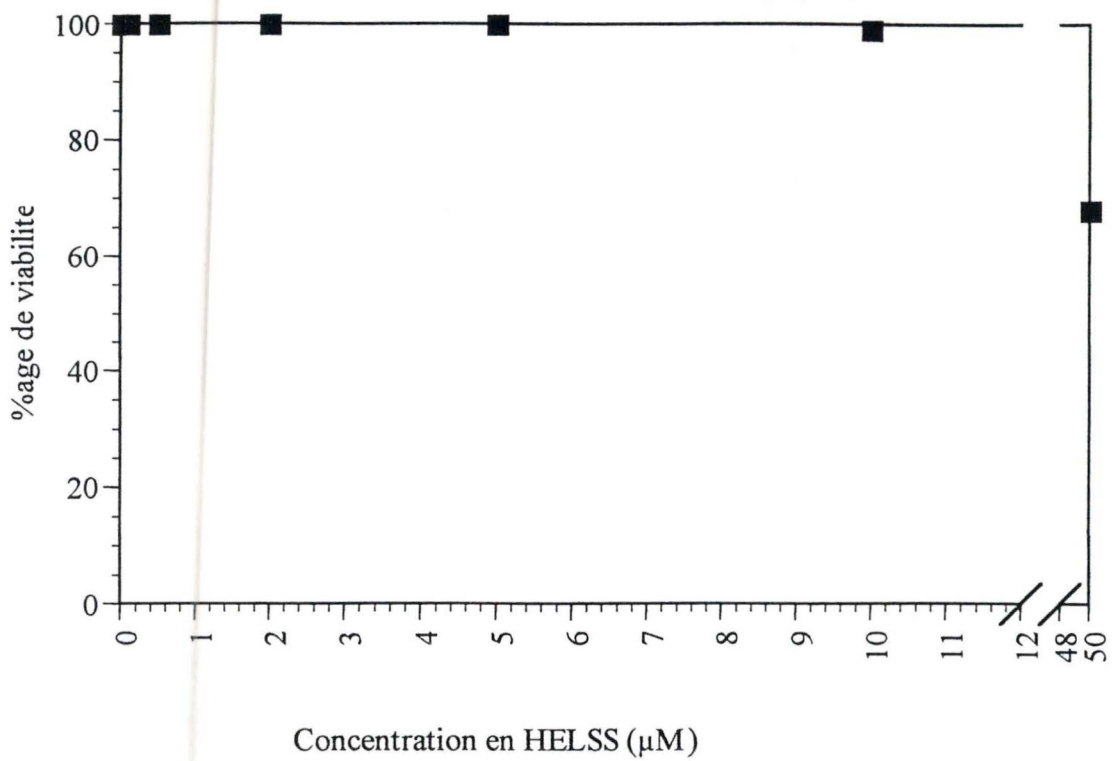


Figure III.5: Courbe de viabilité des cellules HMEC-1 en présence de différentes concentrations en HELSS (0, 0.1, 0.5, 2, 5, 10 et 50 μM) après une incubation de 4 heures, l'HELSS étant un inhibiteur de iPLA2. Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules, après coloration au bromure d'éthidium/acridine orange.

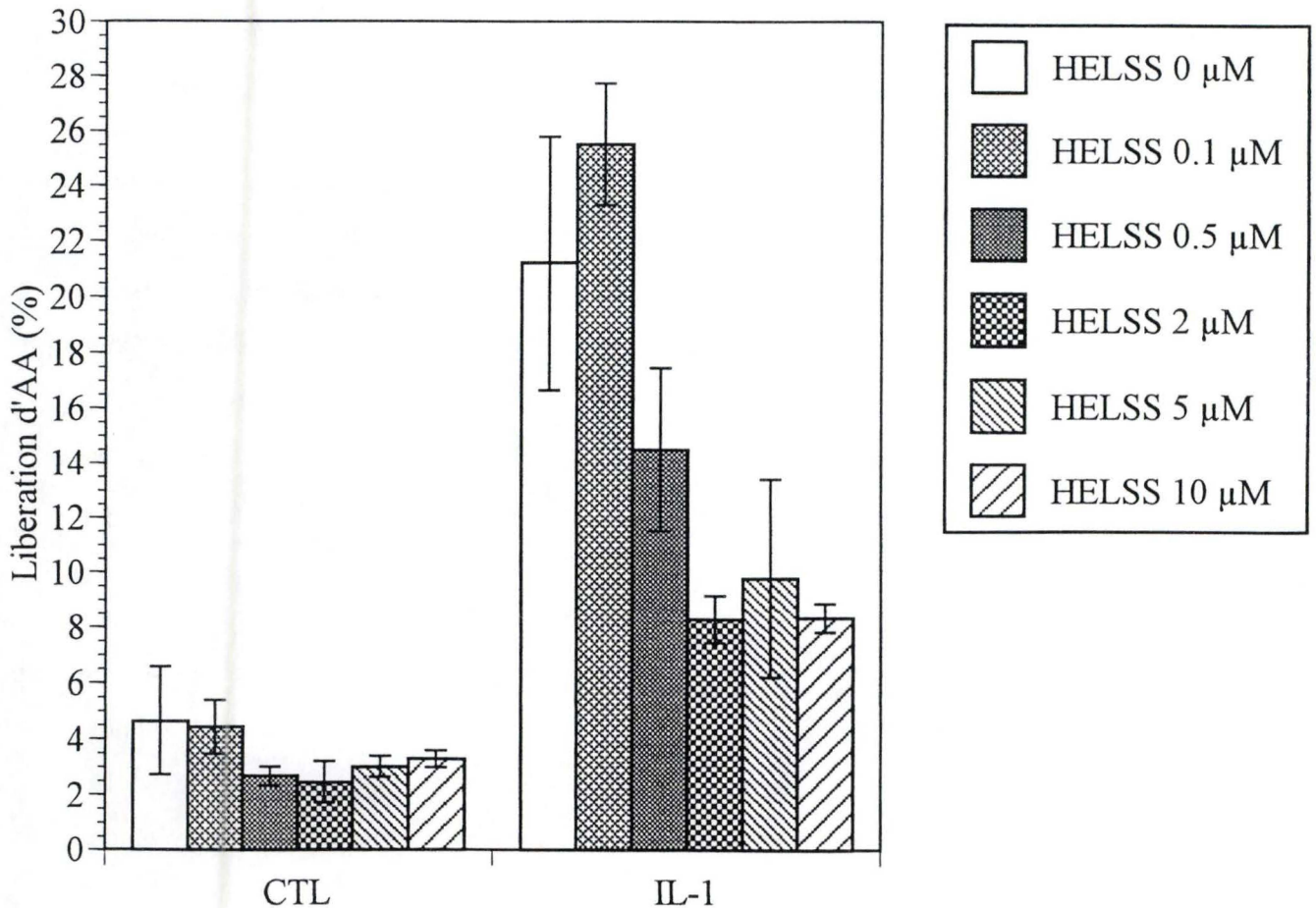


Figure III.6: Effet de différentes concentrations en HELSS (inhibiteur de iPLA2) sur l'activité PLA2 induite ou non par l'IL-1 (5 ng/ml) après une incubation de 4 heures des cellules HMEC-1. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

l'IL-1 de 80 %. Nous pouvons donc suggérer qu'une cPLA₂ ou une iPLA₂ est induite par l'IL-1 dans ces cellules.

b) Effet de HELSS

Le HELSS est un substrat suicide des PLA₂. C'est un inhibiteur irréversible puissant des iPLA₂ avec une sélectivité de 1000 X supérieure pour les iPLA₂ par rapport aux PLA₂ dépendantes du calcium.

De même que pour l'inhibiteur précédent, une courbe de viabilité des cellules a été réalisée en présence de concentrations croissantes en inhibiteur. Les résultats (figure III.5) montrent que la viabilité est maintenue à 100 % jusqu'à une concentration de 10 µM. A 50 µM, une mortalité de 30 % est observée.

L'effet de cet inhibiteur sur l'activité des PLA₂ dans les cellules HMEC-1 a été testé dans les mêmes conditions que celles de l'expérience précédente, c'est-à-dire 4 heures de stimulation et pour une concentration en IL-1 de 5 ng/ml. On observe que l'IL-1 augmente le relargage d'acide arachidonique de 4 à 20 % (figure III.6). Le HELSS semble inhiber légèrement l'activité PLA₂ basale aux concentrations les plus grandes. Une inhibition croissante en présence de concentrations croissantes en HELSS de l'activité PLA₂ induite par l'IL-1 est observée. Une inhibition de 74 % de l'activité PLA₂ est observée à une concentration de 2 µM en HELSS. Ces résultats indiquent qu'une iPLA₂ serait induite par l'IL-1.

c) Effet du OPC

L'oléoyloxyéthyl phosphorylcholine est un inhibiteur analogue de substrat. Il inhibe de manière sélective la sPLA₂ par rapport à la cPLA₂, avec un IC₅₀ de 14 µM.

Une courbe de cytotoxicité de l'inhibiteur a tout d'abord été réalisée. Les résultats sont présentés à la figure III.7. Aucune toxicité n'est observée sur les cellules HMEC-1, pour la gamme de concentrations testées.

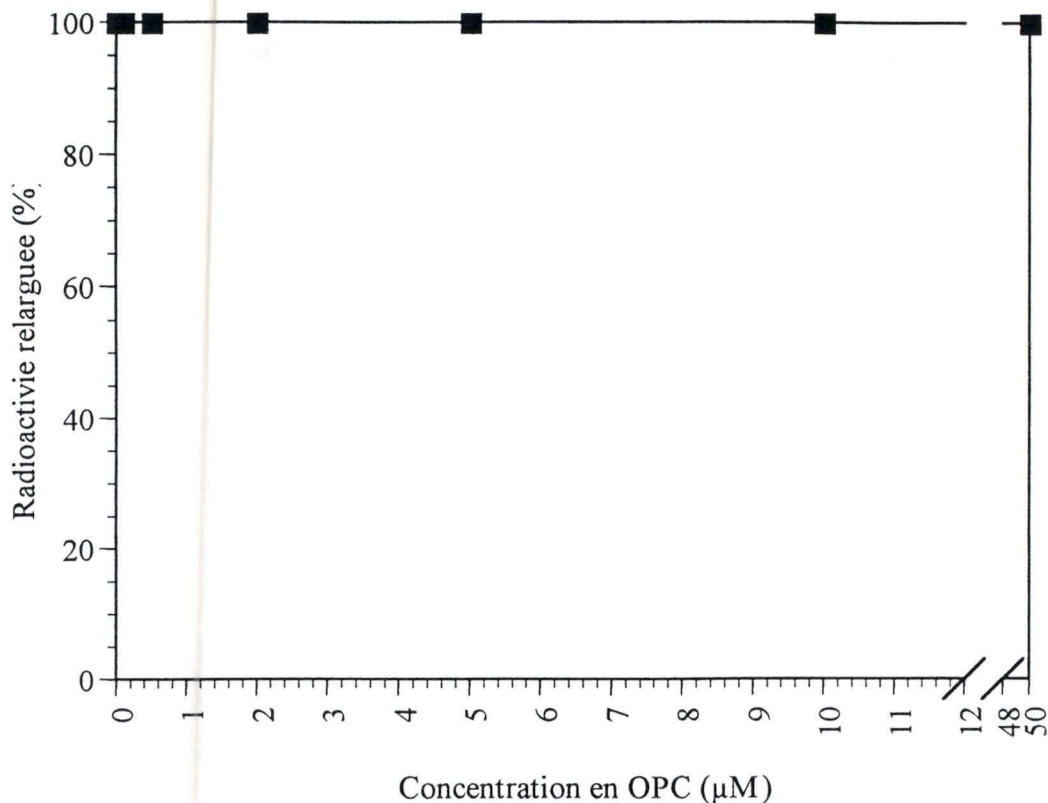


Figure III.7: Courbe de viabilité des cellules HMEC-1 en présence de différentes concentrations en OPC (0, 0.1, 0.5, 2, 5, 10 et 50 μM) après une incubation de 4 heures, l'OPC étant un inhibiteur de sPLA2. Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules, après coloration au bromure d'éthidium/acridine orange.

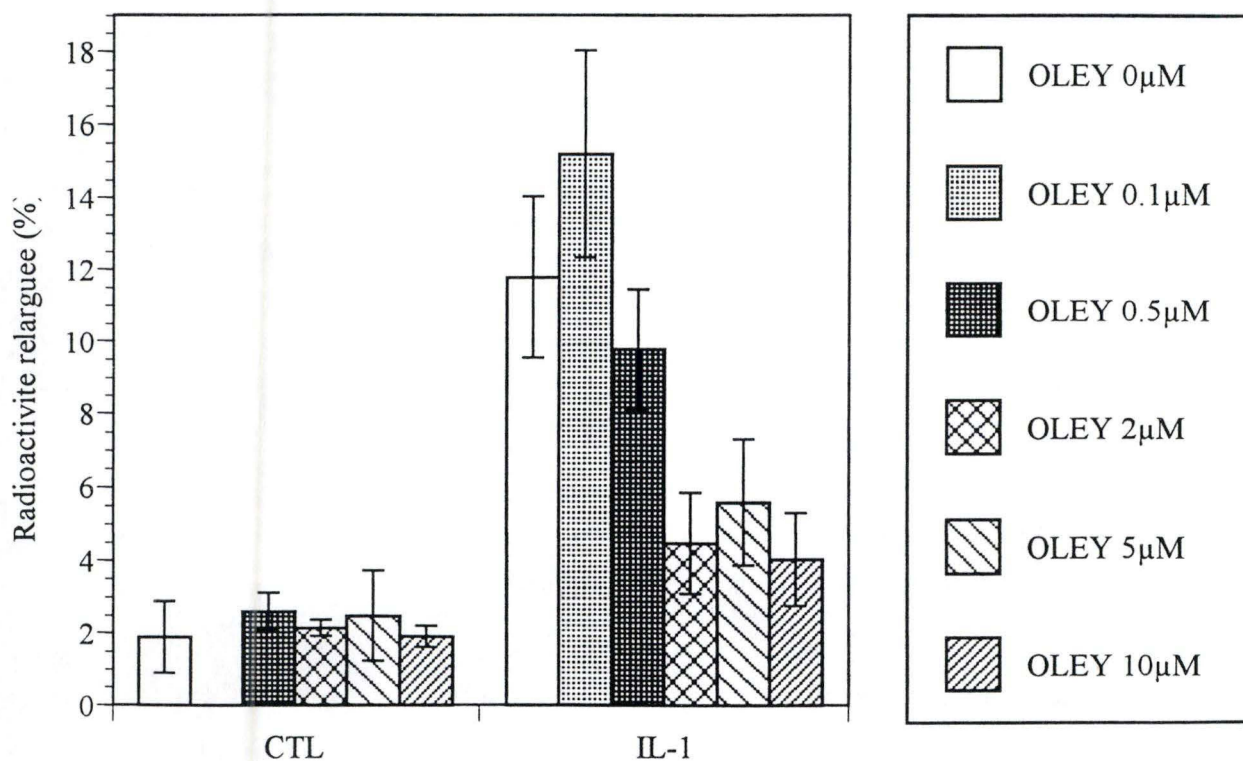


Figure III.8: Effet de différentes concentrations en OPC (inhibiteur de sPLA2) sur l'activité des PLA2 induite ou non par l'IL-1 (5 ng/ml) après une incubation de 4 heures. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

Inhibiteur	% d'inhibition maximale observée	Concentration (μM)
AACOCF3	80 %	2
HELSS	78 %	2
OPC	74 %	2

Tableau III.1: Tableau récapitulatif des effets inhibiteurs des 3 molécules sur l'activité PLA2 induite par l'IL-1 après 4 heures de stimulation de HMEC-1. Sont données les inhibitions maximales observées (en %), avec la concentration correspondante pour chaque inhibiteur, et ce pour la gamme de concentrations testées.

De la même façon que pour les deux autres inhibiteurs, l'effet de l'OPC sur l'activité PLA₂ induite ou non par l'IL-1 a été étudiée. La figure III.8 montre que la libération d'AA est augmentée suite à la stimulation avec l'IL-1. Aucun effet de l'OPC n'est observé sur l'activité basale. Cependant, en ce qui concerne l'activité PLA₂ induite par l'IL-1, on observe un effet inhibiteur dose-dépendant de l'OPC : une inhibition significative de 74 % est observée à une concentration en OPC de 2 µM. Ces résultats suggèrent qu'une sPLA₂ serait induite ou activée sous IL-1 dans les cellules HMEC-1.

1.1.3. Discussion

Afin d'étudier quel type de PLA₂ est induit lors d'une activation par l'IL-1, nous avons testé des concentrations croissantes en inhibiteurs de sPLA₂, cPLA₂ et iPLA₂ sur la libération d'acide arachidonique préalablement incorporé dans les cellules. Les effets des inhibiteurs sont résumés dans le tableau III.1. On observe que les trois inhibiteurs ont un effet important sur l'activité PLA₂ induite par l'IL-1. Ces résultats sont surprenants car ils laissent suggérer que les trois types de PLA₂ seraient induits suite à la stimulation pendant 4 heures à l'IL-1.

