

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Polarisation des macrophages de la lignée RAW 264.7. Effet sur l'internalisation des LDLs modifiées

PIREAUX, Valérie

Award date:
2012

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**POLARISATION DES MACROPHAGES DE LA LIGNEE RAW 264.7. EFFET SUR
L'INTERNALISATION DES LDLS MODIFIEES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
PIREAUX Valérie
Janvier 2012**



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**POLARISATION DES MACROPHAGES DE LA LIGNEE RAW 264.7. EFFET SUR
L'INTERNALISATION DES LDLS MODIFIEES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

PIREAUX Valérie

Janvier 2012

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Polarisation des macrophages de la lignée RAW 264.7. Effet sur
l'internalisation des LDLs modifiées**

PIREAUX Valérie

Résumé

Les macrophages sont des cellules inflammatoires jouant un rôle essentiel dans la formation, dans l'évolution ainsi que dans la résorption éventuelle d'une lésion athéroscléreuse [(Glass and Witztum, 2001), (Pluddemann et al., 2007)]. Depuis quelques années maintenant, le concept de polarisation des macrophages est de plus en plus étudié, tant *in vitro* (Hirose et al., 2011) qu'*in vivo* (Khallou-Laschet et al., 2010). La détermination de leur phénotype et donc de leurs fonctions permet notamment d'évaluer le contexte inflammatoire dans le cas des lésions athéroscléreuses. Les macrophages M1 sont dits pro-inflammatoires et les macrophages M2, anti-inflammatoires. En fonction du microenvironnement cellulaire, le phénotype peut passer de M2 à M1 ou inversement (Khallou-Laschet et al., 2010). Ce passage d'un phénotype à l'autre est possible via une régulation des gènes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires par des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques [(Lawrence and Natoli, 2011), (Takeuchi and Akira, 2011)].

Le modèle cellulaire utilisé, au cours de ce mémoire, est la lignée de macrophages RAW 264.7, souvent choisie *in vitro* dans le cadre de l'athérosclérose. Nous avons commencé par mettre au point, évaluer et caractériser la polarisation des macrophages RAW 264.7. En effet, deux protocoles de polarisation ont été développés au sein du laboratoire et ont été validés via l'étude de l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 aux niveaux ARNm et protéique. Ensuite, nous avons vérifié si les cellules polarisées étaient capables de former des cellules spumeuses lorsqu'elles étaient mises en présence de LDLs natives et modifiées. Nous avons mis en évidence que les LDLs oxydées à la myéloperoxydase (Mox-LDLs) semblent renforcer le phénotype M2 tout en induisant certains marqueurs M1. Cependant, les effets des LDLs sur la polarisation devront être étudiés de manière plus approfondie. Ces données devront, par la suite, être validées sur des macrophages obtenus à partir de monocytes sanguins, puis sur un modèle murin adéquat dans le contexte de l'athérosclérose.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2012

Promoteur: M. Raes

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Phone: + 32(0)81.72.44.18 - Fax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Macrophage polarization in the model of murine RAW 264.7 cells. Effects on the internalization of modified LDLs

PIREAUX Valérie

Abstract

Macrophages are inflammatory cells, which are involved in atherosclerotic lesion formation, evolution and resorption [(Glass and Witztum, 2001), (Pluddemann et al., 2007)].

Since a few years now, the concept of macrophage polarization has been more and more studied *in vitro* (Hirose et al., 2011) and *in vivo* (Khallou-Laschet et al., 2010). Indeed, characterization of macrophage phenotype and functions can also help to characterize the inflammatory state of the lesions. M1 macrophages are pro-inflammatory, while M2 macrophages are anti-inflammatory. The macrophage phenotype can switch from M2 to M1 or *vice-versa*, because of changes of the microenvironment within the lesion (Khallou-Laschet et al., 2010). This switch can happen through the regulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory genes via transcriptional and epigenetic mechanisms [(Lawrence and Natoli, 2011), (Takeuchi and Akira, 2011)].

In this study, we choose to work with the RAW 264.7 murine cell line, often used in culture in the context of atherosclerosis. We have started the study by setting up, evaluating and characterizing the polarization of RAW 264.7 macrophages. Indeed, two protocols of M1 and M2 polarization have been developed in the URBC and have been validated by monitoring the expression of M1 and M2 marker genes at the mRNA and protein levels. Then, we checked whether M1 and M2 polarized cells were able to form foam cells, by incubating them with native and modified LDLs. We have shown that LDLs oxidized with myeloperoxidase (Mox-LDLs) seem to reinforce the M2 phenotype, while also favouring the expression of some proinflammatory M1 genes. However, the effects of modified LDLs should be studied in more details. All these data should be then validated on blood monocyte derived macrophages, and in an appropriate murine model of atherosclerosis.

Master thesis of biochemistry and molecular and cellular biology

January 2012

Promoter: M. Raes

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser ici mes plus sincères remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire et à ma formation.

Cette année passée au laboratoire URBC s'est révélée être une expérience enrichissante tant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice, le Dr. Martine Raes, pour son aide et ses conseils avisés lors de la rédaction de ce mémoire et pour son enthousiasme tout au long de ce projet.

Je tiens ensuite à exprimer ma gratitude au Dr. Thierry Arnould pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

Je tiens aussi à remercier chaque membre du laboratoire URBC pour leur accueil, leur aide et leur bonne humeur.

Mes remerciements sont adressés tout particulièrement à Aude, Martine VS et Marie. Mais aussi Magali et Lulu. Ce fut un plaisir de travailler en votre compagnie. Je me réjouis de reprendre le chemin du laboratoire en septembre !

Je remercie également le Dr. Carine Michiels, pour avoir très gentiment traité mes données au BD Pathway et surtout pour avoir organisé notre master d'une main de maître.

Un grand merci à Florence pour avoir passé du temps en qRT-PCR avec moi.

Merci à Catherine, Antoine et Anne. Merci Marc pour ton aide précieuse à chaque problème informatique.

Je n'oublie pas mes collègues de bureau : Elodie, Eliane et JM. Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Je tiens enfin à remercier mes parents, ma sœur, mon beau-frère et mes frères pour leur soutien et leur patience, tout au long de cette année. Merci à mes amis, dont la présence et les petites attentions, m'ont fait chaud au cœur.

J'ai également une pensée pour mes proches, qui m'ont vu commencer cette aventure, mais qui ne m'ont malheureusement pas vu la terminer.

« Un seul mot, usé, mais qui brille comme une pièce de monnaie : Merci ! »

Pablo Neruda

Tables des matières

Abréviations	7
Avant-propos	10
1. Introduction	11
1.1. Macrophages : fonctions et polarisation.....	11
1.1.1. Origine et fonctions des macrophages.....	11
1.1.2. La polarisation M1 et M2 des macrophages	12
1.1.2.1. Phénotypes M1 et M2	12
1.1.2.1.1. Les macrophages M1.....	12
1.1.2.1.2. Les macrophages M2.....	13
1.1.2.2. Sources des macrophages pour étudier la polarisation <i>in vitro</i>	13
1.1.2.3. Marqueurs géniques M1 et M2	14
1.1.2.3.1. Les marqueurs M1.....	14
1.1.2.3.2. Les marqueurs M2.....	16
1.1.2.4. Mécanismes moléculaires de la polarisation des macrophages.....	17
1.1.2.5. La polarisation des macrophages <i>in vivo</i>	18
1.2. Macrophages et athérosclérose.....	20
1.2.1. L'athérosclérose : contexte général, définition et facteurs de risque	20
1.2.1.1. Athérosclérose et lipoprotéines	21
1.2.1.2. Le processus athérosclérotique : importance d'un contexte inflammatoire et de l'oxydation des LDLs.....	22
1.2.1.3. Mécanismes d'oxydation des LDLs.....	23
1.2.2. Le système des phagocytes mononucléés dans le contexte de l'athérosclérose.....	24
1.2.2.1. Recrutement des monocytes dans la lésion athérosclérotique	24
1.2.2.2. Formation des cellules spumeuses	25
1.2.2.2.1. Rôle des récepteurs aux LDLs.....	25
1.2.2.2.1.1. Le récepteur aux LDLs natives (LDL-R).....	25
1.2.2.2.1.2. Récepteurs « scavenger »	26
1.2.2.2.1.3. Les transporteurs ATPases	27
1.2.2.2.1.4. Autres récepteurs aux lipoprotéines : TLR4 et FcγRIII.....	28
1.2.2.2.2. Importance des macrophages dans la formation des lésions athérosclérotiques.....	28
1.2.2.3. Polarisation des macrophages dans la lésion.....	29
1.2.2.3.1. Comportement des macrophages M1 et M2 <i>in vivo</i>	29
1.2.2.4. LDLs et polarisation des macrophages	30
1.3. Objectifs du mémoire	31
2. Matériels et méthodes.....	33
2.1. Culture cellulaire	33
2.1.1. Type cellulaire utilisé	33
2.1.2. Repiquage des cellules de la lignée RAW 264.7.....	33
2.1.2.1. Réactifs et matériels (tableau 2.1)	33
2.1.2.2. Méthode.....	33
2.2. Détermination de la cytotoxicité due au LPS.....	33
2.2.1. Test LDH (« Cytotoxicity Detection Kit » de ROCHE)	33
2.2.1.1. Principe.....	33
2.2.1.2. Réactifs et matériels (tableau 2.2.)	33
2.2.1.3. Méthode.....	33
2.2.2. Test MTT.....	34
2.2.2.1. Principe.....	34