Une hypothèse plausible pour expliquer ces résultats serait le fait que les inhibiteurs des différentes PLA₂ ne sont pas spécifiques à 100 %. D'après les données de la firme fabriquant ces molécules, le AACOCF3 inhibe la cPLA₂, mais également les iPLA₂; le HELSS inhibe 1000 X plus les iPLA₂ que les PLA₂ dépendantes du calcium et l'OPC inhibe sélectivement la sPLA₂ et non les cPLA₂. En outre, ces tests de spécificité ont été réalisés sur des enzymes recombinantes purifiées, à l'inverse des travaux présentés ici, effectués sur des cellules entières. Afin de vérifier si plusieurs PLA₂ sont effectivement activées par l'IL-1, des expériences réalisées en présence de 2 inhibiteurs simultanément restent à réaliser. Ces expériences permettraient de confirmer ou non des effets additifs pour certaines combinaisons d'inhibiteurs.

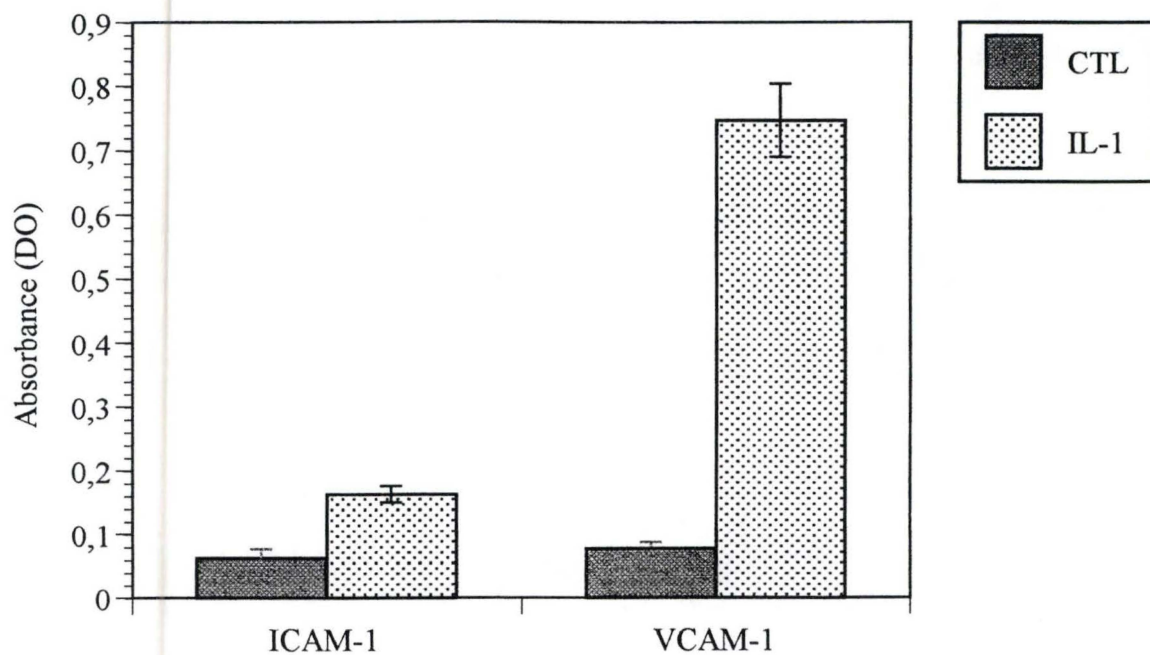


Figure III.9: Effet de l'IL-1 (5 ng/ml) sur l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 sur les cellules HMEC-1. Les cellules ont été stimulées ou non pendant 4 heures. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3)

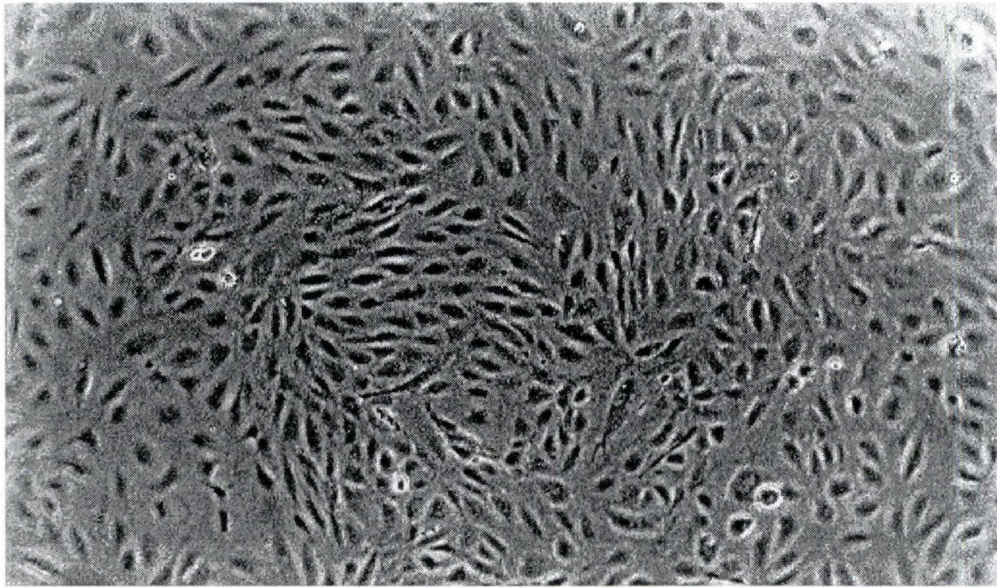


Photo III. 2: Photographie au microscope à contraste de phase (grossissement 115 X) des cellules HCAEC.

1.2. Etude sur les HCAEC

Nous nous sommes ensuite intéressés aux HCAEC (human coronary artery endothelial cells) (photo III.2). Ces cellules proviennent d'une artère considérée comme site privilégié pour les lésions athérosclérotiques.

Sur ce type cellulaire, nous avons d'abord étudié la stimulation sous IL-1. Ensuite, nous avons voulu voir si l'activité PLA₂ était également accrue en présence de diverses préparations de LDL, plus ou moins oxydées ou lorsque les cellules sont soumises à une hypoxie. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, les PLA₂ jouent un rôle dans l'athérosclérose et dans les processus d'activation des cellules endothéliales sous hypoxie.

1.2.1. Stimulation par l'IL-1

Comme pour les HMEC-1, l'induction de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 par l'IL-1 a été vérifiée sur les cellules HCAEC. Les cellules sont stimulées ou non par l'IL-1 (5 ng/ml) pendant 4 heures et l'expression de ces molécules d'adhérence est quantifiée par un ELISA de surface. Les résultats, présentés à la figure III.9, montre une expression basale d'ICAM-1 et pas de VCAM-1 et une nette augmentation de l'expression des deux molécules d'adhérence par l'IL-1.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'IL-1 (5 ng/ml) sur l'activité PLA₂ au cours du temps. La figure III.10 représente les résultats obtenus. On observe un relargage basal d'acide arachidonique qui augmente légèrement avec le temps. L'IL-1 augmente fortement l'activité PLA₂ : on passe de + 40 % de radioactivité relarguée après 2 heures, à 20 % après 24 heures.

Dans le but de voir si la libération de radioactivité induite par l'IL-1, exigeait une néosynthèse de protéines dont la PLA₂, nous avons réalisé une incubation des cellules en présence d'IL-1 et d'un inhibiteur de la traduction, la cycloheximide (CHX). Nous avons utilisé cette molécule aux concentrations suivantes: 10⁻⁸M, 10⁻⁷M et 10⁻⁶M, pendant incubation de 4 heures et ce, en présence ou non de 5 ng/ml d'IL-1. Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.11. En présence d'IL-1, l'activité PLA₂ est bien augmentée, mais on

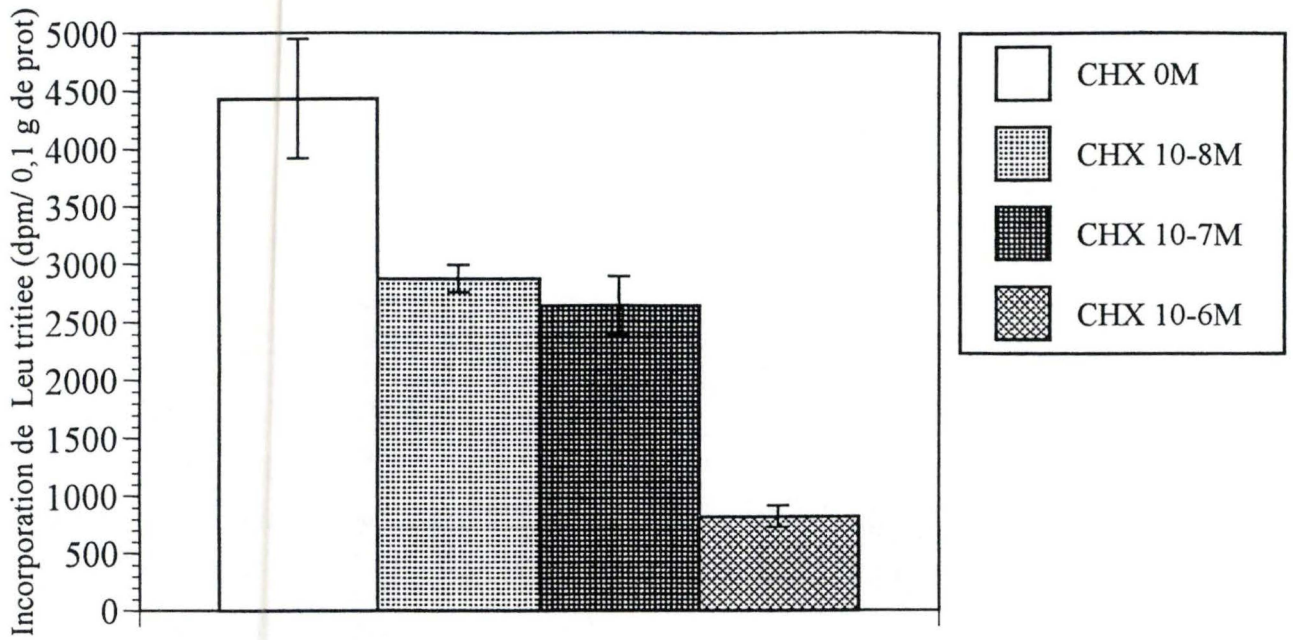


Figure III.12: Effet de différentes concentrations en cycloheximide (CHX) sur l'incorporation de leucine tritiée après une incubation de 4 heures. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

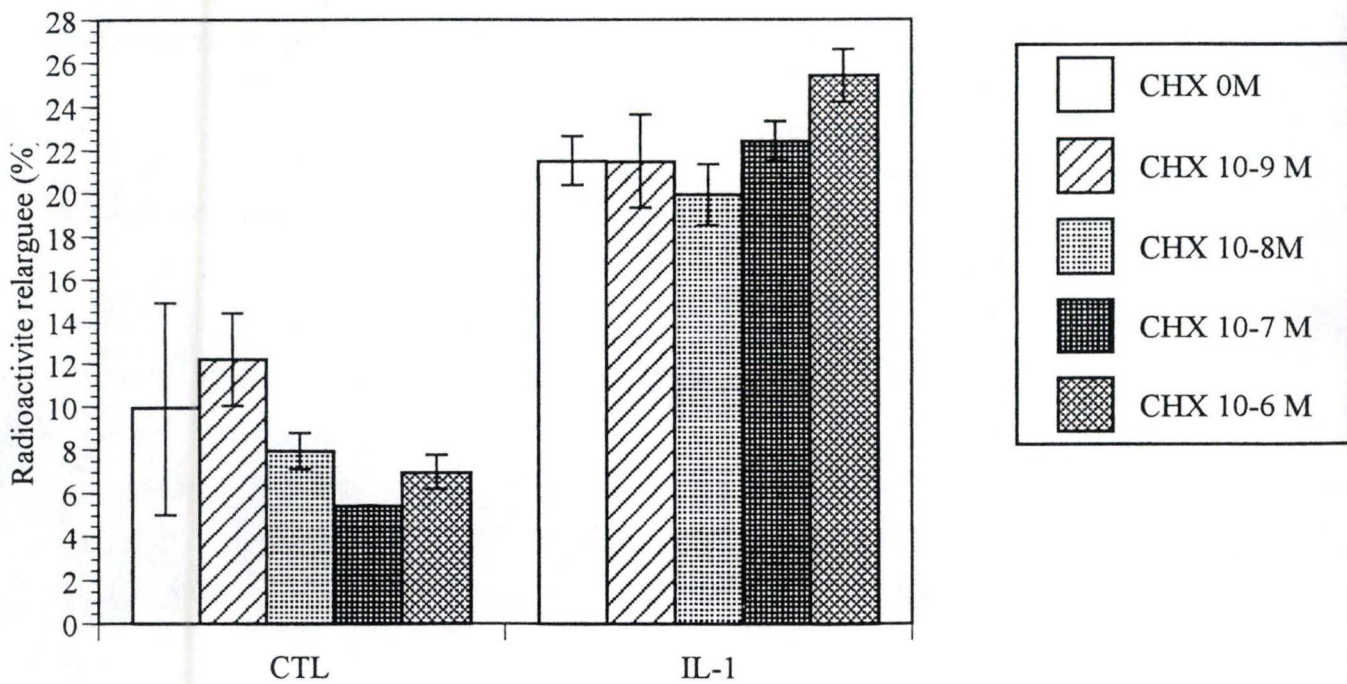


Figure III.13: Effet de différentes concentrations en cycloheximide (CHX) sur l'activité PLA2 induite ou non par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 24 heures des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

n'observe pas d'inhibition par la cycloheximide, à aucune concentration testée. La légère augmentation de la libération d'acide arachidonique en présence de cycloheximide à 10^{-6} M en conditions basales et en présence d'IL-1, est probablement due à un léger effet toxique de cette molécule sur les cellules. Cet effet toxique a été effectivement observé de manière plus importante aux concentrations de 10^{-4} et 10^{-5} M (résultats non montrés).

Nous avons vérifié que la cycloheximide inhibait bien la traduction des protéines aux concentrations utilisées. Pour cela, nous avons incubé les cellules, en présence de cycloheximide, avec de la [3 H]-leucine, pendant 4 heures: la leucine tritiée est incorporée dans les protéines nouvellement synthétisées. Les résultats sont présentés à la figure III.12. Nous constatons que plus la concentration en CHX est élevée, moins l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines néosynthétisées est importante. Ces résultats indiquent que la CHX inhibe bien la synthèse des protéines aux concentrations utilisées.

L'effet de la cycloheximide a également été testé pour une incubation de 24 heures. Les concentrations utilisées étaient de 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M et 10^{-6} M. La figure III.13 montre que s'il y a bien une nette augmentation de la libération d'AA en présence d'IL-1, aucune inhibition par la cycloheximide n'est observée. L'ensemble des résultats obtenus en présence de cycloheximide indiquent que, bien que cette molécule inhibe effectivement la synthèse protéique, elle n'inhibe pas la libération d'AA induite par l'IL-1. Cela suggère donc que cette augmentation n'est pas due à une induction de l'expression génétiques des enzymes responsables du relargage d'acide arachidonique mais à leur activation biochimique.

- Dosage des PLA₂ en présence d'inhibiteur des PLA₂

Afin d'essayer d'identifier le type de PLA₂ activée par l'IL-1 dans les cellules HCAEC, les inhibiteurs décrits pour les tests sur les cellules HMEC-1 ont été utilisés: le AACOCF₃, inhibiteur de la cPLA₂ et de la iPLA₂; le HELSS, inhibiteur de la iPLA₂ et l'OPC, inhibiteur de la sPLA₂. L'effet de chacun de ces inhibiteurs a été étudié après 4 et 24 heures d'incubation.

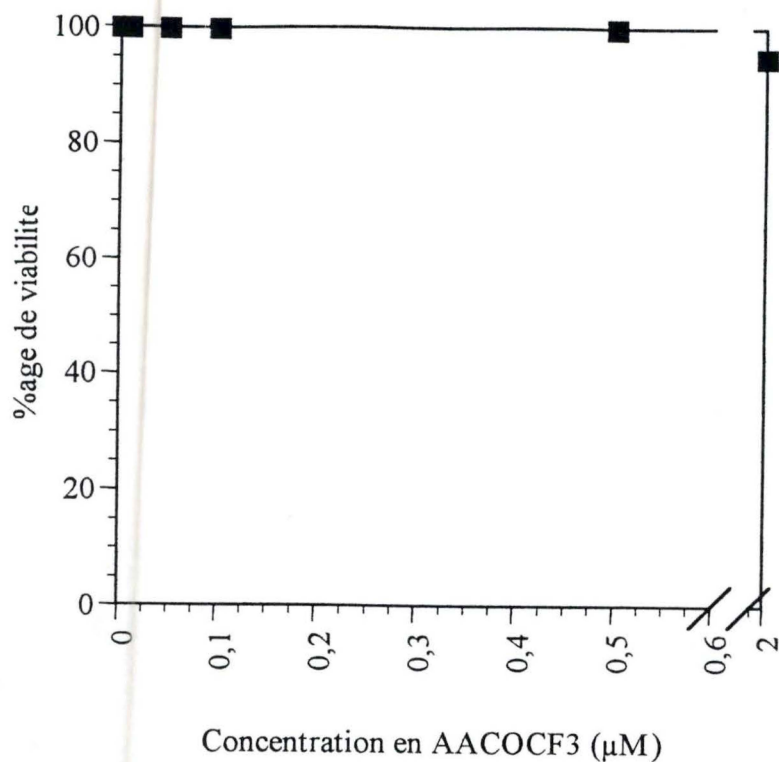


Figure III. 14: Courbe de viabilité des cellules HCAEC en présence de différentes concentrations en AACOCF3 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 et 2 μM) après une incubation de 4 heures, le AACOCF3 étant un inhibiteur de cPLA2 . Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules.

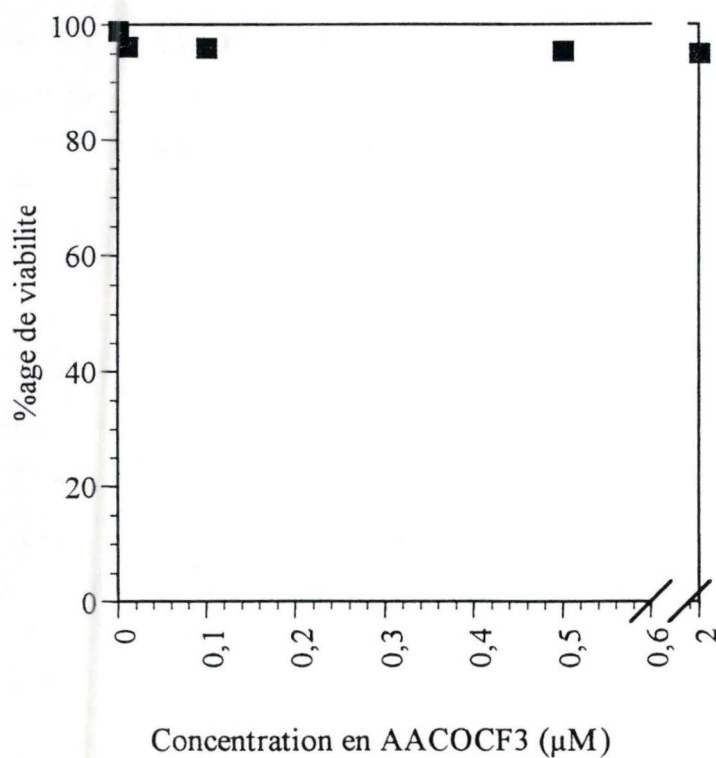


Figure III.15: Courbe de viabilité des cellules HCAEC en présence de différentes concentrations en AACOCF3 (0, 0.01, 0.1, 0.5, 2 μM) après une incubation de 24 heures, le AACOCF3 étant un inhibiteur des cPLA2. Chaque point représente le comptage de \pm 200 cellules.

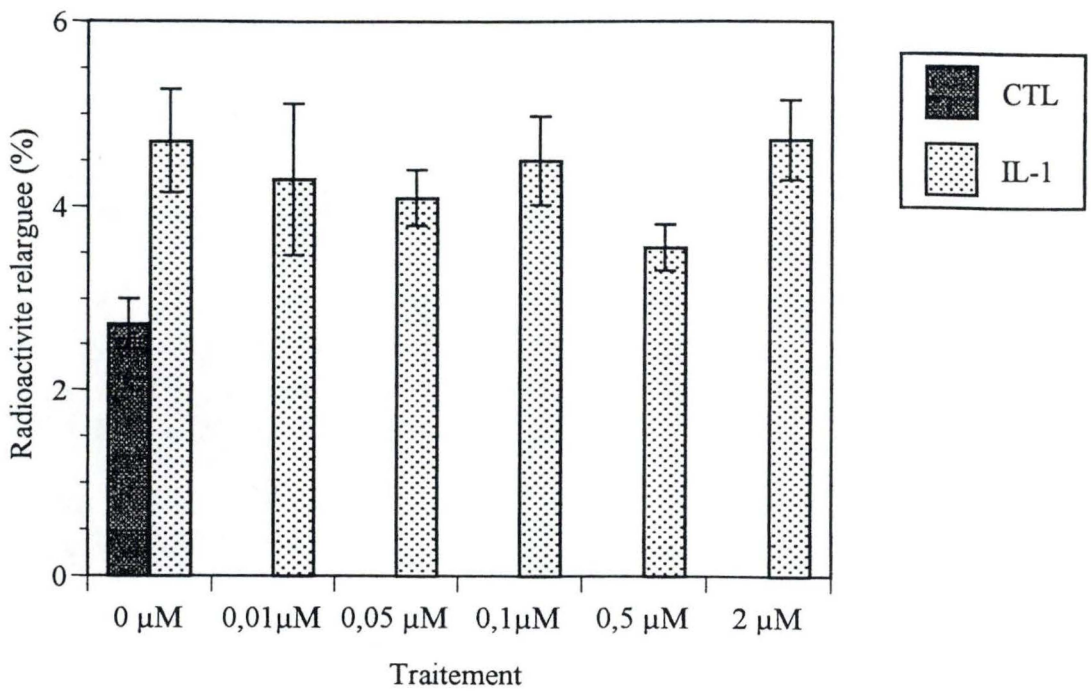


Figure III.16: Effet de différentes concentrations en AACOCF3 (inhibiteur de cPLA2) sur l'activité des PLA2 induite par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 4 heures des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3 pour les différentes concentrations en AACOCF3 et n=6 pour les contrôles).

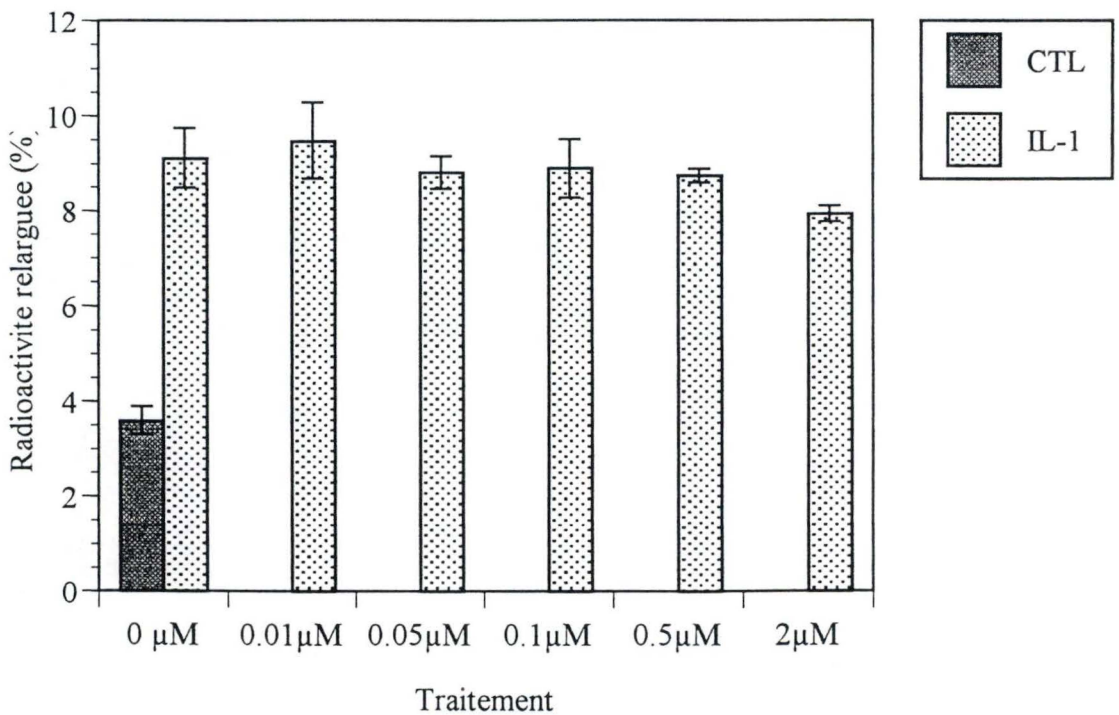


Figure III. 17: Effet de différentes concentrations en AACOCF3 (inhibiteur de cPLA2) sur l'activité PLA2 induite par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 24 heures des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3 pour les différentes concentrations en AACOCF3 et n=6 pour les contrôles).

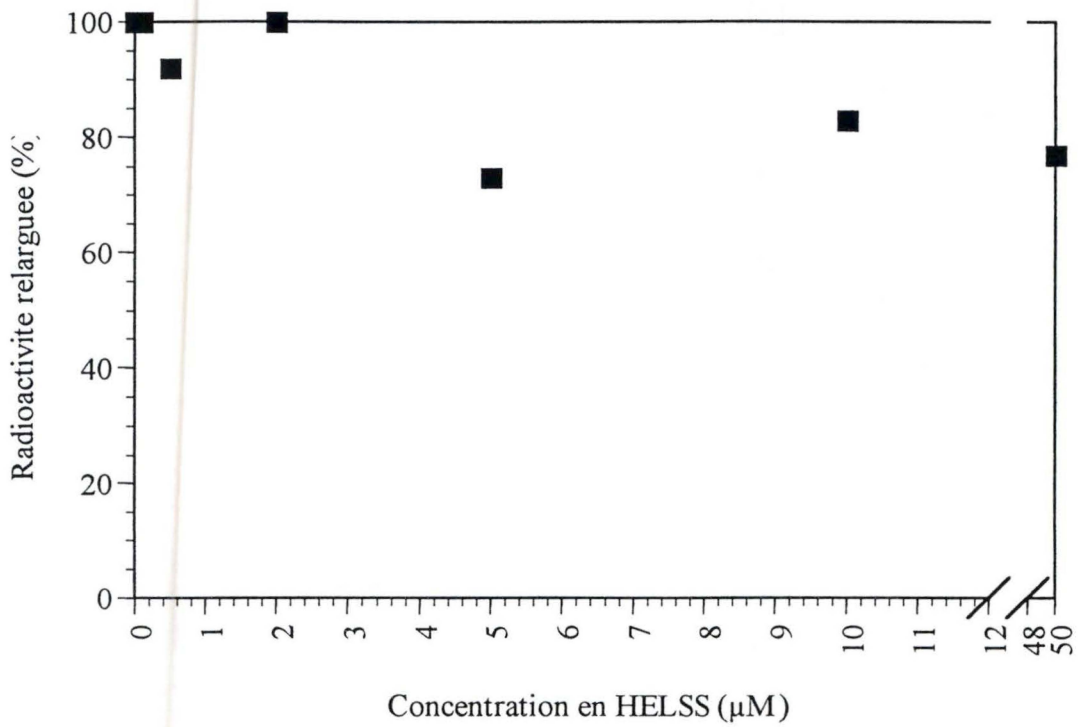


Figure III.18: Courbe de viabilité des cellules HCAEC en présence de différentes concentrations en HELSS (0, 0.1, 0.5, 2, 5, 10 et 50 μM) après une incubation de 4 heures, le HELSS étant un inhibiteur de iPLA2. Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules.

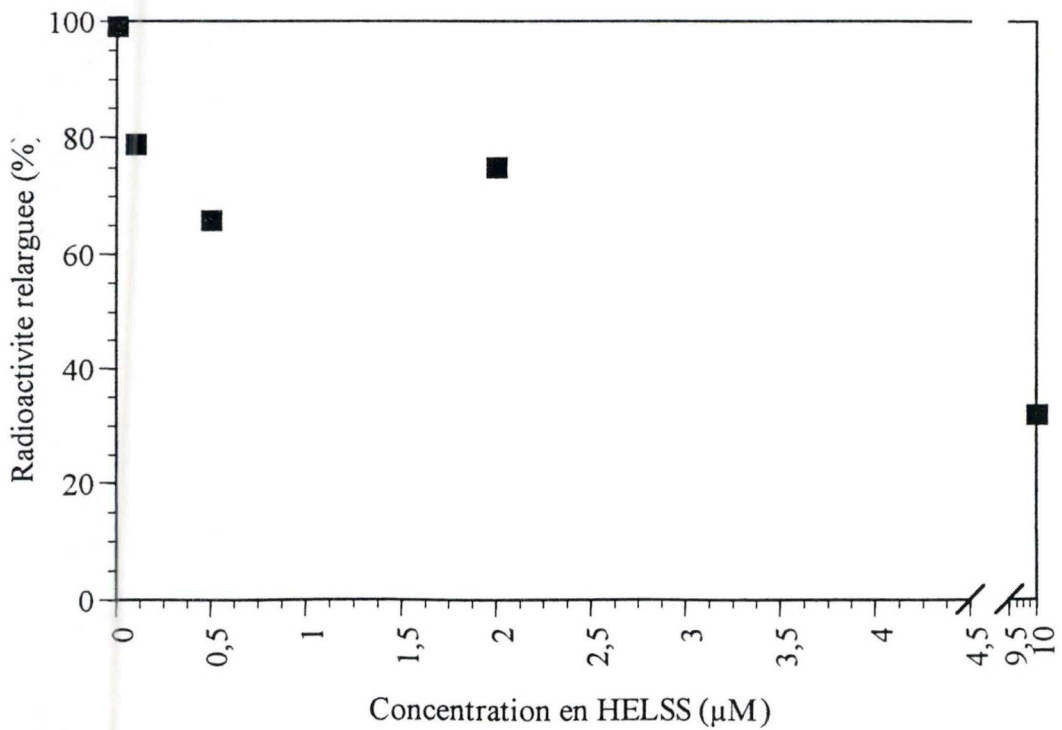


Figure III.19: Courbe de viabilité des cellules HCAEC en présence de différentes concentrations en HELSS (0, 0.1, 0.5, 2, 5 et 10 μM) après une incubation de 24 heures, le HELSS étant un inhibiteur de iPLA2. Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules.

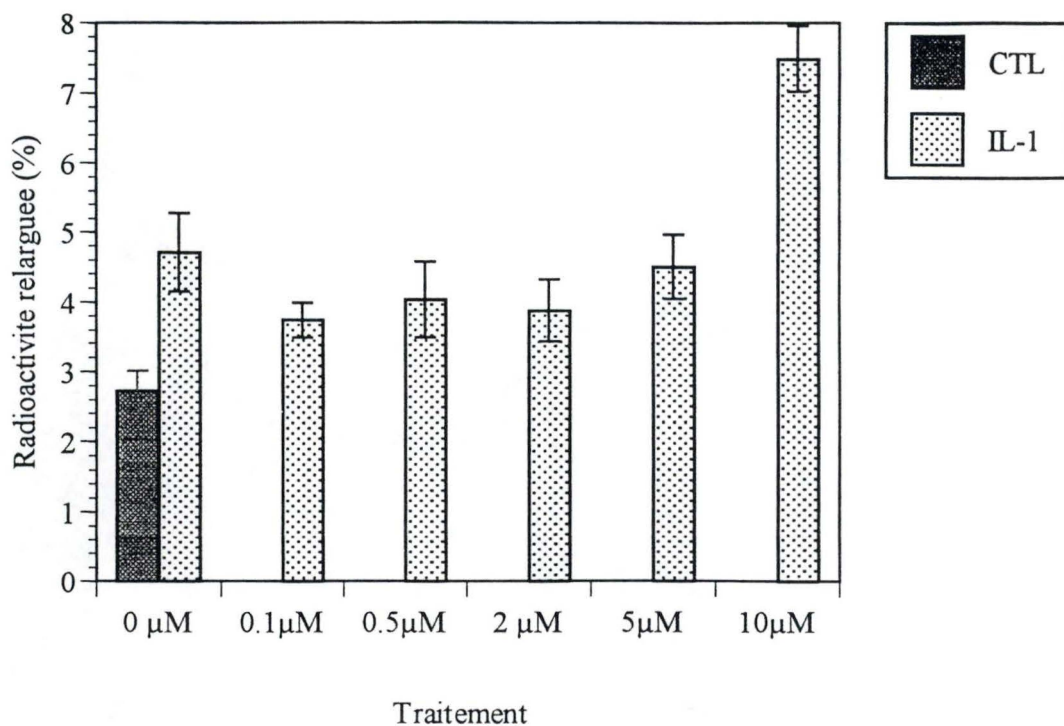


Figure III.20: Effet de différentes concentrations en HELSS (inhibiteur de iPLA2) sur l'activité des PLA2 induite par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 4 heures sur les cellules HCAEC. les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3 pour les différentes concentrations en HELSS et n=6 pour les controles).