2.2.2.2. Réactifs et matériels (tableau 2.3.)	34
2.2.2.3. Méthode	34
2.3. Polarisation M1/M2 des macrophages RAW 264.7	35
2.3.1. Réactifs et matériels (tableau 2.4.)	35
2.3.2. Méthode	35
2.4. Analyse par RT-PCR quantitative	35
2.4.1. Extraction d'ARN total	35
2.4.1.1. Réactifs et matériels (tableau 2.5.)	35
2.4.1.1. Méthode	35
2.4.2. Rétro-transcription de l'ARNm en ADNc	35
2.4.2.1. Réactifs et matériels (tableau 2.5.)	35
2.4.2.1. Méthode	35
2.4.3. RT-PCR quantitative	36
2.4.3.1. Principe	36
2.4.3.2. Réactifs et matériels (tableau 2.5.)	36
2.4.3.3. Méthode	36
2.5. Analyse par cytométrie de flux (FACS – « fluorescence activated cell sorting »)	37
2.5.1. Principe	37
2.5.2. Réactifs et matériels (tableau 2.7.)	37
2.5.3. Méthode	37
2.6. Détection d'IL-6 sécrétée par les macrophages M1 par test ELISA	38
2.6.1. Principe	38
2.6.2 Réactifs et matériels (tableau 2.8.)	38
2.6.3. Méthode	38
2.7. Isolation, oxydation et caractérisation des lipoprotéines de faible densité (LDLs)	39
2.7.1. Isolation des LDLs	39
2.7.1.1. Réactifs et matériels (tableau 2.9.)	39
2.7.1.2. Méthode	39
2.7.2. Oxydation des LDLs	39
2.7.2.1. Réactifs et matériels (tableau 2.10. et 2.11.)	39
2.7.2.2. Méthode	39
2.7.3. Caractérisation des LDLs : migration sur gel d'agarose	40
2.7.3.1. Réactifs et matériels (tableau 2.12.)	40
2.7.3.2. Méthode	40
2.7.4. Stimulation des cellules RAW 264.7 avec les LDLs	41
2.8. Marquage à l'Oil Red O (ORO) de macrophages RAW spumeux	41
2.8.1. Principe	41
2.8.2. Réactifs et matériels (tableau 2.13.)	41
2.8.3. Méthode	41
2.9. Marquage des cellules spumeuses au Bodipy	41
2.9.1. Principe	41
2.9.2. Réactifs et matériels (tableau 2.14.)	41
2.9.3. Méthode	41
2.10. Quantification de la charge en lipides via le BD Pathway 855	42
2.10.1. Principe	42
2.10.2. Réactifs et matériels (tableau 2.15.)	42
2.10.3. Méthode	42
2.11. Microscope holographique interférométrique digital (MHD)	43
2.11.1. Principe	43
2.11.2. Méthode	43

3. Résultats	44
3.1. Etablissement du protocole de polarisation M1/M2 sur des macrophages RAW 264.7	44
3.1.1. Evaluation de la cytotoxicité due au LPS.....	44
3.1.2. La polarisation des macrophages RAW 264.7	44
3.1.2.1. Optimisation de la technique de qRT-PCR et sélection d'un HKG.....	44
3.1.2.2. Expression de gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par qRT-PCR.....	45
3.1.2.3. Expression des gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par cytométrie de flux...	46
3.1.2.4. Etude de l'expression du gène marqueur M1, IL-6, par ELISA	48
3.1.2.5. Expression de gènes codant pour les récepteurs « scavenger » ou pour les transporteurs de LDLs, étudiée par qRT-PCR	48
3.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur les macrophages polarisés (M1/M2) ou non (M0).....	49
3.2.1. Analyse morphologique des cellules spumeuses contrôles et polarisées	50
3.2.1.1. Observation et quantification de la charge en lipides dans les macrophages polarisés ou non, par coloration à l'Oil Red O.....	50
3.2.1.2. Observation et quantification de la charge en lipides dans les macrophages polarisés ou non, par marquage avec le Bodipy	51
3.2.1.3. Observation des cellules spumeuses polarisées ou non, au microscope holographique digital.....	51
3.2.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur l'expression génique de macrophages polarisés ou non.....	52
3.2.2.1. Effets sur l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par qRT-PCR	52
3.2.2.2. Effets sur l'expression de gènes codant pour les récepteurs « scavenger », les transporteurs aux lipoprotéines et la hème oxygénase, étudiée par qRT-PCR	53
3.2.2.3. Effets sur l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par cytométrie de flux.....	54
4. Discussion générale, conclusion et perspectives.....	56
4.1. Discussion générale et conclusion.....	56
4.1.1. Etablissement du protocole de polarisation M1/M2 sur des macrophages RAW 264.7	56
4.1.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur les macrophages polarisés (M1/M2) ou non (M0).....	57
4.1.2.1. Analyse morphologique des cellules spumeuses contrôles et polarisées.....	57
4.1.2.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur l'expression génique de macrophages polarisés ou non.....	58
4.2. Perspectives	60
6. Références	65
6.1. Bibliographie	65
6.2. Webographie	76

Abréviations

AAM	Alternatively activated macrophage
ABC	ATP-binding cassette ATPase
ABCG1	ATP-binding cassette ATPase de type G1
Ac-LDL	Acétyl-LDL
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
A-MuLV	Virus de la leucémie murine d'Abelson
Apo	Apolipoprotéine
Arg1	Arginase-1
Arg2	Arginase-2
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire-cérébral
BET	Bromodomaine et domaine extra-terminal
BHT	2,6-ditertbutyl 4-méthyl phénol
BSA	Bovine serum albumin
CAM	Classically activated macrophage
CCL2	Chemokine ligand 2 (alias MCP-1)
CCR2	Récepteur au MCP-1
CD36	Cluster of differentiation 36
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX-2	Cyclooxygénase-2 inductible
CRP	C-reactive protein
DHG-L1	Dulbecco's modified Eagle's medium + High Glucose (4,5 g/l) et NaHCO ₃ (1,5 g/l)
dPBS	modified Dulbecco's phosphate buffered saline
D.O.	Densité optique
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Epidermal growth factor precursor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAT	Fatty acid transporter
FcγrIII	Fc γ receptor III
FIZZ1	Transcription factor found in inflammatory zone 1
FSC	Forward scatter (différence de taille)
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HA-mac	Hemorrhage-associated macrophages
HCl	Acide chlorhydrique
HCNP	Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide
HDL	High-density lipoprotein – Lipoprotéine de haute densité
HIS	Heat-inactivated fetal calf serum – Sérum de veau foetal inactivé à la chaleur
HKG	Housekeeping gene
HMOX	Hème oxygénase-1
HO-1	Hème oxygénase-1

HOCl	Acide hypochloreux
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
I-BET	Inhibitor of BET proteins
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN γ	Interféron- γ
IgG	Immunoglobuline G
IL-1	Interleukine-1
IL-4	Interleukine-4
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
IL-13	Interleukine-13
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase - Oxyde Nitrique Synthase inductible
IRF4	Interferon regulatory factor 4
IRF5	Interferon regulatory factor 5
IRF8	Interferon regulatory factor 8
Jmjd3	Jumonji C domain-containing protein 3 (alias Kdm6b)
LA	LDL-receptor type A
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low-density lipoprotein – Lipoprotéine de faible densité
LDL-R	Récepteur aux LDLs
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1 ou intégrine $\alpha_2\beta_2$
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (alias Olr1)
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X receptor
M1	Macrophage pro-inflammatoire (activation classique)
M2	Macrophage anti-inflammatoire (activation alternative)
MCP-1	Monocyte chemo-attractant protein-1 (alias CCL2)
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MEC	Matrice extracellulaire
miRNA/miR	Micro-ARN
mmLDL	minimally modified LDL
MMP	Métallo-protéinase matricielle
MPO	Myéloperoxydase
Mox	Macrophage dont le phénotype est induit par des phospholipides oxydés
Mox-HDL	Myeloperoxidase-oxidized HDL - HDL modifiée avec de la myéloperoxydase
Mox-LDL	Myeloperoxidase-oxidized LDL - LDL modifiée avec de la myéloperoxydase
MRC1	Mannose receptor type C 1
Msr1	Macrophage scavenger receptor-1
MTT	Bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium
Mttp	Microsomal triglyceride transfer protein
MuLV	Virus leucémique murin
Nat-LDL	Lipoprotéine native
NaCl	Chlorure de sodium
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaN ₃	Azide de sodium
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NKT	Natural Killer T

nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Oxyde nitrique
Nox1	NADPH oxydase-1
Nrf2	NF-E2-related factor 2
O ₂ ^{·-}	Anion superoxyde
ORO	Coloration à l'Oil Red O
Ox-LDL	Oxidized LDL - LDL modifiée avec du sulfate de cuivre (CuSO ₄)
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldéhyde
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PL	Phospholipide
pIpC	Acide polyinosinique-polycytidylique
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PPAR _γ	Peroxisome proliferator activated receptor-γ
PRR	Patter recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PU.1	31 kDa-transforming protein
rh-MPO	Myéloperoxydase humaine recombinante exprimée dans des cellules CHO
RNS	Espèces réactives dérivées de l'azote
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
RPL13	60S ribosomal protein L13
RT	Reverse-transcription
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
Scarb1	Scavenger receptor B-1 (alias SR-B1)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD-2	Superoxyde dismutase-2
SR-A	Scavenger receptor-A - Récepteur « scavenger » de classe A
SR-B1	Scavenger receptor-B1 – Récepteur « scavenger » de classe B1
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
SSC	Side or orthogonal scatter (différence de granulosité)
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
sTNF	Soluble homotrimeric TNF
TACE	TNFα converting-enzyme
TBE	Tris/Borate/EDTA
TGFβ1	Tumor growth factor β1
TBP	Tata-Box binding protein
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TLR	Toll-like receptor
TLR-4	Toll-like receptor-4
TNFα	Tumor necrosis factor-α
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen-4 (ligand de VCAM-1) intégrine α ₄ β ₁
VLDL	Very low-density lipoprotein - Lipoprotéine de très faible densité
YM1	Chitinase 3-like 3 lectin

Avant-propos

Cellules protectrices de l'organisme par excellence et acteurs clefs de l'immunité innée, les macrophages étaient généralement classés soit comme des histiocytes, des cellules « au repos », soit comme des macrophages activés, soit comme des macrophages spécialisés dans certains tissus (cellules de Kupffer dans le foie ou ostéoclastes dans le tissu osseux par exemple) (Lawrence and Natoli, 2011).

Cependant, depuis plus d'une dizaine d'années, de nouveaux articles et de nouvelles recherches scientifiques se penchent sur le concept de polarisation des macrophages (Goerdts and Orfanos, 1999), les macrophages pouvant présenter deux phénotypes principaux : un phénotype pro-inflammatoire et un phénotype anti-inflammatoire. De plus, en fonction de la composition du microenvironnement cellulaire, ces phénotypes semblent interchangeables (Khallou-Laschet et al., 2010).

Ce phénomène de polarisation des macrophages a d'abord été un phénomène décrit *in vitro*, mais des articles récents suggèrent que cette polarisation pourrait jouer un rôle pour certaines maladies comme les cancers, les maladies infectieuses ou encore dans le processus athéroscléreux. C'est dans le contexte de l'athérosclérose que nous nous focaliserons dans ce mémoire. Les macrophages sont, en effet, des cellules impliquées dès les premières étapes du développement d'une lésion athéroscléreuse. Des données préliminaires chez la souris suggèrent que la polarisation des macrophages varie au cours du temps dans les lésions athéromateuses (Khallou-Laschet et al., 2010). Nous pouvons donc nous demander dans quelle mesure les macrophages polarisés conservent leur capacité de former des cellules spumeuses, lorsqu'ils sont mis en contact avec des LDLs natives ou modifiées. Ce phénomène sera donc étudié *in vitro* au cours de ce mémoire via l'utilisation de LDLs oxydées, au sein du laboratoire d'URBC, par du CuSO₄ (méthode classique mais peu pertinente) ou par l'action de la myéloperoxydase (une des méthodes alternatives d'oxydation plus pertinente) (Calay et al., 2010).

L'introduction de ce mémoire décrira, dans un premier temps, les macrophages, leurs fonctions, classification et leur polarisation de manière générale (Point 1.1.). Nous verrons ensuite les macrophages dans le contexte de l'athérosclérose, leur rôle dans la formation et le développement de plaques athéroscléreuses et l'implication possible de leur polarisation dans cette pathologie (Point 2.2). En effet, la polarisation des macrophages au sein des lésions athéroscléreuses est aujourd'hui encore un processus peu défini, les mécanismes moléculaires étant peu connus, mais certains auteurs ont déjà proposé un rôle modulateur possible des LDLs modifiées sur la polarisation des macrophages (ex. : (Mantovani et al., 2005)). C'est pourquoi nous passerons en revue l'athérosclérose, les lipoprotéines, leur oxydation et les récepteurs aux LDLs modifiées (ou récepteurs dits « scavenger »), et ce afin de mieux comprendre l'impact global des macrophages et de leur polarisation sur cette affection et son évolution.

INTRODUCTION

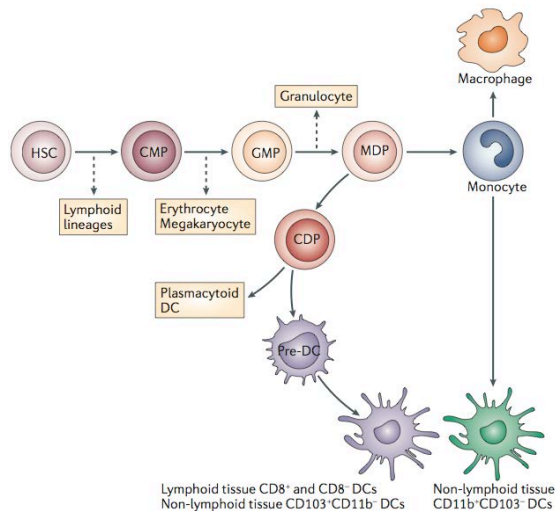


Figure 1.1. Origine des macrophages et cellules dendritiques.

Les macrophages et cellules dendritiques (de tissus non lymphoïdes) proviennent d'un monocyte, lui-même originaire d'une cellule progénitrice MDP (« macrophage and DC progenitor »). Cette cellule MDP peut aussi être la source de cellules CDP (« common DC progenitors »), qui à leur tour permettent la production de cellules dendritiques (des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes). La cellule MDP provient d'une GMP (« granulocyte and macrophage progenitor »), elle-même venant d'une cellule progénitrice myéloïde commune. Les premières cellules à la base de cette lignée sont les cellules souches hématopoïétiques.

(Chow et al., 2011)

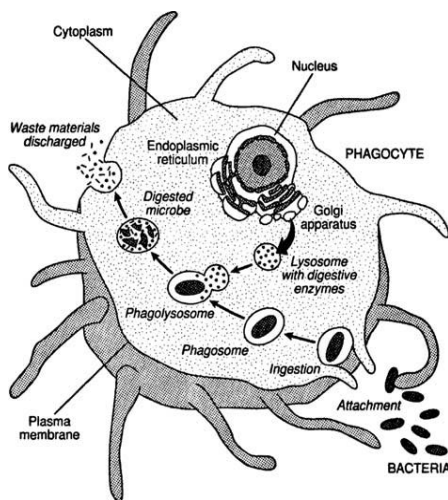


Figure 1.2. Processus de phagocytose.

La phagocytose est un mécanisme de protection de l'organisme envers les infections ou l'inflammation. La reconnaissance, par des récepteurs spécifiques (ex. : récepteur au mannose), de motifs conservés de microorganismes (PAMPS ou « Pathogen-Associated Molecular Patterns ») ou de débris tissulaires mène à des interactions multiples entre le phagocyte et la particule à phagocyter via l'expression de glycoprotéines de surface. Cela entraîne l'extension et l'englobement de la cible par le macrophage grâce aux protéines du cytosquelette, l'actine et la myosine. La particule est ainsi internalisée et englobée dans un phagosome. Celui-ci fusionne par la suite avec des lysosomes qui induisent la dégradation et la digestion de la cible.

Phagocytosis, 2011 : http://www.cliffsnotes.com/study_guide/Phagocytosis.topicArticleId-8524,articleId-8471.html

1. Introduction

1.1. Macrophages : fonctions et polarisation

1.1.1. Origine et fonctions des macrophages

Les macrophages tissulaires proviennent de monocytes circulants, présents depuis 7 jours au minimum dans la circulation sanguine périphérique. Ces derniers sont non seulement les précurseurs des macrophages, mais aussi des cellules dendritiques et des ostéoclastes. Les monocytes proviennent eux-mêmes d'une cellule myéloïde précurseur commune résidant dans la moelle osseuse (*Fig. 1.1*) [(Chow et al., 2011), (Gordon and Taylor, 2005)].

La population de monocytes représente 5 à 10 % de la population de globules blancs et est très hétérogène morphologiquement, tant au niveau de la taille, de la granulosité ou de la forme du noyau. Cette hétérogénéité s'observe également au niveau mobilité, au niveau fonctionnel et au niveau moléculaire [(Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011), (Gordon and Taylor, 2005; Woollard and Geissmann, 2010)]. Ces cellules de l'immunité ont une courte durée de vie et sont incapables de proliférer dans le milieu sanguin (Woollard and Geissmann, 2010).

La fonction principale et commune des macrophages est la phagocytose, processus qui permet de défendre l'hôte contre les infections et de résorber les blessures (Gordon, 2007). Ce cas particulier d'endocytose commence par « l'activation » de la cellule phagocytaire au contact de microorganismes infectieux, de bactéries, de cellules inflammatoires ou de débris cellulaires par exemple. Via la production et l'expression de glycoprotéines de surface, le phagocyte augmente sa capacité d'adhérence vis-à-vis de la particule à endocyter. Une fois attachée à la particule, la membrane cellulaire du phagocyte s'étend et englobe par la suite la particule. Ce système d'extension et d'internalisation est médié via l'action concertée de deux protéines : l'actine et la myosine. En s'étendant, la membrane cellulaire va ainsi internaliser toute la particule, qui se retrouve alors enfermée dans une vacuole dite phagosome. Le phagosome est inclus dans la cellule et fusionne avec des lysosomes, permettant la désintégration et la digestion de la particule. Ce procédé se termine par l'absorption de la majorité des constituants dégradés (*Fig. 1.2*) [(Aderem and Underhill, 1999), (Deshpande, 2010), (Elhelu, 1983)].

Le recrutement des monocytes commence par l'activation des cellules endothéliales. Celles-ci sécrètent alors des chémokines, qui reconnaissent par la suite leurs récepteurs attirés en surface des monocytes et s'y lient. Cette interaction ligand-récepteur mène à une migration directionnelle des monocytes (*Fig. 1.3*) [(Moore and Tabas, 2011), (Woollard and Geissmann, 2010)].

L'étape suivante du recrutement consiste en un ralentissement et un roulement des cellules, via l'interaction entre les sélectines endothéliales et le ligand PSGL-1 (monocyte P-selectin glycoprotein ligand-1) des monocytes, le long de la barrière endothéliale. L'interaction des intégrines exprimées par les monocytes (ex. : VLA-4 ou $\alpha_4\beta_1$, LFA-1 ou $\alpha_2\beta_2$) et leurs ligands exprimés par les cellules endothéliales (ex. : VCAM-1, ICAM-1 respectivement) mène à l'adhérence et à l'arrêt de la cellule migrante. Dans une plaque athéromateuse en formation, l'expression de ces molécules est régulée par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), le tumor necrosis factor- α (TNF α) et l'interféron- γ (IFN γ) [(Aukrust et al., 2008), (Moore and Tabas, 2011), (Woollard and Geissmann, 2010)]. Ce recrutement se termine enfin par la diapédèse ou extravasation de la cellule à travers les

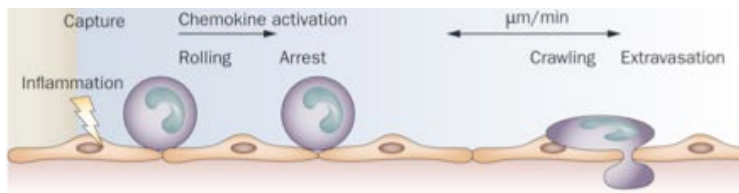


Figure 1.3. Recrutement des monocytes.