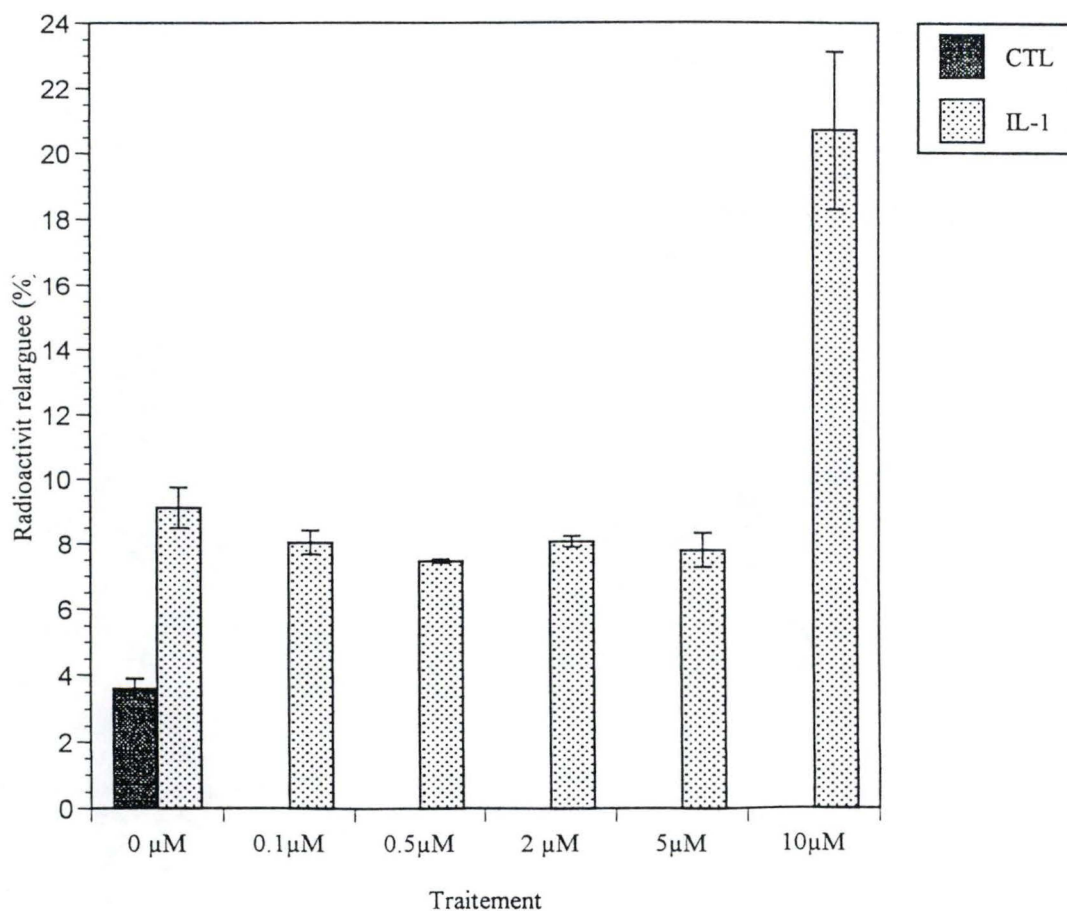


Figure III. 21: Effet de différentes concentrations en HELSS (inhibiteur de iPLA2) sur l'activité PLA2 induite par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 24 heures sur les cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3 pour les différentes concentrations en HELSS et n=6 pour les controles).

a) Effet du AACOCF3

Tout comme pour les HMEC-1, une courbe de cytotoxicité a d'abord été réalisée à 4 h (figure III.14) et à 24 h (figure III.15). La viabilité des cellules en présence de AACOCF3 est maintenue à 100 % sauf pour 2 μ M, concentration où on observe une faible mortalité qui reste inférieure à 10 % pour 4 et 24 h.

L'effet de concentrations croissantes en AACOCF3 a ensuite été établi sur la libération d'AA par des cellules stimulées pendant 4 h et 24 h avec 5 ng/ml d'IL-1. L'IL-1 augmente bien la libération d'acide arachidonique de 2.7 à 4.6 % en 4 h et de 3.8 % à 9 % en 24 h. Le AACOCF3 ne semble guère inhiber l'activité PLA₂ induite par l'IL-1 à 4 h (figure III.16) et à 24h (figure III.17). Les cPLA₂ et iPLA₂ ne semblent donc pas être les enzymes responsables de l'activité PLA₂ induite par l'IL-1 dans les cellules HCAEC.

b) Effet du HELSS

Une courbe de cytotoxicité a également été réalisée sur les HCAEC, après 4 h et 24 h d'incubation aux mêmes concentrations que celles testées précédemment pour les HMEC-1. sur les HCAEC. Nous observons une toxicité qui augmente avec la concentration en HELSS pour atteindre 20 % à 50 μ M après 4 h (figure III.18) et 67.8 % à 10 μ M après 24 h (figure III.19).

Nous avons ensuite étudié l'effet du HELSS sur l'activité PLA₂ induite par l'IL-1 dans les cellules HCAEC après une incubation de 4 h (figure III.20) et 24 h (figure III.21). On observe dans ces deux cas une augmentation du relargage de l'acide arachidonique en présence de HELSS 10 μ M, ce qui reflète la toxicité de cette molécule sur les cellules à cette concentration comme démontré dans la figure III.18 et III.19. Cependant, aux concentrations inférieures, un léger effet inhibiteur est observé, d'environ 20 %, mais qui ne varie pas en fonction de la concentration en HELSS.

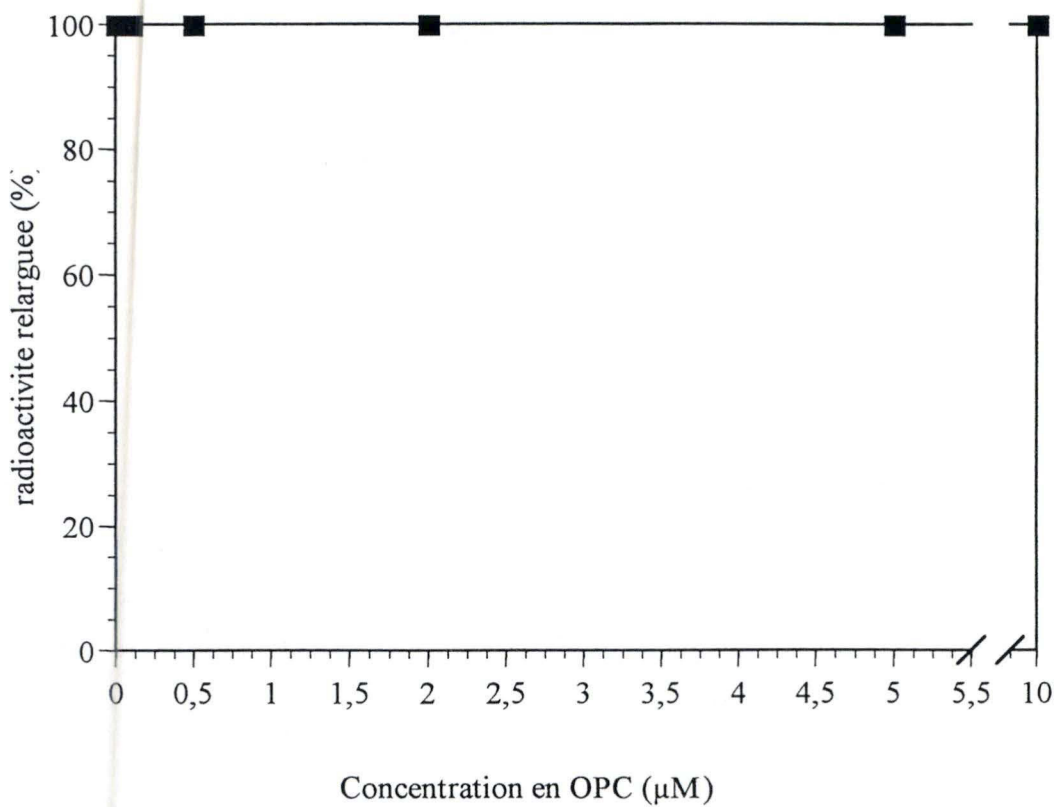


Figure III.22: Courbe de viabilité des cellules HCAEC en présence de différentes concentrations en OPC (0, 0.1, 0.5, 2, 5 et 10 μM) après une incubation de 4 heures, l'OPC étant un inhibiteur de sPLA2. Chaque point représente le comptage d'environ 200 cellules.

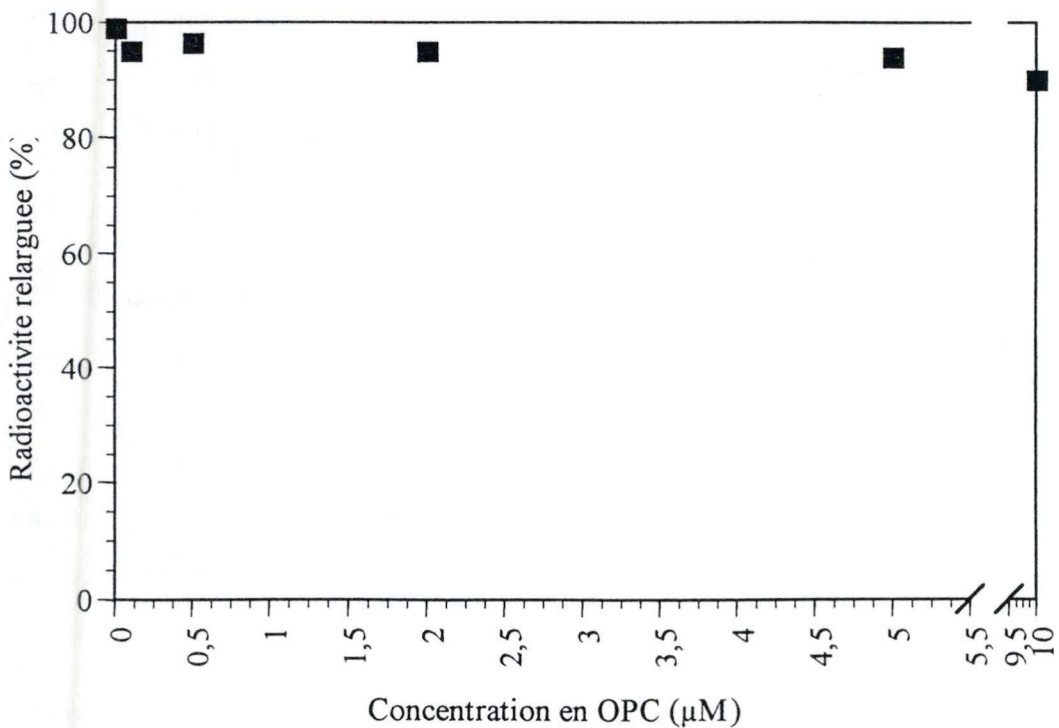


Figure III.23: Courbe de viabilité des cellules HCAEC en présence de différentes concentrations en OPC (0, 0.1, 0.5, 2, 5 et 10 μM) après une incubation de 24 heures, l'OPC étant un inhibiteur de sPLA2. Chaque point représente le comptage de \pm 200 cellules.

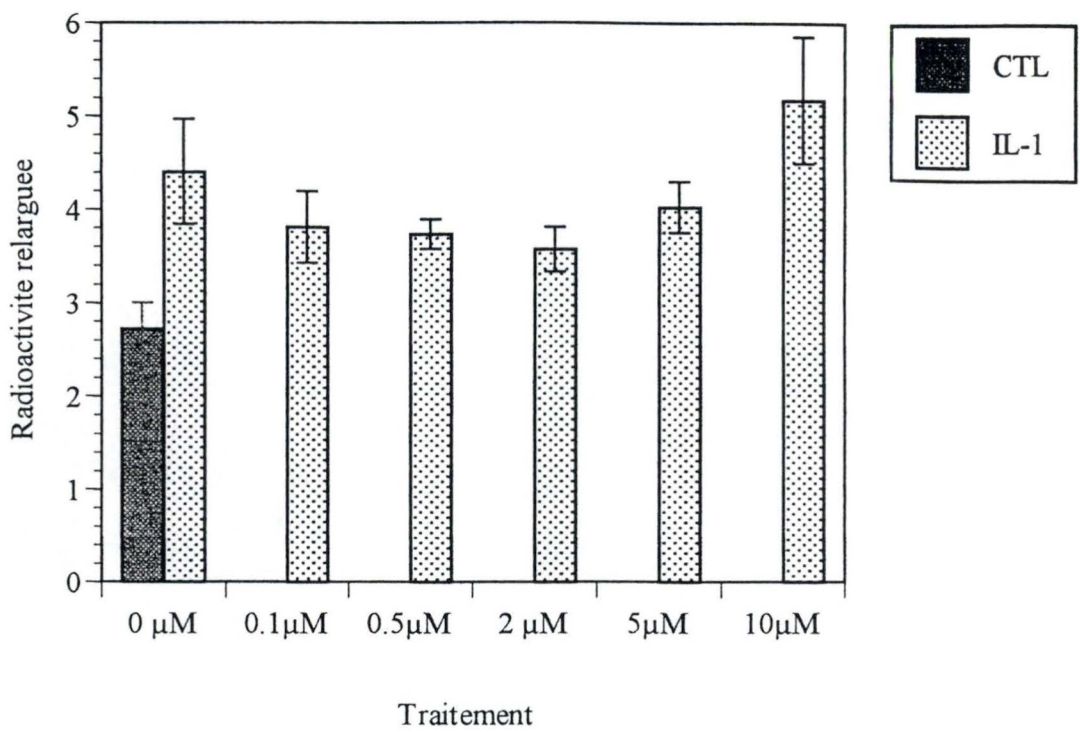


Figure III.24: Effet de différentes concentrations en OPC (inhibiteur de sPLA2) sur l'activité PLA2 induite par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 4 heures sur les cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3 pour les différentes concentrations en OPC et n=6 pour les contrôles).

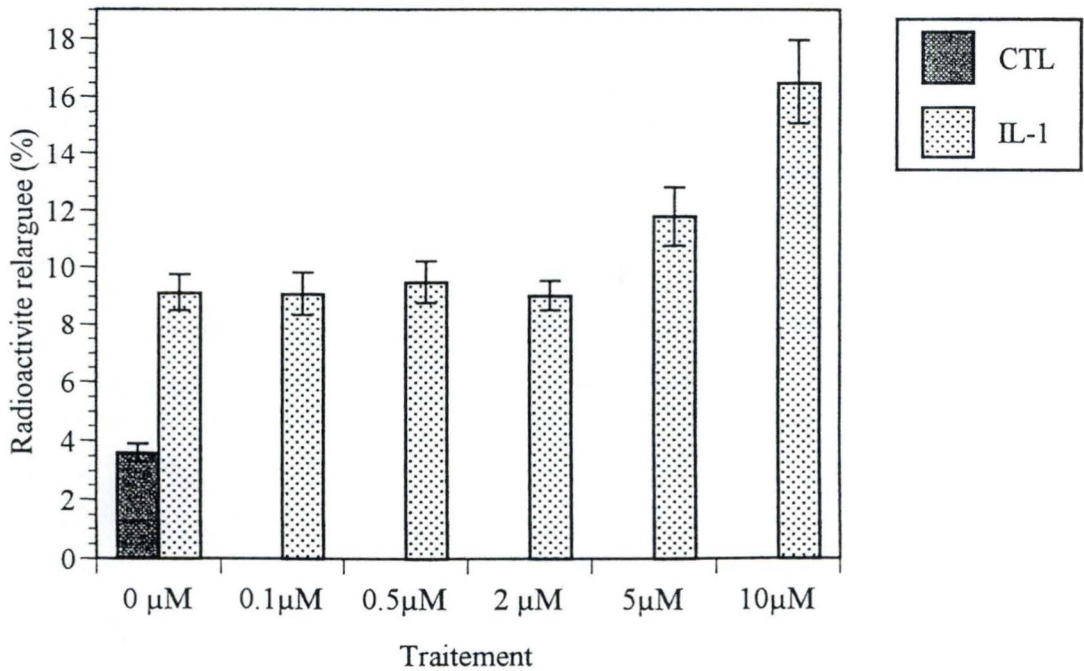


Figure III. 25: Effets de différentes concentrations en OPC (inhibiteur de sPLA2) sur l'activité PLA2 induite par 5 ng/ml d'IL-1 après une incubation de 24 heures sur les cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3 pour les différentes concentrations en OPC et n=6 pour les contrôles).

c) Effet du OPC

Comme pour les deux autres inhibiteurs, une courbe de cytotoxicité pour différentes concentrations en OPC a été réalisée sur les HCAEC. Les figures III.22 et III.23 montrent les résultats pour 4 h et 24 h d'incubation. Aucune toxicité n'est apparue à 4 h, alors qu'après 24 h, l'OPC induit une mortalité de $\pm 10\%$ à $10\ \mu\text{M}$. Nous avons utilisé ces concentrations pour étudier l'effet de l'OPC sur l'activité PLA_2 induite par l'IL-1. Les résultats sont présentés aux figures III.24 pour 4 h et III.25 pour 24 h. Une inhibition de 47% est observée à une concentration de $2\ \mu\text{M}$ en OPC. Au delà de $2\ \mu\text{M}$, l'activité PLA_2 réaugmente, probablement parce qu'à ces concentrations, cette molécule devient légèrement toxique. Aucune inhibition de l'OPC n'est observée après une incubation de 24 h. Par contre, la toxicité de ce produit à 5 et $10\ \mu\text{M}$ est bien marquée: on observe en effet une augmentation de la libération d'acide arachidonique.

1.2.2. Stimulation avec les LDL oxydées

Les LDL oxydées semblent jouer un rôle important dans la pathologie de l'athérosclérose, il est donc intéressant d'étudier leur mode de fonctionnement ainsi que leurs effets qu'elles produisent sur les cellules, en fonction de leur état d'oxydation. Dans ce but, nous avons testé des LDL oxydées par γ -radiolyse de l'eau. C'est une méthode récente, qui permet d'obtenir des préparations de LDL à différents niveaux d'oxydation et ce, de manière reproductible. Les effets biologiques de ce type de LDL oxydées sont encore mal connues et nous avons voulu voir dans quelle mesure ces préparations pouvaient influencer l'activité PLA_2 des HCAEC.