Le recrutement des monocytes débute via trois étapes clés que sont: l'activation des cellules endothéliales, la sécrétion de chémokines par celles-ci et la liaison de chémokines à leurs récepteurs. Cela entraîne une migration unidirectionnelle des monocytes qui, reconnaissant les cellules endothéliales par des interactions ligand (PSGL1) – sélectine endothéliale, roulent et ralentissent le long de la barrière endothéliale. Les monocytes sont ensuite arrêtés grâce aux interactions intégrine (du monocyte) – ligand. Enfin, la cellule immune passe par une étape d'extravasation à travers les jonctions endothéliales.

Adapté de (Woollard and Geissmann, 2010)

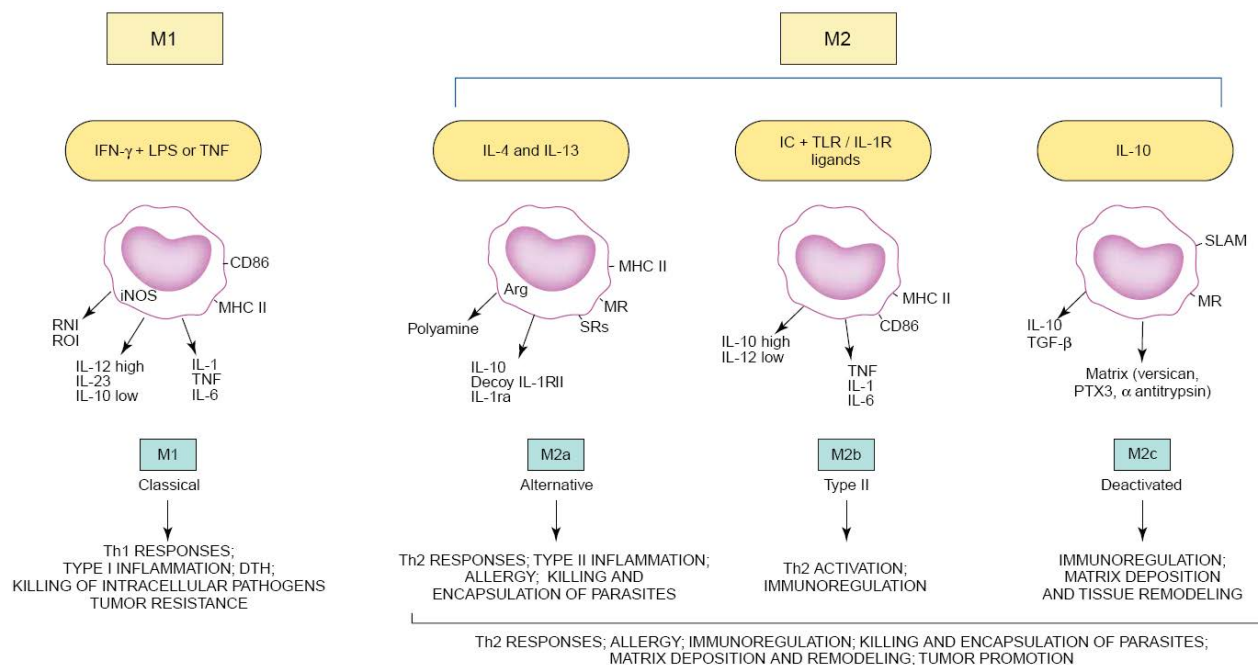


Figure 1.4. Classification des macrophages polarisés.

Les macrophages M1, dits macrophages “classiques”, sont polarisés via l'action de l'IFN γ et du LPS. Ils jouent un rôle dans l'inflammation ainsi que dans la résistance tumorale. Cependant, les macrophages M2 sont considérés comme anti-inflammatoires. Malgré leur rôle commun dans le remodelage tissulaire, le développement tumoral et l'immunorégulation, ils sont classés en trois sous-classes: les macrophages M2a ou dits “alternatifs”, les macrophages M2b et M2c. Ces trois sous-classes ont été créées car ces cellules sont générées via l'action de différents stimuli: en effet, les macrophages M2a sont polarisés via l'IL-4 et IL-13; les M2b via l'activation des TLR + IC (complexes immuns) ou par les agonistes de l'IL-1R; les M2c via l'IL-10.

(Mantovani et al., 2004)

jonctions endothéliales (*Fig. 1.3*) [(Moore and Tabas, 2011), (Woollard and Geissmann, 2010)].

Le microenvironnement tissulaire induit alors la différenciation des monocytes en macrophages (en présence, par exemple, de M-CSF « Macrophage-Colony Stimulating Factor »). [(Moore and Tabas, 2011), (Woollard and Geissmann, 2010)]

A l'instar des monocytes, les macrophages sont des cellules d'une grande plasticité et hétérogénéité. Ils sont réceptifs aux stimuli présents dans leur microenvironnement et acquièrent alors différents phénotypes fonctionnels [(Lawrence and Natoli, 2011), (Mosser and Edwards, 2008) (Wolfs et al., 2011)].

1.1.2. La polarisation M1 et M2 des macrophages

Les recherches impliquant les macrophages se sont longtemps focalisées sur les macrophages dits M0 ou histiocytes. Cependant, dans les années 1970, Mackaness et son équipe ont découvert que des signaux du microenvironnement cellulaire étaient capables de moduler la physiologie des macrophages, afin d'améliorer leur activité microbicide [(Mackaness, 1977), (Mosser and Edwards, 2008)]. Au fil des années, ces cellules effectrices ont été classées en fonction des marqueurs géniques qu'elles expriment et de leurs fonctions principales. Le concept de polarisation des macrophages commence à être bien décrit, non seulement *in vitro*, mais aussi dans les domaines du cancer et de l'athérosclérose.

1.1.2.1. Phénotypes M1 et M2

La classification des macrophages est calquée sur celle de la nomenclature des cellules immunitaires Th1/Th2 : les macrophages sont dits M1 ou M2 selon le type de stimulation utilisé (*Fig. 1.4*) [(Lopez-Castejon et al., 2010), (Mantovani et al., 2007; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2009; Mosser, 2003; Mosser and Edwards, 2008)].

1.1.2.1.1. Les macrophages M1

Le phénotype M1 correspond à des macrophages dits activés « classiquement » (« CAMs » ou « classically activated macrophages »). Ce phénotype pro-inflammatoire est induit par l'interféron- γ avec ou sans stimuli bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharide) ou des cytokines telles que le GM-CSF et le TNF α (*Fig. 1.4*) [(Mantovani et al., 2004), (Mantovani et al., 2005), (Mantovani et al., 2007), (Mosser, 2003), (Mosser and Edwards, 2008)].

Ces cellules sont principalement impliquées dans la défense de l'hôte de part leur action microbicide envers les microorganismes intracellulaires. Elles jouent également un rôle dans la résistance tumorale et la destruction tissulaire. Elles exercent des activités cytotoxiques et antiprolifératives via la production efficace de ROS (« Reactive Oxygen Species »), de RNS (« Reactive Nitrogen Species ») et de cytokines pro-inflammatoires (ex. : IL-6) [(Mantovani et al., 2005), (Mantovani et al., 2007) (Van Ginderachter et al., 2006)].

Cependant, l'état inflammatoire ne doit pas être persistant afin de limiter les dommages tissulaires empêchant la cicatrisation et de limiter les dommages à l'ADN [(Van Ginderachter et al., 2006), (Wolfs et al., 2011)]. Un équilibre est possible grâce au développement de mécanismes anti-inflammatoires. Parmi ceux-ci, nous pouvons signaler la polarisation des macrophages M2 anti-inflammatoires.

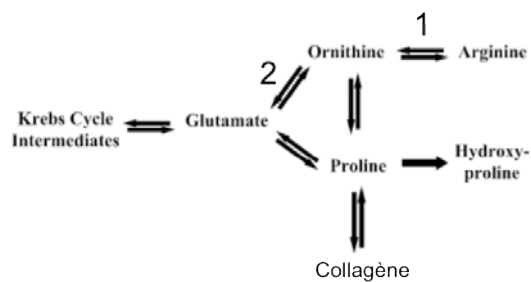


Figure 1.5. Voies de synthèse de la proline.

La L-arginine, sous l'action de l'enzyme arginase-1 (1), est convertie en L-ornithine. Celle-ci, via l'action de l'ornithine γ -aminotransférase (2), est convertie en acide glutamique γ -semialdéhyde qui permet alors la synthèse de proline, d'hydroxyproline et donc de collagène.

Adapté de (Barbul, 2008)

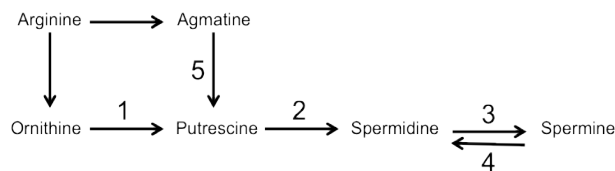


Figure 1.6. Synthèse des polyamines.