Nous avons donc stimulé les cellules HCAEC pendant 24 heures avec des LDL natives et des LDL oxydées avec un degré d'oxydation croissant. Un contrôle négatif (sans LDL et sans IL-1) et un contrôle positif (sans LDL mais avec de l'IL-1) ont également été réalisés. Les résultats sont présentés à la figure III.26. Nous observons bien une augmentation de l'activité PLA_2 en présence d'IL-1. Les LDL natives augmentent également mais dans une moindre mesure l'activité PLA_2 mais nous n'observons aucun effet des LDL oxydées par rapport aux LDL natives sur l'activité des PLA_2 , quel que soit leur degré d'oxydation. Cette expérience a été réalisée trois fois avec des résultats similaires.

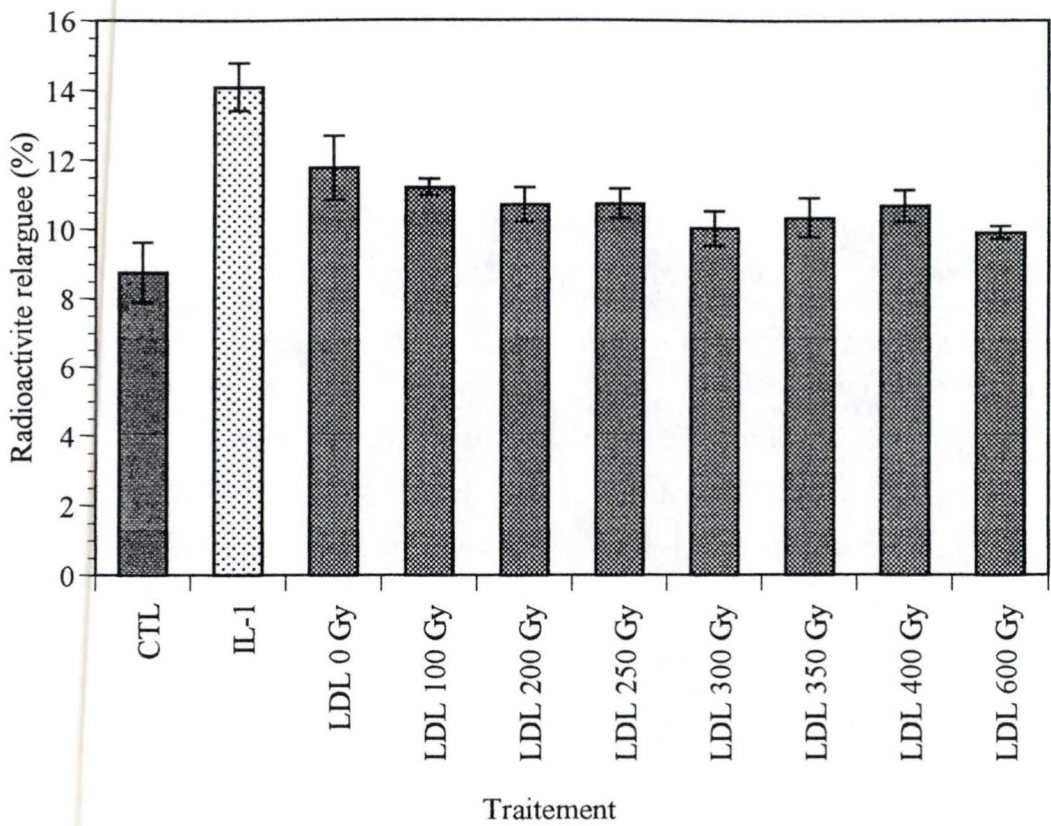


Figure III.26: Effets de différentes préparations de LDL oxydées sur l'activité PLA2 après une incubation de 24 h des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3). Les LDL sont ajoutées à raison de 50 μ g/ml. Elles ont été oxydées par γ -radiolyse de l'eau, pour obtenir des niveaux d'oxydation croissants.

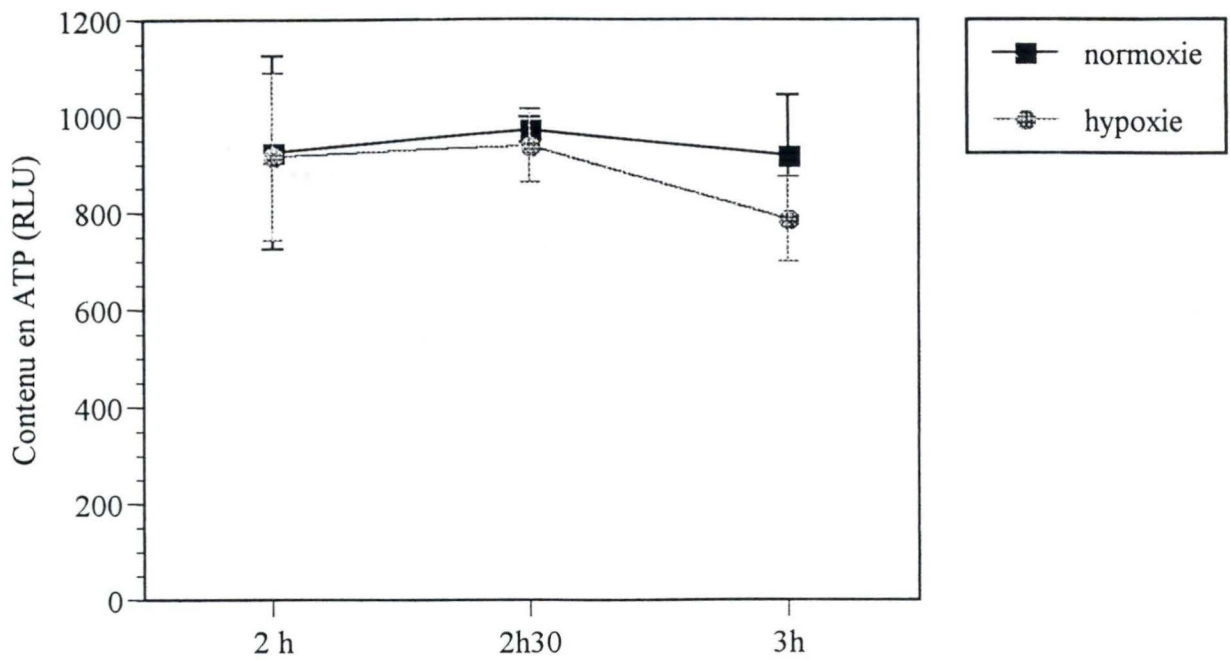


Figure III.27: Effets de différents temps d'hypoxie ou de normoxie sur le contenu en ATP des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

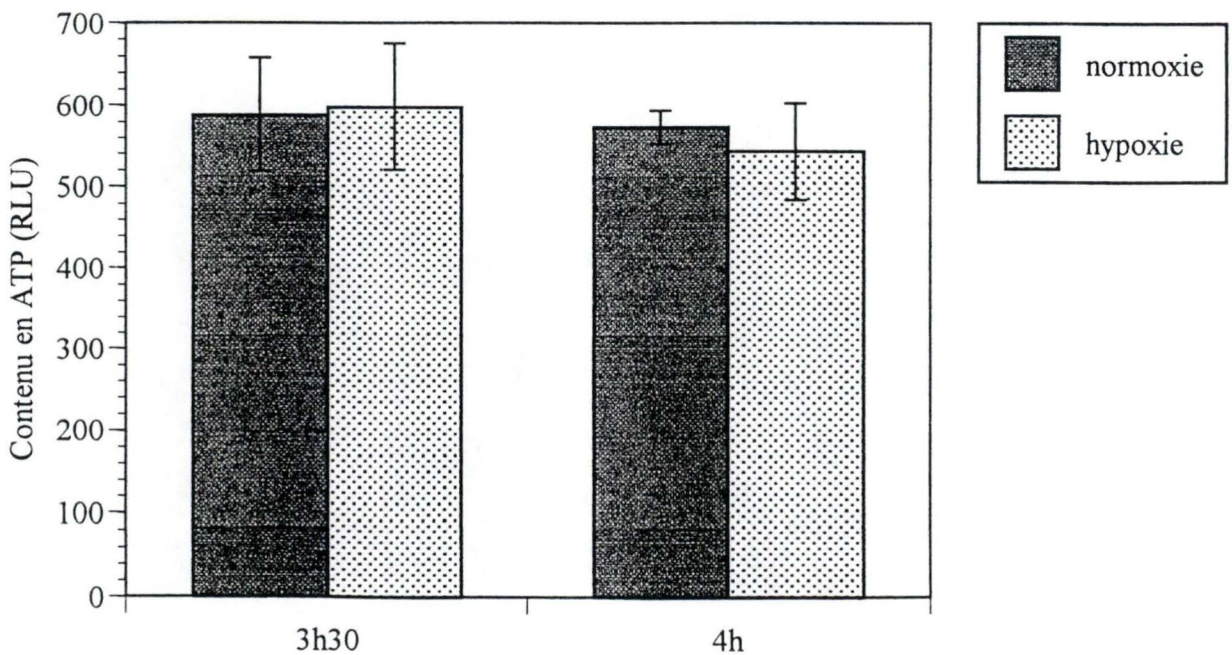


Figure III.28: Effets de différents temps d'hypoxie ou de normoxie sur le contenu en ATP des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

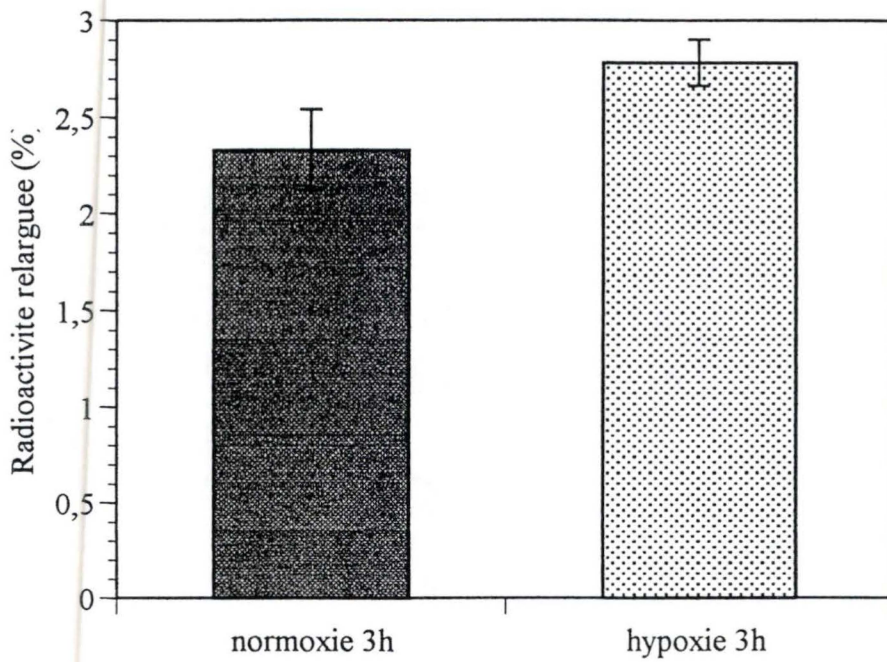


Figure III.29: Effet de 3 heures d'hypoxie ou de normoxie sur l'activité PLA2 des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

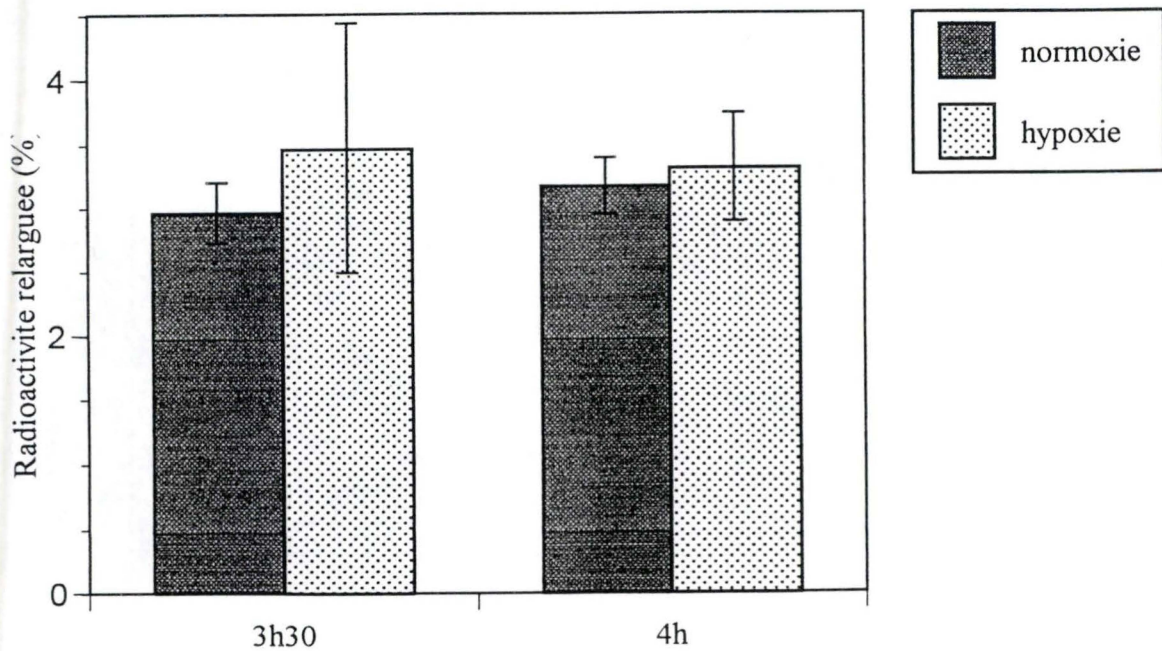


Figure III.30 : Effets de différents temps d'hypoxie ou de normoxie sur l'activité PLA2 des cellules HCAEC. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type (n=3).

1.2.3. Stimulation sous hypoxie

Dans les cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), l'hypoxie est capable de diminuer le contenu en ATP de 40 % après 2 h, de stimuler l'activité PLA₂ et la synthèse de prostaglandines et de PAF. Nous avons voulu vérifier si l'hypoxie était capable d'activer de manière comparable les HCAEC. Pour cela, nous avons testé différents temps d'hypoxie avant de doser l'ATP et l'activité PLA₂ en comparaison. Des contrôles normoxiques ont été réalisés pour chaque temps.

Le contenu en ATP des cellules ayant subi une incubation sous hypoxie de 2h, 2h30, 3h30 (figure III.27) ou de 3h30 et 4h (figure III.28) reste constant au cours du temps. De plus, aucune différence n'est observée par rapport aux cellules normoxiques. Il faut noter que les cellules HCAEC maintiennent une viabilité de 100 % en normoxie et en hypoxie jusqu'à 5 h d'incubation (résultats non montrés).

L'activité PLA₂ a été dosée sur des cellules HCAEC ayant subi une hypoxie ou une normoxie de 3h (figure III.29), 3h30 et 4h (figure III.30). Le release de l'acide arachidonique est très faible en normoxie et n'augmente pas en hypoxie par rapport en normoxie. Nous n'observons donc pas de diminution significative du contenu en ATP ni d'augmentation significative de l'activité des PLA₂ à aucun temps d'hypoxie.

1.2.4. Discussion

Suite aux résultats présentés, nous observons que l'activité des PLA₂ est augmentée suite à une stimulation à l'IL-1, cette augmentation étant d'autant plus grande que le temps de stimulation est long.

Les expériences avec le cycloheximide suggèrent que, ni à 4 h, ni à 24 h, l'augmentation d'activité PLA₂ observée après stimulation à l'IL-1 ne requière de la néosynthèse protéinique. En d'autres termes, il y aurait seulement activation des ou de l'enzyme(s) préexistante(s) lorsque les cellules sont incubées en présence de l'IL-1.

Inhibiteur	% d'inhibition maximale observée	Concentration (μM)
AACOFC3	0 %	2 μM
HELSS	20 %	2 μM
OPC	47%	2 μM

Tableau III.2: Tableau récapitulatif des effets inhibiteurs des 3 molécules à 2 μM sur l'activité PLA2 induite par l'IL-1 après 4 heures de stimulation de HMEC-1. Signalons que pour l'AACOFC3, on a observé une inhibition de 20 % à 0.5 μM (à reconfirmer).

Le tableau III.2 montre un résumé des résultats obtenus avec les inhibiteurs aux temps de stimulation de 4 h et 24 h sur les HCAEC. Seul l'inhibiteur de sPLA₂ (OPC) a un effet inhibiteur plus prononcé sur la libération d'acide arachidonique lorsque les cellules sont stimulées avec l'IL-1 pendant 4 heures; une sPLA₂ serait donc impliquée mais cette activité sPLA₂ proviendrait d'une activation et non d'une nouvelle expression, comme l'a montré le test avec la cycloheximide. Les deux autres inhibiteurs ne montrent que de faibles effets à 4 h.

Au temps de stimulation de 24 heures, les inhibiteurs n'ont montré aucun effet significatif. Au contraire, une libération d'acide arachidonique plus grande est observée lorsque les cellules sont incubées avec de fortes concentrations en AACOCF₃ et surtout en HELSS, ce qui traduit une toxicité des molécules sur les cellules. Cette toxicité a effectivement été mise en évidence par les tests de cytotoxicité.

Si aucun des trois types de PLA₂ n'est responsable de la libération de l'acide arachidonique suite à une stimulation de 24 h avec l'IL-1, on peut se poser la question de la provenance de cette libération plus élevée d'acide arachidonique? Une hypothèse d'explication peut être donnée. La méthode utilisée pour doser l'activité PLA₂ n'est en réalité qu'un test indirect qui mesure un relargage d'acide arachidonique, l'un des produits fréquents de l'activité enzymatique des PLA₂ sur les phospholipides membranaires. L'activité des PLA₂ n'est donc pas mesurée directement et il est possible que la libération d'acide arachidonique observée proviennent d'activités enzymatiques autres que les PLA₂.

Les expériences réalisées avec les LDL oxydées montrent que ceux-ci n'ont visiblement pas d'effet sur l'activité des PLA₂ dans les cellules HCAEC.

Les cellules incubées sous hypoxie ne montrent aucune diminution du contenu en ATP ni d'augmentation de l'activité PLA₂: les cellules HCAEC ne répondent pas à l'hypoxie. Nous pouvons peut-être l'expliquer par le fait que le milieu de culture des HCAEC est un milieu très riche contenant plusieurs facteurs de croissance, les protégeant très efficacement en situation hypoxique.

Globalement, si nous voulons conclure cette première partie du travail, nous pouvons tirer quelques conclusions. Tout d'abord, l'approche biochimiques via l'utilisation des inhibiteurs a ses limites. Ensuite, nous constatons encore une fois une grande hétérogénéité

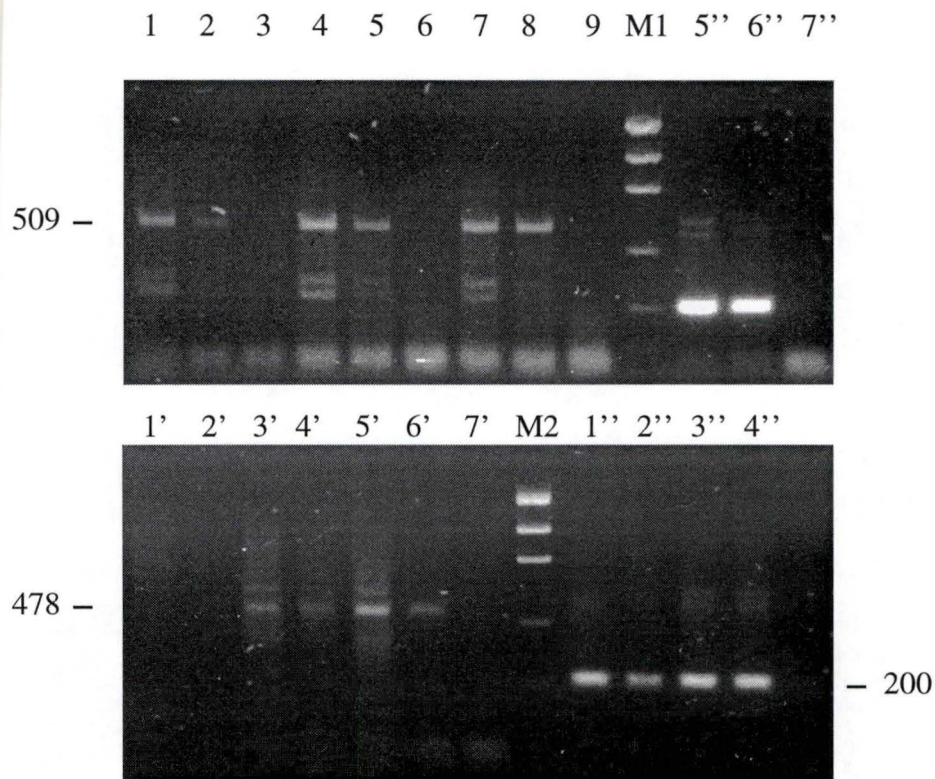
dans le comportement des cellules endothéliales selon leur source (site anatomique, type du vaisseau, espèce, ...).

2. Aspect moléculaire de l'étude des PLA₂

L'activité PLA₂ est augmentée sous IL-1 dans les cellules HCAEC notamment. Après avoir réalisé une étude biochimique, il était nécessaire de compléter cet aspect par une étude moléculaire. En effet, nous n'avons toujours pas de réponse claire, non ambiguë sur le type de PLA₂ impliquée(s). Nous avons voulu déterminer les ARNm de plusieurs PLA₂ suite à une stimulation des cellules avec l'IL-1 et ce, grâce à la technique de RT-PCR. Cette technique consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARNm à détecter (reverse transcription ou RT) suivie par la synthèse d'un brin complémentaire à l'ADNc et enfin de l'amplification des deux brins d'ADN ainsi créés par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR). Cette technique est beaucoup plus sensible que la technique classique de northern-blot et ne demande que de faibles quantités d'ARN total. Nous nous sommes intéressés aux mRNA pour la cPLA₂ et la sPLA₂.

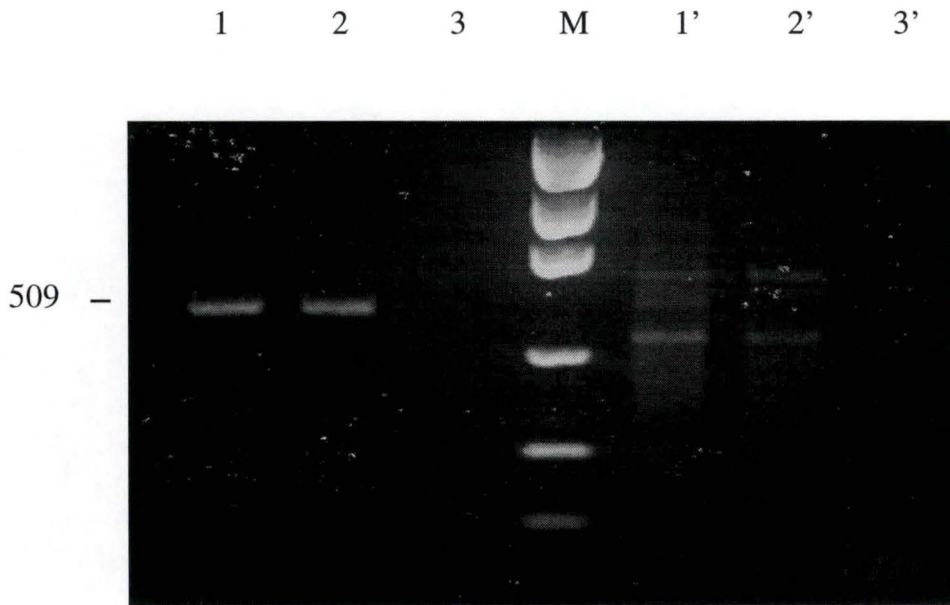
Nous avons étudié les populations d'ARNm pour les deux enzymes de façon semi-quantitative c'est-à-dire que nous avons comparé les produits de l'amplification pour une PLA₂ donnée aux produits de la RT-PCR réalisée pour amplifier des mRNA correspondant à un gène exprimé constitutivement, la tubuline α . L'expression de la tubuline α ne varie pas lorsque les cellules sont soumises à une hypoxie, contrairement à l'expression du gène codant pour GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, enzyme de la glycolyse), couramment utilisé dans la littérature comme référence dans les RT-PCR. Il est en effet prévu à court terme de réaliser une étude similaire sur les cellules endothéliales HUVEC activées par l'hypoxie.

Avant de réaliser l'étude proprement dite de l'expression de ces gènes, nous avons d'abord mis au point les conditions PCR. En effet, l'efficacité de la PCR dépend de nombreux paramètres dont le choix des amorces et la température d'hybridation. Nous devons également fixer le nombre de cycles afin d'être sûr que l'on se trouve dans la phase exponentielle de la PCR. Dans ces conditions seulement, la RT-PCR peut nous donner des renseignements précis sur le changement relatif des quantités d'ARNm d'un échantillon à l'autre.



- | | | |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 1: cPLA2 CTL à 30 cycles | 1': sPLA2 CTL à 30 cycles | 1'': tubuline CTL à 30 cycles |
| 2: cPLA2 IL-1 à 30 cycles | 2': sPLA2 IL-1 à 30 cycles | 2'': tubuline IL-1 à 30 cycles |
| 3: cPLA2 blanc à 30 cycles | 3': sPLA2 CTL à 35 cycles | 3'': tubuline CTL à 35 cycles |
| 4: cPLA2 CTL à 35 cycles | 4': sPLA2 IL-1 à 35 cycles | 4'': tubuline IL-1 à 35 cycles |
| 5: cPLA2 IL-1 à 35 cycles | 5': sPLA2 CTL à 40 cycles | 5'': tubuline CTL à 40 cycles |
| 6: cPLA2 blanc à 35 cycles | 6': sPLA2 IL-1 à 40 cycles | 6'': tubuline IL-1 à 40 cycles |
| 7: cPLA2 CTL à 40 cycles | 7': sPLA2 blanc à 40 cycles | 7'': tubuline blanc à 40 cycles |
| 8: cPLA2 IL-1 à 40 cycles | | |
| 9: cPLA2 blanc à 40 cycles | | |

Figure III.31: Amplification de mRNA codant pour la cPLA2, la sPLA2 et la tubuline par RT-PCR non radioactive. La RT-PCR a été réalisée à 30, 35 et 40 cycles en présence des amorces 3' et 5' s'hybridant aux gènes cPLA2, sPLA2 et tubuline à partir de 0,05 µg d'ARN totaux extraits de cellules incubées pendant 10 h avec ou sans IL-1 (5 ng/ml). Les amplicons ont été analysés sur gel d'agarose à 2 %. Les "blancs" correspondent aux RT-PCR réalisées en absence d'ARN. Marqueur de poids moléculaire: fragment de 2000, 1200, 800, 400, 200 et 100 bp.



1: cPLA2 CTL

1': sPLA2 CTL

2: cPLA2 IL-1

2': sPLA2 IL-1

3: cPLA2 blanc

3': sPLA2 blanc

M: marqueur

Figure III.32: Amplification de mRNA codant pour la cPLA2 et sPLA2 par RT-PCR non radioactive. La RT-PCR a été réalisée à 40 cycles en présence des amorces 5' et 3' s'hybridant au gène cPLA2 et sPLA2, à partir de 0,05 µg d'ARN totaux extrait de cellules stimulées pendant 10 h avec ou sans IL-1 (5 ng/ml). Les amplicons ont été analysés sur gel d'agarose à 2 %. Les "blancs" correspondent aux RT-PCR réalisées en absence d'ARN. Marqueur de poids moléculaire: fragments de 2000,1200, 800, 400, 200 et 100 bp.

2.1. Mises au point des conditions RT-PCR

Nous avons tout d'abord réalisé une première RT-PCR en présence de nucléotides non radioactifs et d'amorces s'hybridant spécifiquement aux gènes codant pour la cPLA₂, la sPLA₂ et la tubuline α afin de mettre au point les conditions PCR et de vérifier que les produits obtenus avaient bien la taille attendue. La taille attendue pour les produits PCR correspondants aux mRNA pour la cPLA₂, sPLA₂ et tubuline α , obtenus après RT-PCR, est respectivement de 509 bp, 478 bp et 200 bp.

Les conditions de PCR sont celles décrites au point 8.2.2. des "Matériels et Méthodes": 0.05 μ g d'ARN totaux provenant des cellules stimulées ou non par l'IL-1 (5 ng/ml) pendant 10 heures furent utilisés. Les échantillons ont été mis dans le thermo-cycleur sous le programme décrit au point 8.2.2. des "Matériels et Méthodes" mais avec une température d'élongation de 56°C pendant 30, 35 et 40 cycles. Les produits de la RT-PCR ont été analysés sur gel d'agarose 2 %. Les résultats sont présentés à la figure III. 31. Pour la tubuline α , on observe une bande principale à 200 bp correspondant bien à celle attendue. A 30 cycles, l'intensité de la bande correspondant aux cellules contrôles est plus intense que celle correspondant aux cellules stimulées avec l'IL-1; ce qui montre bien la nécessité de rapporter tous les résultats obtenus par la suite à la quantité d'amplicons tubuline trouvés dans les différents échantillons. Au delà de 30 cycles, on atteint la saturation puisqu'on n'observe plus aucune différences entre les contrôles et les cellules stimulées à l'IL-1.

En ce qui concerne la cPLA₂, on observe 3 bandes dont la bande attendue de 509 bp. Comme pour la tubuline, on constate une différence d'intensité entre les cellules contrôles et les cellules stimulées par l'IL-1 à 30 cycles. Au delà, les différences s'estompent pour atteindre la saturation à 40 cycles.

Enfin, pour la sPLA₂, à partir de 35 cycles, on observe trois bandes principales dont l'une à la taille attendue, à savoir 478 bp.

Etant donné que, pour les RT-PCR réalisées avec les amorces pour la cPLA₂ et pour la sPLA₂, on observe plusieurs bandes, on a décidé d'augmenter la température d'hybridation à 60°C, afin d'améliorer la spécificité des amorces (figure III.32). Pour la cPLA₂, nous

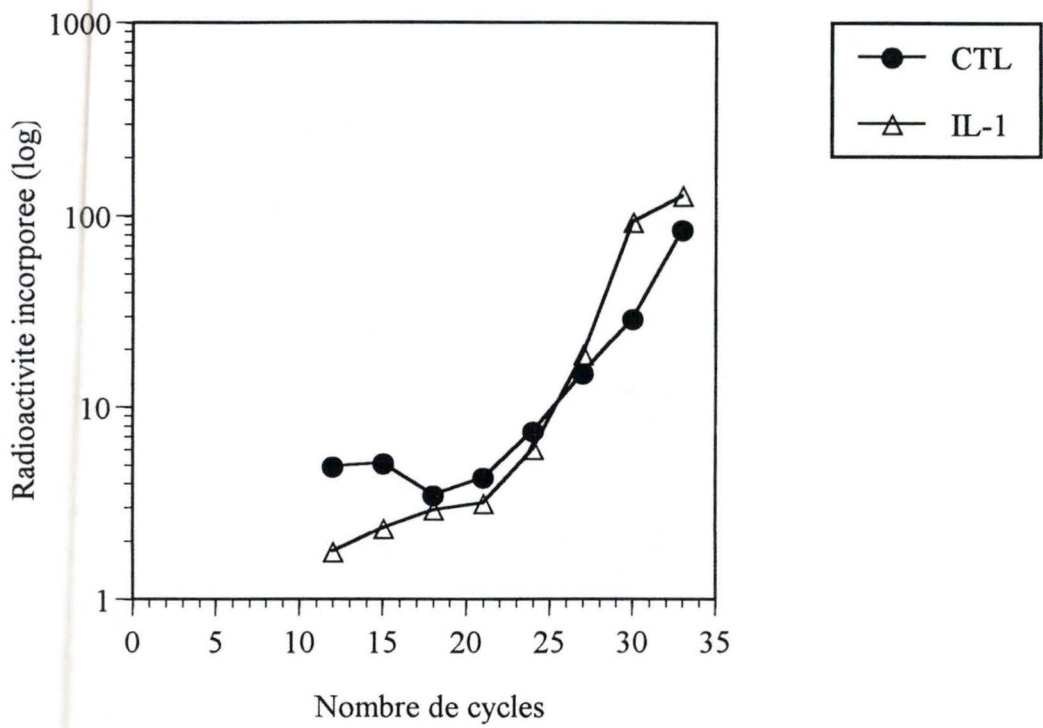


Figure III.33: Analyse semi-quantitative par RT-PCR de l'expression de la tubuline dans les cellules HCAEC stimulée ou non par l'IL-1 (5 ng/ml) pendant 24 heures en fonction du nombre de cycles.