La L-arginine, sous l'action de l'enzyme arginase-1, est convertie en L-ornithine. Cette dernière peut également être convertie en putrescine via l'ornithine décarboxylase (1) et ainsi ouvrir la voie à la synthèse des polyamines, importantes pour l'expression des gènes, la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. La putrescine peut aussi être dérivée de l'agmatine (elle-même provenant de la L-arginine) par une réaction catalysée par l'agmatinase (5). La spermidine synthase (2) catalyse la formation de spermidine à partir de putrescine, permettant ainsi la formation de spermine via l'action de la spermine synthase (3). Cette dernière réaction est réversible et catalysable par la spermine oxydase (4).

Adapté de (De Bandt, 2006)

1.1.2.1.2. Les macrophages M2

Au contraire des macrophages M1, le type M2 est anti-inflammatoire et est subdivisé en 3 classes : les macrophages M2a, M2b et M2c (*Fig. 1.4*). Ces macrophages sont dits activés de façon alternative (« AAMs ou « alternatively activated macrophages »). La polarisation M2a est induite par la présence de cytokines produites par des cellules T helper 2 (Th2) que sont l'interleukine-4 (IL-4) et/ou l'interleukine-13 (IL-13). La polarisation M2b est, quant à elle, obtenue via la présence de complexes immuns ou d'IL-1R tandis que la M2c l'est via la présence d'hormones glucocorticoïdes ou sécostéroïdes [(Fritz, 2009), (Gordon, 2003), (Gordon and Taylor, 2005), (Gordon and Martinez, 2010), (Libby et al., 2010), (Mantovani et al., 2007), (Mege et al., 2011), (Mosser, 2003), (Porcheray et al., 2005), (Van Ginderachter et al., 2006)].

Ce mémoire étudiera les macrophages M2a au vu des plus nombreuses informations trouvées sur cette classe dans la littérature.

Ces macrophages présentent évidemment une capacité diminuée à produire des cytokines inflammatoires et des ROS, évitant ainsi l'oxydation des LDLs. Cependant, ils jouent aussi un rôle important dans l'encapsulation et l'élimination de parasites extracellulaires (ex. : helminthes). Ils ont également une action de contrôle et de résolution de l'inflammation via la production de médiateurs anti-inflammatoires [(Mege, 2010), (Van Ginderachter et al., 2006)], mais aussi une action dans l'immunorégulation, en atténuant les réponses immunes, et dans l'exacerbation d'allergies (production élevée de cytokines Th2 et d'IL-10) [(Mantovani et al., 2004), (Van Ginderachter et al., 2006), (Wolfs et al., 2011)]. De plus, ils sont impliqués dans la protection, la réparation et le remodelage tissulaire grâce à l'expression de l'arginase-1 qui permet l'obtention de L-ornithine et d'urée à partir de la L-arginine (Mantovani et al., 2005). En effet, la L-ornithine, via l'action de différentes enzymes, est convertie en proline : avec sa forme hydroxylée, la proline est l'acide aminé prédominant, correspondant à 23 % de la molécule de collagène (*Fig. 1.5*) (Barbul, 2008). De plus, la L-ornithine et la L-arginine peuvent également être converties en polyamines (putrescine, spermine, spermidine dérivant de la L-ornithine ; agmatine dérivant de la L-arginine), jouant un rôle important dans l'expression génique, la progression du cycle cellulaire et la prolifération des cellules (*Fig. 1.6*) [(Barbul, 2008), (De Bandt et al., 2006)].

Ces macrophages ont aussi d'autres fonctions importantes, aidant à la réparation et au remodelage tissulaire, telles que la stimulation de l'angiogenèse et l'élimination des débris cellulaires (Wolfs et al., 2011).

En d'autres mots, les macrophages sont donc impliqués dans les étapes d'initiation et d'amplification de l'inflammation, mais aussi dans sa résolution (Porcheray et al., 2005).

1.1.2.2. Sources des macrophages pour étudier la polarisation *in vitro*

Les études sur les macrophages et le processus de polarisation sont en pleine expansion (ex. : [(Benoit et al., 2008) (Gordon, 2003), (Gordon and Martinez, 2010), (Hirose et al., 2011), (Lopez-Castejon et al., 2010), (Mantovani et al., 2004), (Mantovani et al., 2009), (Mege et al., 2011; Porcheray et al., 2005)]). Actuellement, les stimuli de polarisation utilisés sont pratiquement identiques (à l'exception de nouveaux modes de polarisation qui sont encore testés tels que le GM-CSF pour la polarisation M1 et le M-CSF pour la polarisation M2) [(Fleetwood et al., 2007), (Martinez et al., 2006), (Takeuchi and Akira, 2011)]. Cependant, la

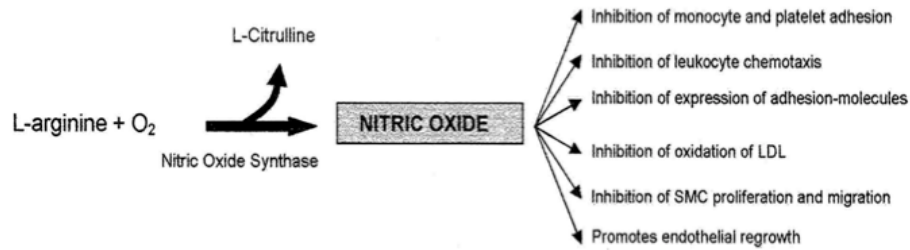


Figure 1.7. L'oxyde nitrique.

L'oxyde nitrique (NO) est produit, via l'action des NOS (« nitric oxide synthase »), à partir de L-arginine. Le NO a notamment un rôle dans la vasodilatation, mais aussi dans l'inhibition de l'oxydation des LDLs et dans la prolifération des cellules endothéliales.

(Yasa and Türkseven, 2005)

source des macrophages utilisés n'est pas toujours la même et il faut distinguer ce qui se fait chez la souris et chez l'homme.

Chez la souris, il existe à la fois plusieurs sources possibles de macrophages et plusieurs « backgrounds » génétiques (généralement les souris C57BL/6 ou les souris Balb/c).

Par exemple, Khallou-Laschet et son équipe ont choisi de travailler sur des précurseurs myéloïdes qu'ils isolent à partir de la moelle osseuse de fémurs de souris C57BL/6 ou de souris ApoE^{-/-}, âgées de 6 à 10 semaines. Ces précurseurs sont mis en culture et se différencient en monocytes, et ceux-là mêmes, via l'ajout de M-CSF (« Macrophage-Colony Stimulating Factor-1 »), se différencient en macrophages (Khallou-Laschet et al., 2010).

Enfin, des macrophages tissulaires sont également utilisés dans ce type de recherche. Ce sont le plus souvent des macrophages prélevés à partir de la cavité péritonéale de souris (C57BL/6 dans le cas des recherches menées par Lopez-Castejón) après injection de thioglycollate [(Lopez-Castejon et al., 2010; Pelegrin et al., 2008)].

Chez l'homme, pour des raisons éthiques, on part généralement des monocytes circulants périphériques qui peuvent être directement isolés à partir de donneurs humains sains, et ensuite être différenciés en macrophages via l'addition de M-CSF dans le milieu de culture (Hirose et al., 2011).

Cependant, aucun article décrivant la polarisation de macrophages de la lignée RAW 264.7 n'a été trouvé jusque maintenant, bien qu'il s'agisse d'un modèle robuste et bien décrit dans la littérature de macrophages murins en culture. Comme nous le verrons plus loin, ce mémoire s'attachera à établir un processus de polarisation *in vitro* de cette lignée cellulaire, déjà utilisée au laboratoire dans la thèse de D. Calay (Calay et al, 2010).

1.1.2.3. Marqueurs géniques M1 et M2

1.1.2.3.1. Les marqueurs M1

a. iNOS (« inducible Nitric Oxide Synthase »)

Un des premiers marqueurs M1 étudié, en tous les cas pour les macrophages murins, est l'iNOS (encodée par NOS-2) ou autrement dit, l'enzyme oxyde nitrique synthase inductible. Cette enzyme soluble est capable de catalyser la formation d'oxyde nitrique (NO) à partir de L-arginine (Fig. 1.7) [(Pesce et al., 2009), (Shimokawa and Tsutsui, 2010)].

Elle entre donc en compétition pour la L-arginine avec l'arginase.

Au contraire de l'eNOS (*endothelial NOS* ou NOS-3) ou de la nNOS (*neuronal NOS* ou NOS-1), l'expression de l'iNOS n'est pas constitutive, mais inductible par des stimuli tels que les endotoxines microbiennes (ex. : LPS) ou des cytokines pro-inflammatoires (ex. : IFN γ), et son activité est indépendante du calcium. Un environnement oxydatif est donc souvent responsable de son induction, et ainsi de la production de NO, lui permettant alors d'agir dans la défense de l'hôte via une action bactéricide, dans la résistance tumorale et dans la respiration oxydative des macrophages (Fig. 1.7) [(Gotoh and Mori, 1999), (Shimokawa and Tsutsui, 2010)].

Le NO, produit en fortes quantités et de manière constitutive par la eNOS, a comme fonction principale de réguler la vasodilatation. Mais il est également impliqué dans la réponse immune et joue aussi le rôle de neurotransmetteur [(Getz and Reardon, 2006), (Gotoh and Mori, 1999), (Nathan, 2003), (Shimokawa and Tsutsui, 2010)].

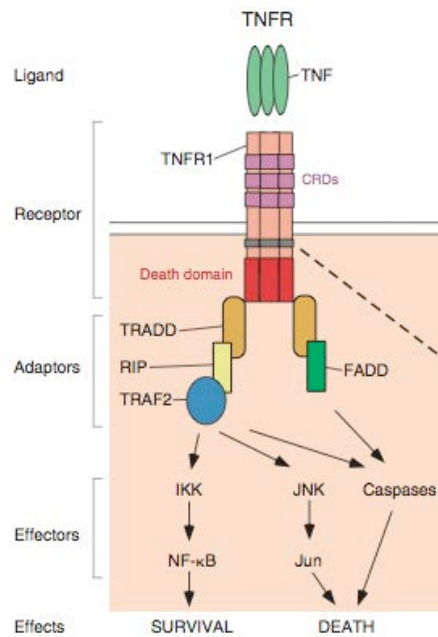


Figure 1.8. Voie de signalisation du TNF α .

La liaison du TNF α à son récepteur (TNF-R) a pour conséquence le recrutement du complexe protéique TRADD (« tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein »)-RIP (« receptor interacting protein »)-TRAF2 (« TNF receptor-associated factor 2 »). La protéine TRADD a aussi la capacité de se lier à FADD (« Fas-associated death domain ») ou à la caspase 8, ce qui mène à l'apoptose de la cellule. L'activation de RIP et TRAF2 permet l'activation des kinases de l'inhibiteur de $\text{I}\kappa\text{B}$ (IKK) qui en phosphorylant $\text{I}\kappa\text{B}$, provoquent sa dégradation et donc l'activation de NF- κB (survie cellulaire). Elle permet aussi l'activation de la voie JNF/Jun, entraînant dans ce cas ci la mort cellulaire.

(Mathew et al., 2009)

Quand il est produit en fortes quantités, suite à l'induction de l'iNOS, il peut devenir toxique, directement ou indirectement via la production de peroxynitrite. Cette dernière molécule, très réactive, est produite quand il y a production de NO et de O_2^- , ce qui est le cas en conditions inflammatoires.

Un excès de production d'oxyde nitrique peut avoir pour effet de mener à l'apoptose des macrophages notamment, via une activation des caspases. Ses propriétés cytotoxiques l'amènent aussi à parfois réagir avec les acides nucléiques, en inhibant les enzymes de la réparation de l'ADN et en provoquant des mutations ou des cassures double-brin. Il peut également être dommageable en réagissant avec les groupements thiols ou le fer (ex. : Fe^{2+}) des sites actifs (ex. : hème) des protéines (Gotoh and Mori, 1999).

Par contre, chez l'humain, les choses sont beaucoup moins claires et beaucoup plus controversées. En effet, une stimulation *in vitro* via la voie TLR + $IFN\gamma$ n'induit pas d'expression d'iNOS ou de production de NO alors que les fonctions de ces macrophages M1 sont similaires à celles chez la souris [(Lawrence and Natoli, 2011), (Murray and Wynn, 2011)].

b. Tumor necrosis factor- α

Cette cytokine est entre autres produite par les macrophages activés, dont elle stimule la phagocytose. Le LPS et l'IL-1 sont les deux stimuli principaux induisant une forte production de $TNF\alpha$ [(Locksley et al., 2001), (Wajant et al., 2003)]. Elle est tout d'abord produite en tant que protéine transmembranaire, qui par la suite est clivée et rendue soluble (sTNF « soluble homotrimeric TNF ») via la métalloprotéase TACE (« $TNF\alpha$ converting-enzyme ») (Wajant et al., 2003). Le $TNF\alpha$ est un régulateur des cellules de l'immunité. Il est capable, par l'intermédiaire de TRADD (« tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein »), d'activer $NF\kappa B$, la voie des MAPKinases et d'induire des signaux de mort cellulaire (apoptose) (Fig. 1.8). Cette cytokine est ainsi impliquée dans la stimulation de la phase aigüe de l'inflammation, en induisant une cascade de cytokines et en augmentant la perméabilité vasculaire. Mais elle est aussi impliquée par exemple dans l'inhibition du développement tumoral ou de la réplication virale [(Locksley et al., 2001), (Mathew et al., 2009), (Wajant et al., 2003)].

c. Interleukine-6

Le gène de l'interleukine-6 (IL-6) encode une cytokine impliquée dans la phase aigüe de l'inflammation. Son action est essentielle dans la régulation de l'inflammation aigüe et chronique. Son rôle est de servir de molécule messagère entre les cellules impliquées dans l'inflammation.

Elle est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les macrophages et les cellules T. Cette induction de l'expression de l'IL-6 a lieu lorsqu'il y a reconnaissance de PAMPs (« Pathogen-associated molecular patterns ») par les PRRs (« Pattern-recognition receptors ») de la cellule. Elle joue donc un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes [(Schuett et al., 2009), (van der Poll et al., 1997)]. Cependant, elle peut également être induite par des cytokines de l'inflammation (ex. : IL-1, $TNF\alpha$, IFN, PDGF) (Schuett et al., 2009).

Il a été de plus prouvé que l'IL-6 intervient dans le développement de la plaque athéroscléreuse et dans son instabilité. En effet, l'IL-6 est impliquée dans la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs pro-thrombotiques, dans l'activation de métalloprotéinases de matrice (MMPs) ainsi que dans la modification de lipoprotéines via les phospholipases (Schuett et al., 2009).

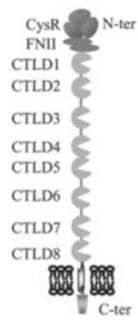


Figure 1.9. Structure du récepteur au mannose (MR).

Le MR est une glycoprotéine transmembranaire possédant 8 CTLDs (« C-type lectin-like domains »), un domaine N-terminal riche en cystéine (CysR) et un seul domaine fibronectine de type II (FNII). Ce dernier permet la reconnaissance du collagène. Le MR lie aussi le mannose, le fucose et la N-acétylglucosamine, de façon calcium-dépendante. Son activité de liaison aux sucres se fait grâce à CTLD4.

Adapté de (Boskovic et al., 2006)

De plus, de part son action, l'IL-6 promeut le dysfonctionnement endothélial, la prolifération et migration des cellules musculaires lisses, le recrutement de cellules inflammatoires, mais aussi la formation de macrophages spumeux via son effet inducteur sur l'expression des récepteurs « scavenger » CD36 et SR-A.

Cependant, cette cytokine n'est pas exclusivement pro-inflammatoire. En effet, elle intervient aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires, lui conférant ainsi une action anti-inflammatoire (Schuett et al., 2009).

d. Arginase-2

L'arginase-2 (Arg2), une enzyme mitochondriale, est exprimée dans les tissus extra-hépatiques (rein et prostate principalement). Elle catalyse la dernière étape convertissant la L-arginine en urée, éliminant l'excès d'azote et empêchant l'accumulation toxique d'ammoniac. Ainsi, elle permet, via la conversion de la L-arginine en L-ornithine, la synthèse de polyamines telles que la spermidine ou la spermine, mais de façon préférentielle permet la synthèse de glutamate et celle de proline, précurseur du collagène. En effet, elle se co-localise dans la mitochondrie avec l'ornithine aminotransférase (*Fig. 1.5 et 1.6*). [(Getz and Reardon, 2006; Li et al., 2001; Marathe et al., 2006)].

Elle est induite, tout comme l'iNOS, par le LPS dans les macrophages de la lignée RAW 264.7 (Gotoh and Mori, 1999). Son expression est régulée, entre autres, par le LXR (« Liver X receptor ») dans les macrophages RAW (Marathe et al., 2006).

1.1.2.3.2. Les marqueurs M2

a. MRC1 (Mannose receptor type C 1), alias CD206

Cette molécule transmembranaire de type 1 a pour fonction principale d'endocyter et de phagocyter des microorganismes (ex. : bactéries, levures). Il s'agit en réalité d'une glycoprotéine, qui possède 8 domaines de type lectine C permettant la liaison à des glycoprotéines avec des résidus terminaux mannose, fucose ou N-acétylglucosamine, à des sucres sulfatés ou à du collagène. La liaison aux sucres se fait en présence de calcium (*Fig. 1.9*) [(Boskovic et al., 2006), (Harris et al., 1992), (Martinez-Pomares et al., 2001)].

Il semblerait que le récepteur au mannose soit utile au système immunitaire afin de différencier le soi du non-soi. C'est pour cette raison qu'on l'associe à la famille des PRRs (Martinez-Pomares et al., 2001).

b. Arginase-1

Au contraire de l'arginase-2, l'arginase-1 est un enzyme cytoplasmique, codée par un gène différent et exprimée de manière constitutive dans le foie. Elle est également exprimée dans les macrophages. Son expression n'est pas régulée par le LXR, mais bien par les stimuli exogènes, tels que l'IL-4 et l'IL-13. Elle a comme fonction, à l'instar de l'arginase-2, de catalyser la dernière étape du cycle de l'urée [(Gotoh and Mori, 1999), (Li et al., 2001), (Marathe et al., 2006), (Pesce et al., 2009), (Teupser et al., 2006)].

L'arginine est en fait disponible à partir de la circulation sanguine, de la dégradation de protéines intracellulaires ou du cycle NO-citrulline permettant la génération de citrulline (Gotoh and Mori, 1999).

Dans ce cas-ci, l'ornithine sera préférentiellement convertie en polyamines (spermidine, putrescine), en raison de la co-localisation d'Arg1 avec l'ornithine décarboxylase dans le cytosol (Li et al., 2001).

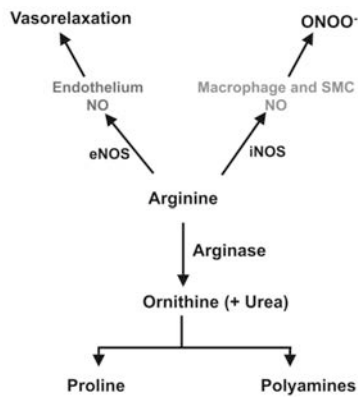


Figure. 1.10. Compétition entre l'iNOS et l'arginase pour la L-arginine.

L'arginine peut à la fois directement servir de substrat pour la synthèse de protéines ou indirectement en étant clivée en urée et ornithine via l'arginase. Elle peut aussi servir à générer le NO (oxyde nitrique), via l'action de l'iNOS.

L'expression d'Arg1 est induite par des cytokines anti-inflammatoires. Cependant, bien qu'elle intervient dans la résolution de l'inflammation, elle peut être aussi pro-athérogène quand son expression augmente dans les cellules endothéliales. En effet, elle diminue la concentration en NO dans les cellules endothéliales, réduisant ainsi l'impact vasodilatateur de ce dernier.