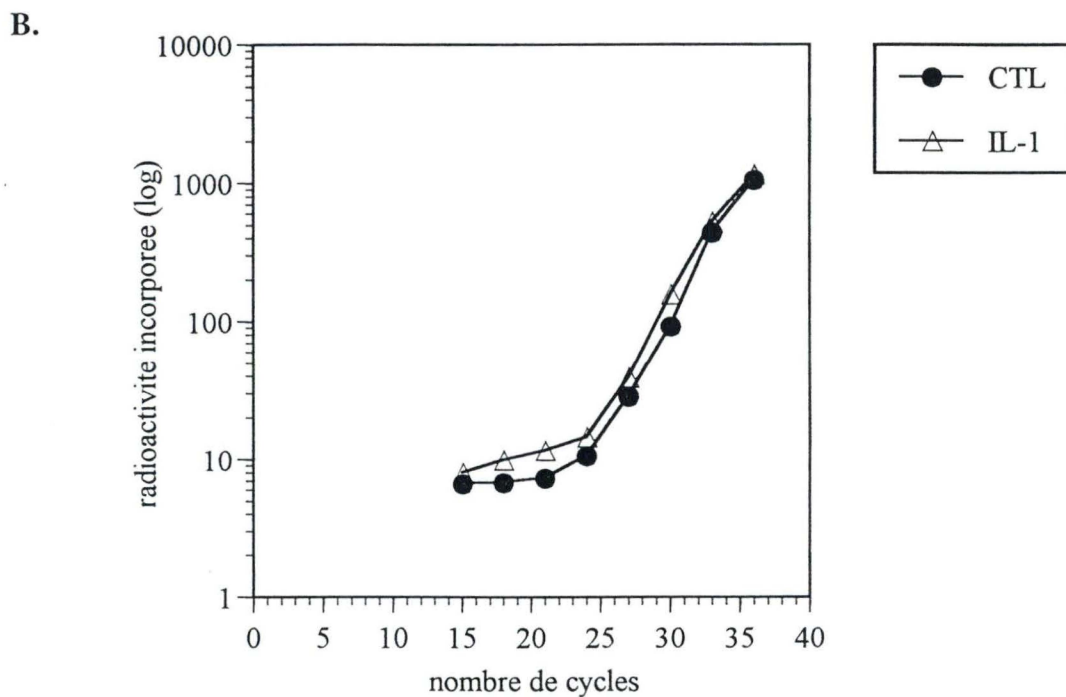
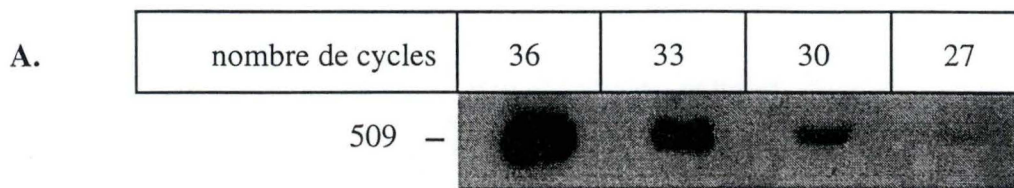


Figure III.34: Analyse par RT-PCR radioactive de l'expression de la cPLA2 en fonction du nombre de cycles. La RT-PCR a été réalisée en présence des amorces 3' et 5' s'hybridant au gène cPLA2, à partir de 0,05 µg d'ARN total extraits de cellules incubées pendant 24 h avec ou sans IL-1 (5 ng/ml). Les amplicons ont été analysés sur gel de polyacrilamide (8 %). Les bandes correspondant aux amplicons cPLA2 (509 bp) ont été quantifiées à l'aide de l'InstantImager.

A. L'autoradiographie du gel de polyacrilamide permet de localiser la bande de 509 bp correspondant aux amplicons cPLA2. Les résultats sont montrés pour les amplicons correspondant aux cellules stimulées avec 5 ng/ml d'IL-1.

B. Les bandes obtenues sur gel de polyacrilamide correspondant aux amplicons cPLA2 ont été quantifiées à l'aide de l'InstantImager.

observons une bande majoritaire de 509 bp, les deux autres bandes ayant disparues. Dans la suite des PCR réalisées sur les mRNA pour la cPLA₂, nous utiliserons donc une température d'hybridation de 60°C. Par contre, pour la sPLA₂, nous obtenons toujours plusieurs bandes de même intensité mais sans qu'il ne s'en dégage une bande principale.

Afin d'améliorer les conditions les conditions d'amplification pour la sPLA₂, nous avons alors fait varier d'autres paramètres tels que la concentration en amorces (50 et 125 pmoles), la concentration en MgSO₄ (de 0.5 mM à 6 mM) et la paire de primers (résultats non montrés), sans obtenir des résultats plus satisfaisants (non montré).

Dans la suite des expériences, nous avons décidé de nous focaliser sur la cPLA₂ et la tubuline, les amorces pour la sPLA₂ ne semblant pas adéquates et faute de temps pour en tester de nouvelles. Nous avons tout d'abord voulu vérifier que les bandes obtenues après RT-PCR correspondaient bien aux mRNA codant pour la cPLA₂ et la tubuline. Nous avons réalisé un séquençage des amplicons extraits à partir des bandes obtenues sur gel d'agarose. Le séquençage est réalisé suivant la méthode décrite au point 11 des "Matériels et Méthodes". Grâce au programme Blast sur Internet, nous avons comparé les séquences ainsi obtenues à toutes les séquences disponibles dans toutes les différentes banques existantes. Cette comparaison nous a permis de confirmer que les séquences des amplicons obtenus correspondent uniquement à celles des deux gènes d'intérêt.

Nous sommes ensuite passés à la RT-PCR radioactive, c'est-à-dire en utilisant des nucléotides marqués au ³²P afin d'augmenter la sensibilité et de permettre de diminuer le nombre de cycles d'amplification. Nous avons tout d'abord, pour les deux gènes cibles, déterminé le nombre de cycles optimal qu'il fallait afin de rester dans la phase exponentielle d'amplification de la PCR.

Pour chaque mRNA, nous avons fait une RT-PCR avec des nombres de cycles différents en utilisant 0.05 µg d'ARN totaux extrait de cellules stimulées ou non avec 5 ng/ml d'IL-1 pendant 24 heures. Les produits de la RT-PCR ont été analysés sur gel de polyacrylamide 8 %. Les résultats sont présentés à la figure III.33 pour la tubuline α et à la figure III.34 pour la cPLA₂. Pour la tubuline α , après une quantification de la radioactivité à l'InstantImager, nous observons une relation linéaire entre le nombre de cycles PCR et la quantité d'amplicons obtenue pour une amplification allant de 12 à 33 cycles pour les cellules

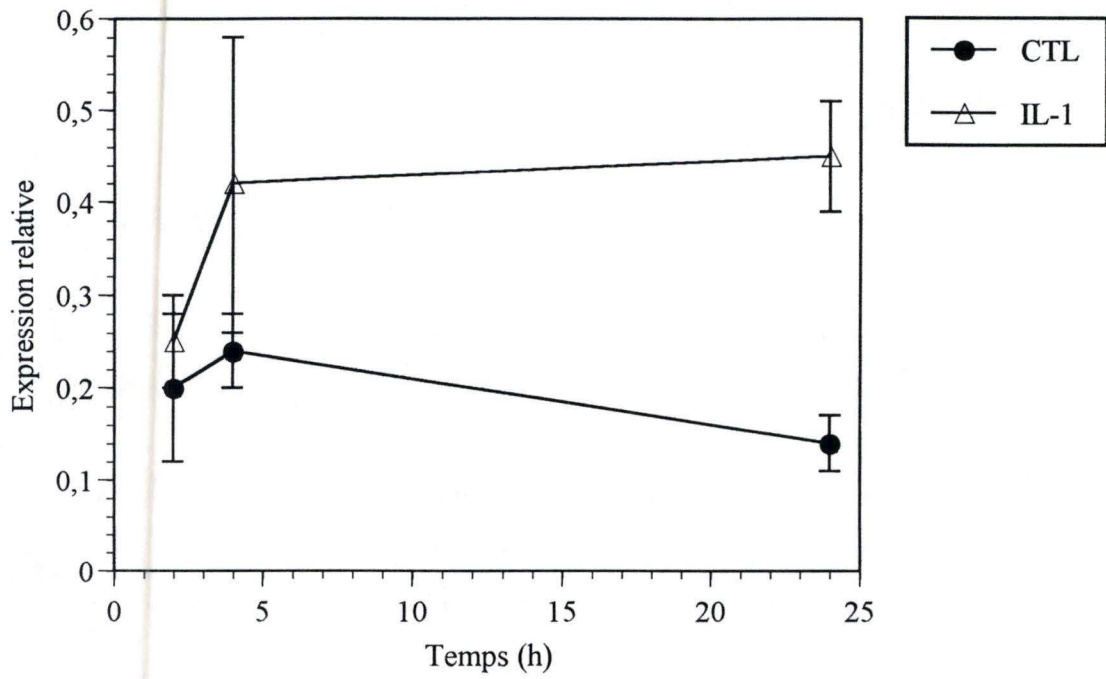


Figure III.35: Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'effet de l'IL-1 (5 ng/ml) sur l'expression de la cPLA2 au cours du temps. Les résultats sont exprimés en rapport de la quantité d'amplicons de cPLA2 divisée par la quantité d'amplicons de tubuline.

stimulées à l'IL-1 et de 15 à 36 cycles pour les cellules contrôles. Au delà de 27 cycles, que ce soit pour les contrôles ou les cellules stimulées à l'IL-1, nous observons que la droite s'infléchit. Pour être sûr de rester dans la phase exponentielle de la PCR d'un échantillon à l'autre, nous avons donc choisi un nombre de cycles de 23.

Pour la cPLA₂, le même raisonnement a été fait. La quantité d'amplicons augmente avec le nombre de cycles, ceux-ci allant de 15 à 36. Nous observons que la droite commence à s'infléchir à partir de 33 cycles; nous avons alors choisi un nombre de cycles de 29 correspondant à la mi hauteur de la partie linéaire de la courbe.

2.2. Analyse semi-quantitative de l'expression de la cPLA₂

Après avoir réalisé ces premières expériences indispensables, nous avons ensuite étudié l'effet de l'IL-1 sur l'expression de la cPLA₂ au cours du temps. Pour ce faire, les cellules ont été stimulées pendant 2, 4 et 24 heures en présence de 5 ng/ml d'IL-1 β . Des cellules contrôles ont été maintenues en absence d'IL-1 aux mêmes temps.

L'expression de la tubuline α a également été estimée et ce, avec les mêmes ARN que pour l'étude de l'expression de la cPLA₂ afin de pouvoir corriger les valeurs obtenues pour la cPLA₂ en fonction de la quantité d'ARN de départ dans les différents échantillons.

Nous observons que la bande correspondante aux cellules stimulées à l'IL-1 est légèrement plus intense que celle correspondant aux cellules contrôles.

Afin de corriger les éventuelles variations dans la quantité d'ARN mis dans les échantillons, la quantité d'amplicons pour la cPLA₂ de chaque échantillon a été rapportée à la quantité d'amplicons de la tubuline α de ces mêmes échantillons. La figure III.35 présente les résultats obtenus pour les différents temps de stimulation en présence d'IL-1.

Nous observons que pour les 3 temps de stimulation, l'expression de la cPLA₂ est augmentée dans les cellules stimulées à l'IL-1. De plus, plus la durée de la stimulation est longue, plus l'expression de la cPLA₂ est élevée alors que l'expression de la tubuline α est plus ou moins constante.

2.3. Discussion

Les résultats que nous venons de décrire montrent que, suite à une stimulation à l'IL-1, l'expression de la cPLA₂ est augmentée et ce, en fonction de la durée de la stimulation. Il y a donc expression d'une nouvelle cPLA₂ lors d'une stimulation avec l'IL-1 et ce, pour les 3 temps . Newton *et al.* (1997) montra également par RT-PCR, dans des cellules épithéliales humaines, que l'IL-1 β induisait une expression nouvelle de cPLA₂ et non de sPLA₂. Lin *et al.*(1992) ont également montré, par Westren-blot, que l'IL-1 induisait une augmentation du taux de la cPLA₂.

2

*Conclusion et
perspectives*

Comme déjà signalé précédemment, les PLA₂ voient leur activité augmenter dans les processus inflammatoires, mais on leur accorde aussi un rôle majeur dans certains processus pathologiques affectant les parois vasculaires et aboutissant par exemple aux veines variqueuses. Dans le cas de l'athérosclérose, affection des artères, le rôle des PLA₂ est encore plus subtil : d'une part les PLA₂ contribueraient à modifier les LDL, favorisant ainsi la production de cellules spumeuses et ces LDL modifiées pourraient à leur tour influencer la régulation des PLA₂ dans les cellules de la paroi vasculaire. C'est pour ces raisons que nous nous sommes focalisés sur des modèles de cellules endothéliales humaines en culture. L'évaluation du rôle exact des PLA₂ et la compréhension de leur régulation dans ces divers processus est toutefois compliquée par l'hétérogénéité des PLA₂.

Nous avons tenté, dans ce travail, d'étudier l'activité PLA₂ dans trois contextes différents: lors d'une stimulation par l'IL-1, lors d'une stimulation par les LDL oxydées dans le cadre de l'athérosclérose et lors d'une incubation sous hypoxie.

Dans les cellules HMEC-1, l'IL-1 induit une augmentation de l'activité PLA₂. Nous avons donc voulu étudier quel type de PLA₂ était impliqué. Pour ce faire, des dosages d'activité PLA₂ ont été réalisés en présence d'inhibiteurs des trois groupes de PLA₂ : l'AACOCF3 inhibant principalement les cPLA₂, mais aussi les iPLA₂ ; le HELSS, inhibant les iPLA₂ et l'OPC inhibant les sPLA₂. On constate que les trois inhibiteurs ont un effet important jusqu'à 80% sur l'activité PLA₂ induite par l'IL-1. Ces résultats suggèrent que les trois types de PLA₂ jouent un rôle dans ces cellules, ce qui semble très surprenant. Un manque de spécificité des inhibiteurs pourrait expliquer en partie ces résultats. Des expériences supplémentaires, utilisant des combinaisons différentes d'inhibiteurs permettraient peut être d'affiner ces résultats, en révélant ou non des effets additifs entre inhibiteurs.

Ensuite, nous sommes passés aux cellules HCAEC, cellules utilisées comme modèle dans l'étude de l'athérosclérose. Sur ces cellules, nous avons réalisé, en parallèle, une étude biochimique de l'activité PLA₂ induite par l'IL-1, similaire à celle réalisée sur les HMEC-1 et une étude moléculaire de l'expression des ARNm de PLA₂ suite à une stimulation par l'IL-1. Pour la partie moléculaire, nous avons dû nous limiter à la cPLA₂, par manque de temps.

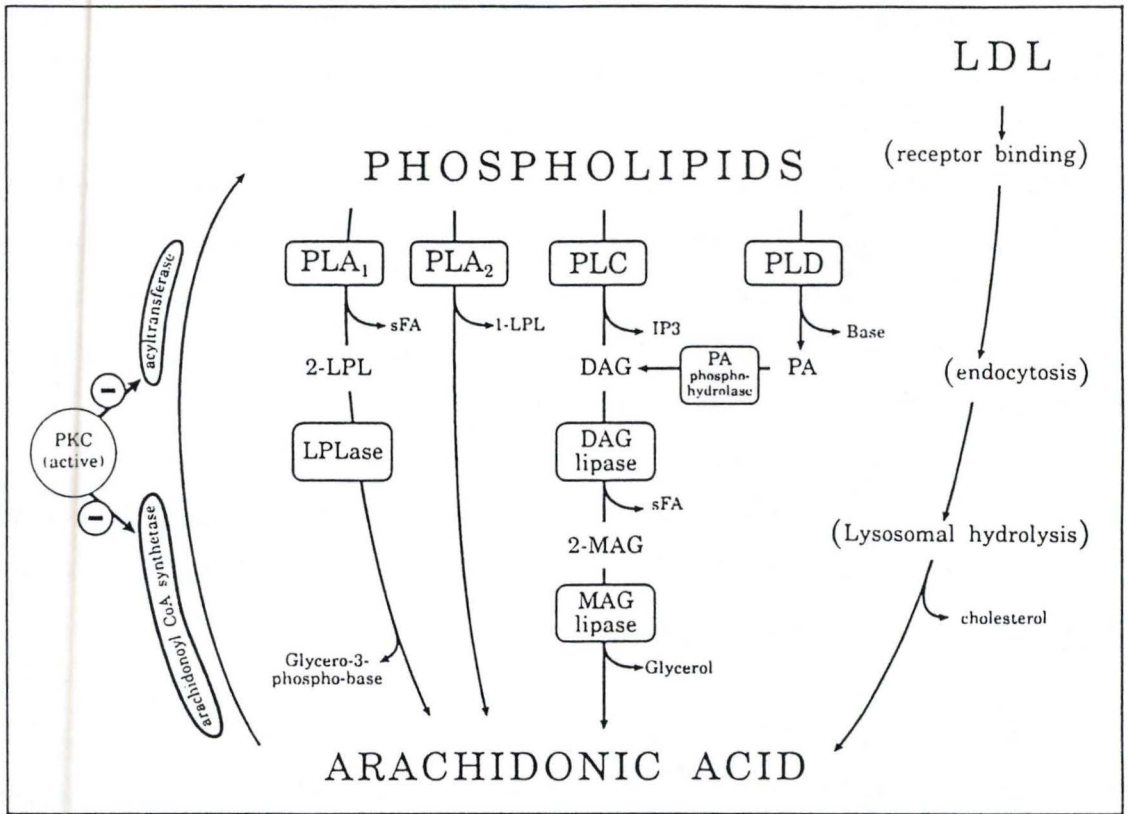


Figure IV. 1 : Voies métaboliques aboutissant au relargage d'acide arachidonique (d'après Burgoyne et Morgan, 1990).

Pour la première partie biochimique, on a stimulé les cellules avec l'IL-1 pendant 4 et 24 heures. Les mêmes inhibiteurs que pour les HMEC-1 ont été utilisés: aucun effet significatif de ceux-ci n'a été observé après une stimulation de 24 heures. Par contre, suite à une stimulation de 4 heures, on observe un effet avec l'inhibiteur de sPLA₂; ceci suggère que ce type de PLA₂ contribue à l'augmentation de l'activité PLA₂ causée par l'IL-1 après 4 heures de stimulation. De plus, en utilisant un inhibiteur de la synthèse protéique aux deux temps de stimulation avec l'IL-1, nous n'avons constaté aucun effet sur l'activité induite par l'IL-1.