(Getz and Reardon, 2006)

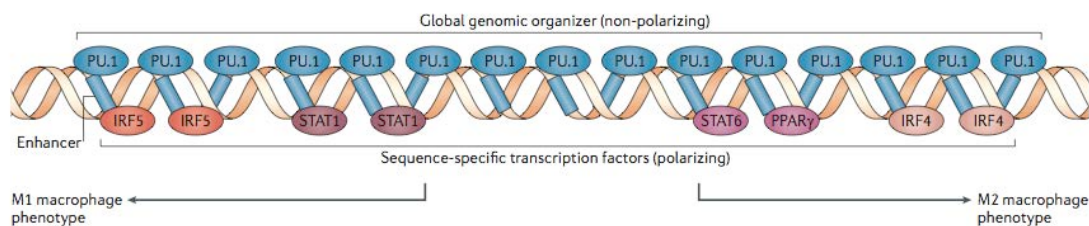


Figure 1.11. Contrôle transcriptionnel de la polarisation chez les macrophages.

Les histones H3 monométhylées au niveau de la lysine 4 se placent localement lorsque PU.1 (31 kDa-transforming protein, liant les régions de l'ADN riches en purine) est lié à l'ADN : l'ADN est alors accessible aux facteurs de transcription, déterminant le phénotype du macrophage. La liaison de STAT1 (« Signal transducer and activator of transcription-1 ») et IRF5 (« Interferon-regulatory factor-5 ») régule l'expression de gènes marqueurs M1, tandis que la liaison de STAT6, IRF4 et PPARγ (« Peroxisome proliferator-activated receptor-γ ») régule l'expression de gènes marqueurs M2.

(Lawrence and Natoli, 2011)

L'arginase et l'iNOS entrent donc en compétition pour la L-arginine, entraînant ainsi une diminution de la production de NO et évitant donc l'apoptose de tous les macrophages RAW (Gotoh and Mori, 1999), mais empêchant aussi l'activation d'une réponse immunitaire excessive. En effet, un équilibre est nécessaire entre une activation correcte des macrophages inflammatoires et la résolution de l'inflammation : cet équilibre permet le déclenchement de réponses immunes efficaces et ciblées (*Fig. 1.10*) (Marathe et al., 2006).

Les rôles principaux de l'arginase sont d'intervenir dans la prolifération cellulaire et la cicatrisation, mais aussi dans l'angiogenèse, avec comme buts finaux, la protection, le remodelage et la réparation du tissu endommagé (*Fig. 1.10*) [(Barbul, 2008), (De Bandt et al., 2006), (Li et al., 2001), (Mantovani et al., 2005), (Marathe et al., 2006), (Wolfs et al., 2011)]. Ces rôles sont décrits ci-dessus dans le point « 1.1.2.1.2. Les macrophages M2 ».

Enfin, le CD36, un récepteur « scavenger », dont les fonctions seront expliquées ci-dessous (« 1.2.2.2.1.2. Récepteurs « scavenger » b. Récepteurs « scavenger » de classe B »), est lui aussi étudié en tant que marqueur génique M2.

En plus de ces marqueurs géniques, de nouveaux marqueurs ont été récemment associés aux macrophages M1 ou M2. En effet, c'est le cas d'IRF5, STAT1 et les hétérodimères p65/p50 de NFκB dont l'expression (degré d'activation) a été reliée à l'activation des macrophages M1, tandis qu'IRF4, STAT6, PPARγ et les homodimères p50 de NFκB, ont été associés au phénotype M2 des macrophages (Wolfs et al., 2011), comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Ces marqueurs n'ont pas été étudiés au cours de ce mémoire.

1.1.2.4. Mécanismes moléculaires de la polarisation des macrophages

Les différents signaux émis dans le microenvironnement cellulaire (cytokines, facteurs de croissance, PAMPS) mènent à la polarisation des macrophages via un changement de leur phénotype et fonctions. Cependant, la manière dont ces signaux induisent une réponse transcriptionnelle spécifique commence seulement à être décryptée. La compréhension des mécanismes moléculaires, conduisant à la diversité phénotypique des macrophages, est encore rudimentaire. Lawrence et Natoli sont parmi les premiers à s'être penchés sur le problème. Au cours de leurs recherches, ils ont découvert que PU.1 (31 kDa-transforming protein, liant les régions de l'ADN riches en purine) contrôle « l'organisation génomique et le répertoire régulateur transcriptionnel des macrophages » (*Fig. 1.11*) (Lawrence and Natoli, 2011).

De part la présence de PU.1, les histones H3 monométhylées au niveau de la lysine 4 (H3K4me1) se placent localement, là où il s'est lié à l'ADN, et rendent alors l'ADN accessible aux facteurs de transcription. Ceux-ci, régulés par des stimuli externes, ont donc pour action de moduler la fonction des macrophages. Ils sont en plus spécifiques du stimulus reçu par la cellule (Lawrence and Natoli, 2011).

Ces facteurs de transcription sont par exemple NF-κB, IRF8 (pour la différenciation des macrophages), mais aussi STAT1 et IRF5 pour la polarisation M1 ainsi qu'IRF4 et STAT6 pour la polarisation M2 (*Fig. 1.12*). En outre, les phénotypes M1 et M2 sont renforcés par une régulation réciproque de l'expression de certains gènes marqueurs : par exemple, STAT6 contribue non seulement à la mise en place du phénotype M2, mais en favorisant l'expression de PPARγ, il permet une régulation négative de l'expression des gènes marqueurs M1 cibles, de NF-κB et AP1 par transrépression PPARγ-dépendante (*Fig. 1.12 et 1.13*) [(Lawrence and Natoli, 2011), (Takeuchi and Akira, 2011)].

La polarisation des macrophages est également régulée par des mécanismes épigénétiques (pour une revue récente, voir (Takeuchi and Akira, 2011)). Une stimulation « TLR » induira

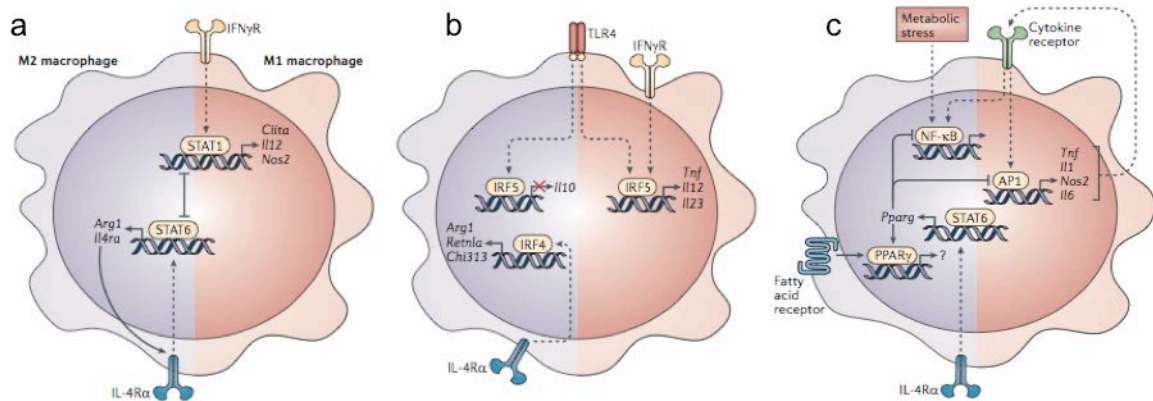


Figure 1.12. Activation et répression transcriptionnelle des gènes impliqués dans la polarisation.

Plusieurs mécanismes permettent la régulation de la polarisation des macrophages. Par exemple, le facteur de transcription STAT6 régule l'expression du récepteur à l'IL-4, tandis que STAT1 est capable d'inhiber STAT6 (a). STAT6 est également capable d'induire l'expression de PPAR γ , lui-même transréprimant l'expression NF- κ B et AP1-dépendante de gènes pro-inflammatoires (c). Dans le cas d'une polarisation M1, des stimuli tels que le LPS ou l'IFN γ induisent l'activation d'IRF5 et ainsi l'expression de gènes pro-inflammatoires. Au contraire, l'IL-4 induit l'activation d'IRF4 et l'expression de gènes anti-inflammatoires (b).

(Lawrence and Natoli, 2011)

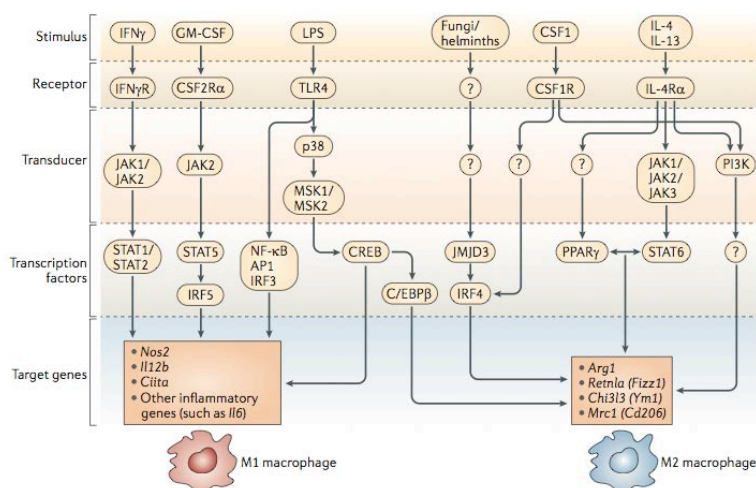


Figure 1.13. Voies signalétiques régulant la polarisation M1 et M2.