L'interprétation des résultats au stade actuel des expériences, n'est pas simple. L'approche biochimique suggère un processus d'activation biochimique concernant principalement les sPLA₂, en tous les cas après 4 heures de stimulation avec l'IL-1, sans qu'il n'y ait néo-synthèse protéinique. On peut cependant reprocher à l'approche biochimique d'utiliser une méthode indirecte de dosage de l'activité PLA₂. On ne peut donc exclure qu'à côté des PLA₂ impliquées, d'autres enzymes participent au relargage d'acide arachidonique (figure IV.1), ces dernières étant soit activées ou induites au niveau de leur expression génique par l'IL-1.

L'approche moléculaire révèle un doublement de mRNA pour la cPLA₂ après 24 heures, bien que les inhibiteurs de cPLA₂ soient peu effectifs. Mais les données sont fragmentaires puisque nous n'avons pas encore les résultats pour la sPLA₂. Des expériences complémentaires sont donc indispensables pour achever ce travail. Il serait également souhaitable de continuer l'étude comparative entre HMEC-1 et HCAEC, au niveau de l'approche moléculaire et ce, d'autant plus que des différences significatives se dégagent entre les deux types cellulaires, ce qui confirme l'hétérogénéité biochimique et fonctionnelle des cellules endothéliales, selon leurs sources.

Enfin, l'effet de l'hypoxie et des LDL diversement oxydées, a également été testé sur l'activité PLA₂, mais aucun effet significatif n'a été obtenu. En ce qui concerne l'hypoxie, l'expérience devrait être recommencée sur des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) pour lesquelles on sait qu'il y a une augmentation de l'activité PLA₂ sous hypoxie. Les résultats négatifs avec les LDL oxydées pourraient s'expliquer par le fait que le milieu de culture des HCAEC est extrêmement riche, orientant les cellules vers la prolifération, ce qui peut les rendre moins susceptibles à certains stimuli.

Malgré les difficultés rencontrées au cours de ce travail, on peut toujours affirmer que l'identification des PLA₂ impliquées dans les situations physiologiques ou pathologiques aboutissent à une augmentation d'activité PLA₂ ainsi que une meilleure compréhension des mécanismes les régulant (activation biochimique par le calcium, phosphorylation, ... ou induction génique), restent néanmoins un objectif important, surtout si l'on veut envisager des thérapies basées sur leur inhibition.

« The final outcome is that the distance between what we know and what we do not know, instead of diminishing with time, increases. This is not a pessimistic view, but it is the only picture that a reader can obtain by analysing some of the most recent papers dealing with inflammation, cytokines, enzymes, protein induction, and signal transduction. » Cirino, G.

Bibliographie

Ackerman, E. J., Kemper, E. S. and Dennis, E. A.

Ca⁺⁺-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells.
J Biol Chem 269 (1994) 9227-9233.

Alexander, R. W.

Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective.
Hypertension 25 (1995) 155-61.

Anderson, K. M., Roshak, A., Winkler, J. D., McCord, M. and Marshall, L. A.

Cytosolic 85-kDa phospholipase A2-mediated release of arachidonic acid is critical for proliferation of vascular smooth cells.
J Biol Chem 272 (1997) 30504-30511.

Arnould, T., Michiels, C., Alexandre, I. and Remacle, J.

Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells.
J Cell Physiol 152 (1992) 215-221.

Baeuerle, P. A.

Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle?
Curr Biol 8 (1998) R19-R24.

Bankers-Fulbright, J. L., Kalli, K. R. and McKean, D. J.

Interleukin-1 signal transduction.
Life sci 59 (1996) 61-83.

Boeynaems, J. M. and Piroton, S.

Regulation of the vascular endothelium: signals and transduction mechanisms
R.G. Landes Company Austin; 1994.

Bonnefont-Rousselot, D., Gardes-Albert, M., Lepage, S., Delattre, J. and Ferradin, C.

Effect of pH on low-density lipoprotein oxidation by O₂ / H₂O free radicals produced by gamma radiolysis.
Radiat res. 132 (1992) 228-236.

Borel, J. P., Monboisse, J. P. and Bellon, G.

Inflammation, collagène et radicaux libres.
Med/Sciences 4 (1988) 304-310.

Borsum, T.

Biochemical properties of vascular endothelial cells.
Virchows Archiv Cell Pathol 60 (1991) 279-286.

Buckley, B. and Whorton, A. R.

Ca⁺⁺-independent arachidonic acid release by vascular endothelium requires protein de novo.
Biochem J 300 (1994) 449-455.

Burgoyne R.D. and Morgan, A.

The control of free arachidonic acid levels
TIBS 15 (1990) 365-366

Cao, Y., Tam, S. W., Arthur, G., Chen, H. and Choy, P. C.

The purification and characterization of a phospholipase A in hamster heart cytosol for the hydrolysis of phosphatidylcholine.

J Biol Chem 262 (1987) 16927-16935.

Chang, J., Gilman, S. C. and Lewis, A. J.

Interleukin-1 activates phospholipase A2 in rabbit chondrocytes: a possible signal for IL-1 action.

J Immunol 136 (1986) 1283-1287.

Cirino, G.

Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase

Biochem Pharmacol 55 (1998) 105-111

Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Minola, N. and Knopf, J. L.

A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca⁺⁺-dependant translocation domain with homology to PKC and GAP.

Cell 65 (1991) 1043-1051.

Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. and Lin, L. L.

Cytosolic phospholipase A2.

J Lipid Mediat Cell Signal 12 (1995) 83-117.

Collins, T.

Cellular and molecular pathogenesis

A. E. Serica, Ed.; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996.

Cominacini, L., Garbin, U., Pasini, A. F., Davoli, A., Campagnola, M., Contessi, G. B., Pastorino, A. M. and Lo Cascio, V.

Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells.

Free Radical Bio Med 22 (1997) 117-27.

Corvol, P., Alhenc-Gelas, F. and Sourbier, F.

L'endothélium, site de production et de métabolisme des peptides vasoactifs.

Med/Sciences 9 (1993) 1050-1060.

Cox, D. A. and Cohen, M. L.

Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: Clinical and pharmacological implications in atherosclerosis.

Pharmacol Rev 48 (1996) 3-19.

Dennis, E. A.

The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes.

TIBS 22 (1997) 1-2.

Dinarelo, C. A. and Savage, N.

Interleukin-1 and its receptor.

Crit Rev Immunol 9 (1989) 1-20.

Dinarelo, C. A.

The interleukin-1 family : 10 years of discovery.

FASEB J 8 (1994) 1314-1325.

Dinarelo, C. A.

Interleukin-1.

Adv pharmacol 25 (1994a) 21-51.

Dunon, D., Piali, L. and Imhof, B. A.

To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm.

Curr Opin Cell Biol 8 (1996) 714-723.

Fourcade, O., Simon, M. F., Leballe, F., Gaigé, B., Gaits, F., Delagebeaudeuf, C.,

Gassama, A., Salles, J. P., Fauvel, J. and Chap, H.

Phospholipases A2 et pathologie inflammatoire: consensus et nouveaux concepts.

Med/Sciences 12 (1996) 323-332.

Fruchart, J. C.

Le transport du cholestérol et sa fixation dans les artères.

Pour la science 175 (1992) 40-47.

Gassama-Diagne, A., Fauvel, J. and Chap, H.

Purification of a new, calcium-independent, high molecular weight phospholipase

A2/lysophospholipase (phospholipase B) from guinea pig intestinal brush-border membrane.

J Biol Chem 264 (1989) 9470-9475.

Gilman, S. C., Chang, J., Zeigler, P. R., Uhl, J. and Mochan, E.

Interleukin-1 activates phospholipase A2 in human synovial cells.

Arthritis Rheum 31 (1988) 126-130.

Glaser, K. B., Mobilio, M., Chang, J. Y. and Senko, N.

Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition.

TIBS rev 14 (1993) 92-98.

Guy, G. R. and Philip, R.

Analysis of cellular phosphoproteins by two-dimensional gel electrophoresis: application for cell signaling in normal and cancer cells.

Electrophoresis 14 (1994) 41440.

Hazen, S. L., Stuppy, R. J. and Gross, R. W.

purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2.

J Biol Chem 265 (1990) 10622-10630.

Hoover-Plow, J., Khaitan, A. and Fless, G. M.

Phospholipase A2 modification enhances lipoprotein(a) binding to the subendothelial matrix

Thromb Haemost 79 (1998) 640-648

Inagami, T., Naruse, M. and Hoover, R.

Endothelium as an endocrine organ.

Annu Rev Physiol 57 (1995) 171-189.

Ip, Y. T. and Davis, R. J.

Signal transduction by the c-jun N-terminal kinase (JNK)- from inflammation to development.

Curr Opin Cell Biol 10 (1998) 205-219.

Jakson, B. A., Goldstein, R. H., Roy, R., Cozzani, M., Taylor, L. and Polgar, P.

Effects of transforming growth factor β and interleukin-1 β on expression of cyclooxygenase 1 and 2 and phospholipase A2 mRNA in lung fibroblasts and endothelial cells in culture.

Bioch Bioph Res Co 197 (1993) 1465-1474.

Joshi-Barve, S. S., Rangnekar, V. V., Sells, S. F. and Rangnekar, V. M.

Interleukin-1- inducible expression of gro- β via NF κ B activation is dependent upon tyrosine kinase signaling.

J. Biol. Chem. 268 (1993) 18018-18029.

Junqueira, L. C. and Carneiro, J.

Histologica Basica

Editora Guanabara Koogan S.A. ed.; Rio de Janeiro, Brazil, 1971.

Kobayashi, K., Watanabe, J., Umeda, F., Tanigushi, S., Masakado, M., Yamauchi, T. and Nawata, H.

Enhancement of prostacyclin in cultured bovine aortic endothelial cells by oxidized glycated low-density lipoprotein.

Prostag Leukotr Ess 52 (1995) 263-270.

Kramer, R. M., Johansen, B., Hession, C. and Blake Pepinsky, R.

Phospholipase A2

P. Y.-K. Wong and E. A. Dennis, Ed.; Plenum Press: New York, 1990.

Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. and Inoue, K.

Mammalian non-pancreatic phospholipases A2.

J Lipid Media Cellt 1170 (1996) 217-231.

Liao, L., Aw, T. Y., Kvietys, P. R. and Granger, D. N.

Oxidized LDL-induced microvascular dysfunction. Dependence on oxidation procedure.

Arterioscl Throm Vasl 15 (1995) 2305-11.

Lin, L. L., Lin, A. and De Witt, D. L.

Interleukin-1 α induce the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblasts.

J Biol Chem 267 (1992) 23451-23454.

Lusher, T. F. and Noll, G.

Endothelium dysfunction in the coronary circulation.

J Cardiovasc Pharm 24 (Suppl. 3) (1994) S16-S26.

Mantovani, A., Bussolino, F. and Dejana, E.
Cytokine regulation of endothelial cell function.
FASEB J 6 (1992) 2591-2599.

Martin, M. U. and Falk, W.
The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction.
Eur Cytokine Netw 8 (1997) 5-17.

Michiels, C., Arnould, T., Knott, I., Dieu, M. and Remacle, J.
Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia.
Am J Physiol 264 (1993) C866-C874.

Michiels, C., Arnould, T. and Remacle, J.
Rôle clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses.
Med/Sciences 10 (1994) 845-853.

Michiels, C., Arnould, T., Janssens, D., Bajou, K. and Remacle, J.
Le développement des veines variqueuses: rôle-clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales.
Phlébologie 188 (1995) 203-206.

Montefort, S. and Holgate, S. T.
Adhesion molecules and their role in inflammation.
Resp Med 85 (1991) 91-99.

Mugnai, S., Ciuffi, M., Maurizi, M., Bindi, D., Franchi-Micheli, S. and Zilletti, L.
Influence of interleukin-1 α on superoxide anion, platelet activating factor release and phospholipase A2 activity of naive and sensitive guinea-pig alveolar macrophages.
Brit J Pharm 122 (1997) 1345-1352.

Murakami, M., Kudo, I. and Inoue, K.
Molecular nature of phospholipase A2 in prostaglandin I2 synthesis in human umbilical vein endothelial cells.
J Biol Chem 268 (1993) 839-844.

Murakami, M., Kuwata, H., Amakasu, Y., Shimbara, S., Nakatani, Y., Atsumi, G. I. and Kudo, I.
Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2-dependant delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells.
J Biol Chem 272 (1997) 19891-19897.

Murugesan, G. and Fox, P. L.
Role of lysophosphatidylcholine in the inhibition of endothelial cell motility by oxidized low density lipoprotein.
J Clin Invest 97 (1996) 2736-44.

Myers, D. E., Huang, W. N. and Larkins, R. G.
Lipoprotein-induced prostacyclin production in endothelial cells and effects of lipoprotein modification.
Am J Physiol 271 (1996) C1504-C1511.

Nakazato, Y., Simonson, M. S., Herman, W. H., Konieckowski, M. and Sedor, J. R.
Interleukin-1 α stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A2.
J Biol Chem 266 (1991) 14119-14127.

Newton, R., Kuitert, L. M., Slater, D. M., Adcock, I. M. and Barnes, P. J.
Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells.
Life Sci 60 (1997) 67-78.

Nicola, N. A.
Guidebook to cytokines and their receptors
Sambrook & Toose Publications; 1994; Vol.

O'Brien, K. D. and Chait, A.
The biology of the artery wall in atherogenesis.
Med Clin N Am 78 (1994) 41-67.

O'Neill, L. A. J.
Interleukin-1 signal transduction.
Int J Lab Res 25 (1995) 168-177.

Pearson, J.D.
Endothelial cell biology
Radiology 179 (1991) 9-14

Penn, M. S. and Chilsom, G. M.
Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis.
Atherosclerosis 108 (1994) S21-S29.

Platanias, L. C. and Vogelzang, N. J.
Interleukin-1: biology, pathophysiology, and clinical prospects.
Am J Med 89 (1990) 621-629.

Pruzanski, W. and Vadas, P.
Phospholipase A2- a mediator between proximal and distal effectors of inflammation.
Immunol Today 12 (1991) 143-146.

Raines, E. W. and Ross, R.
Mechanism of plaque formation.
Atherosclerosis Rev 23 (1991) 143-151.

Renard, P.
Régulation par l'interleukine-1 du facteur transcriptionnel NF-kB dans l'activation de fibroblastes humains en culture. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène et des phosphorylation
Dissertation présentée pour l'obtention du grade de docteur en Sciences
Promoteur: M. Raes (1997) FUNDP

Robinson, M. J. and Cobb, M. H.

Mitogen-activated protein kinase pathways.
Curr Opin Cell Biol 9 (1997) 180-186.

Ross, R. and Glomset, J. A.

The pathogenesis of atherosclerosis.
New Engl J Med 295 (1976) 369-376, 420-425.

Rossi, B.

IL-1 transduction signals.
Eur Cytokine Netw 4 (1993) 181-187.

Schäfer Elinder, L., Dumitrescu, A., Larsson, P., Hedin, U., Frostegard, J. and Claesson, H.-E.

Expression of phospholipase A2 isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall.
Arterioscler Throm Vas 17 (1997) 2257-2263.

Schmedtje, J. F., Ji, Y.-A., Liu, W. L., DuBois, R. N. and Runge, M. S.

Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells.
J Biol Chem 272 (1997) 601-608.

Schmitt, A., Negre-Salvayre, A., Troly, M., Valdiguié, P. and Salvayre, R.

Phospholipid hydrolysis of mildly oxidized LDL reduces their cytotoxicity to cultured endothelial cells. Potential protective role against atherogenesis.
Biochim Biophys Acta 1256 (1995) 284-92.

Sparrow, C. P., Parthasarathy, S. and Steinberg, D.

Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimmic cell-mediated oxidative modification.
J Lipid Res 29 (1988) 745-753.

Thorgeirsson, G.

Biochemical interactions at the endothelium
A. Cryer, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1983.

Thorin, E., Hamilton, C. A., Dominiczak, M. H. and Reid, J. L.

Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release.
Arterioscler Throm Vas 14 (1994) 453-459.

Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E., Ellies, L. G., Aubin, J. E., Sos, A. and Melcher, A.

Extracellular phospholipase A2 secretion is a common effector pathway of interleukin-1 and tumor necrosis factor action.
Immunol Lett 28 (1991) 187-194.

Valdiguié, P.

Biochimie clinique
Editions Médicales Internationales; Lavoisier: Paris, 1993.

Vance, D. E. and Vance, J.

Biochemistry of lipids, lipoprotein and membranes

Bernardi, G. ed.; Elsevier: 1996; Vol. 31.

Wright, G. W., Ooi, C. E., Weiss, J. and Elsbach, P.

Purification of a cellular (granulocyte) and an extracellular (serum) phospholipase A2 that participates in the destruction of *Escherichia Coli* in a rabbit inflammatory exudate.

J Biol Chem 265 (1990) 6675-6681.

Yokote, K., Morisaki, N., Zenibayashi, M., Ueda, S., Kanzaki, T., Saito, Y. and Yoshida, S.

The phospholipase-A2 reaction leads to increased monocyte adhesion of endothelial cells via the expression of adhesion molecules.

Eur J Biochem 217 (1993) 723-729.

Young, S. G. and Parthasaraty, S.

Why are low-density lipoproteins atherogenic?

Western J Med 160 (1994) 153-164.