Un stimulus, tel que le LPS pour la polarisation M1 ou l'IL-4 et l'IL-13 pour la polarisation M2, induit l'activation de facteurs de transcription. Ceux-ci ont pour rôle de cibler l'expression des gènes marqueurs M1 ou M2, en la réprimant ou en l'induisant.

(Lawrence and Natoli, 2011)

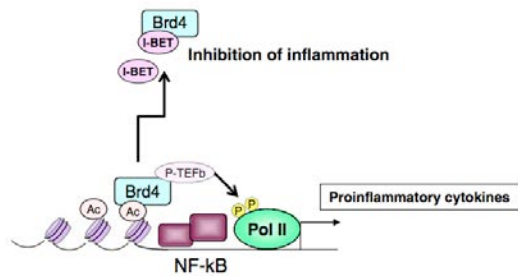


Figure 1.14. Régulation de l'activation des gènes marqueurs M1 et M2.

Les histones acétylées sont reconnues par les protéines BET (bromodomaine et domaine extra-terminal). Une de ces protéines, Brd4, est capable d'interagir avec P-TEFb (l'hétérodimère Cdk9-cycline T), ce qui a pour conséquence d'induire l'élongation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II et donc l'expression de gènes pro-inflammatoires. Cependant, afin de limiter les dégâts cellulaires, l'I-BET (« Inhibitor of BET protein ») peut interagir avec le bromodomaine : il s'ensuit une répression de l'expression de ces gènes via la déstabilisation des complexes de chromatine. (Takeuchi and Akira, 2011)

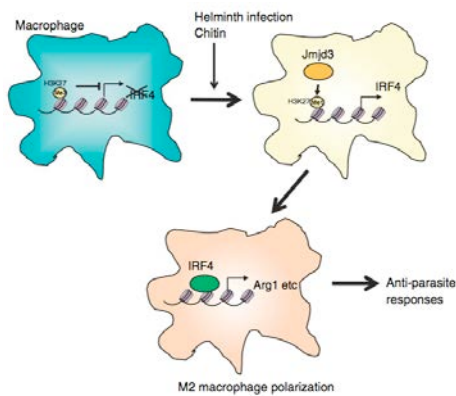


Figure 1.15. Régulation de la polarisation M2.

Jmjd3 (« Jumonji-C (JmJC) domain-3 ») a comme action de démétyler les histones H3K27 en histones monométhylées. L'ADN est alors accessible aux facteurs de transcription STAT6, IRF4 et PPARγ, ce qui permet l'expression des gènes marqueurs M2 tels que l'arginase-1. (Takeuchi and Akira, 2011)

une acétylation des histones et donc une polarisation M1 des macrophages, liée à l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires. Les histones acétylées sont reconnues par les protéines BET (bromodomaine et domaine extra-terminal) dont certaines (ex. : Brd4) interagissent avec des Cdk-cyclines (tel l'hétérodimère Cdk9-cycline T alias P-TEFb) afin de stimuler l'élongation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II. De plus, il a été découvert que l'I-BET (« inhibitor of BET proteins ») est capable d'interagir avec le bromodomaine et de supprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires en déstabilisant ces complexes de chromatine, régulant ainsi la réponse dans le but d'éviter trop de dommages aux cellules et à l'ADN (Fig. 1.14) [(Nicodeme et al., 2010), (Takeuchi and Akira, 2011)].

Par contre dans le cas d'une polarisation M2, Jmjd3 (alias Kdm6b) est indispensable (sauf pour les macrophages M2 générés à partir d'un stimulus IL-4) puisqu'il agit en tant que déméthylase des histones H3K27. Les histones H3K27 triméthylées deviennent monométhylées et l'ADN devient accessible aux facteurs de transcription STAT6, PPAR γ et IRF4 (Fig. 1.15) [(Lawrence and Natoli, 2011), (Takeuchi and Akira, 2011)].

La spécificité de l'état de polarisation, et plus précisément l'activation des gènes en réponse aux stimuli, est aussi liée à plusieurs caractéristiques génomiques. En effet, elle dépendra notamment de la combinaison des « sites de liaison des facteurs de transcription et/ou du contenu en îlots CpG » au niveau du promoteur. Par exemple, une stimulation avec le LPS induira l'activation de facteurs de transcription, qui se lieront au niveau de ces îlots CpG, pauvres en nucléosomes, préalablement déméthylés au niveau de la cytosine. C'est le cas pour les promoteurs des gènes encodant le TNF α , la SOD-2 (superoxyde dismutase-2) et la COX-2 (cyclooxygénase-2 inductible) [(Lawrence and Natoli, 2011), (Takeuchi and Akira, 2011)].

En résumé, la polarisation des macrophages est contrôlée via des mécanismes transcriptionnels et par des mécanismes épigénétiques, qu'il s'agisse de modifications d'histones ou de séquences génomiques particulières tels les îlots CpG modulant la stabilité des nucléosomes.

1.1.2.5. La polarisation des macrophages *in vivo*

Sur base des profils d'expression génique typiques des macrophages M1 et M2, nous pouvons proposer des fonctions pour ces deux phénotypes.

In vivo, on a essayé d'identifier le phénotype des macrophages, sur base de l'expression de quelques uns de ces gènes marqueurs, mais le rôle et la régulation de la polarisation des macrophages *in vivo* restent largement incompris.

Les fonctions principales des macrophages M1 et M2 semblent relativement comparables et conservées entre le modèle murin et humain. Néanmoins, les marqueurs géniques utilisés pour les discriminer diffèrent entre ces deux espèces.

Déjà au niveau des monocytes humains, la présence de CD16 permet d'identifier plusieurs sous-populations. Tandis que chez la souris, cette distinction se fait sur base de l'expression de l'antigène Ly6C (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

Dans le cas des macrophages, la polarisation M2 est associée à l'expression d'YM1 (« chitinase 3-like 3 lectin »), de FIZZ1 (« transcription factor found in inflammatory zone 1 ») et d'Arg1 (arginase-1) chez la souris alors que la polarisation M1 est associée à une surexpression d'iNOS et d'IL-6. Chez l'homme, la polarisation M2 semble plus associée à une augmentation de l'expression d'IL-10 et d'IL-1Ra (« IL-1R antagonist ») ainsi que de l'indolamine 2,3-dioxygénase. La polarisation M1 est quant à elle liée à l'augmentation de l'expression d'IL-12 et d'IL-23 (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

Trois pathologies sont très fréquemment évoquées dans les publications liées à la polarisation *in vivo* : les cancers, l'obésité et l'athérosclérose.

Les macrophages ont des rôles différents dans les **cancers** en fonction du microenvironnement, c'est-à-dire en fonction de leur état de polarisation. Ils peuvent à la fois empêcher la propagation des tumeurs (macrophages M1) et en même temps, promouvoir leur croissance et leur dissémination (macrophages M2) (Sica et al., 2008).

On trouve également des macrophages M1 et M2 dans le **tissu adipeux** et certaines données suggèrent un « switch » M2 – M1 induit par l'obésité (pour une revue, voir (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011)).

La polarisation des macrophages a également été étudiée par des approches immunohistochimiques au niveau des **lésions athéroscléreuses**, chez l'homme et chez la souris. Nous passerons en revue les données principales de la littérature au paragraphe 1.2.2.3. Mais nous pouvons d'ores et déjà signaler qu'une hétérogénéité des macrophages au niveau des lésions athéroscléreuses est reconnue (pour une revue, voir (Johnson and Newby, 2009)). Chez la souris, Khallou-Laschet et son équipe ont montré sur le modèle de souris ApoE^{-/-}, qui développe spontanément des lésions, la prédominance de macrophages M2 dans les lésions précoces de petite taille et des macrophages M1 dans les lésions plus évoluées [(Khallou-Laschet et al., 2010), (Pello et al., 2011)].

Il semblerait aussi que chez la souris, une autre classe de macrophages existe : les Mox. Le phénotype de ces macrophages est induit par des phospholipides oxydés. Il est lié à une expression plus élevée de gènes sous le contrôle de Nrf2, tels que la hème oxygénase, la sulforédoxine-1 et la thiorédoxine-1 réductase. Cette classe de macrophages n'est pas à négliger puisqu'il semblerait qu'elle représente 30 % des macrophages présents dans les plaques athéroscléreuses avancées chez la souris [(Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011), (Kadl et al., 2010)]. Chez l'homme une classe supplémentaire a également été découverte : il s'agit des HA-mac, des macrophages riches en fer, trouvés dans les plaques athéroscléreuses hémorragiques. Ceux-ci surexpriment CD163, ce qui permet d'augmenter leur capacité à phagocyter le complexe hémoglobine/haptoglobine. Ceci entraîne une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 et ainsi la différenciation des monocytes en macrophages M2, probablement afin de résorber la lésion (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011).

Des macrophages humains exprimant CD68⁺CD14⁺ sont retrouvés au niveau des artères coronaires. Ces macrophages sont caractérisés par une plus grande expression de gènes pro-inflammatoires. Au contraire, les macrophages CD68⁺CD14⁻ sont présents au niveau de régions saines des artères et surexpriment des « gènes impliqués dans le transport réverse du cholestérol et dans l'émigration des macrophages de la paroi sanguine » [(Brocheriou et al., 2011), (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011)]. De même, les macrophages CD68⁺MR⁻ sont des macrophages pro-inflammatoires retrouvés dans le cœur lipidique de la lésion : ils contiennent quelques grandes vésicules lipidiques. Les macrophages M2, CD68⁺MR⁺, chargés de plusieurs vésicules de taille inférieure, sont eux trouvés à la périphérie de la plaque et à ses extrémités [(Bouhlef et al., 2007), (Chinetti-Gbaguidi et al., 2011), (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011)].

Par contre, le rôle des macrophages M2, dits anti-inflammatoires, dans le processus athéroscléreux, n'est pas encore totalement compris. Ils seraient athéro-protecteurs via leur action inhibitrice des réponses pro-inflammatoires et leur rôle dans l'efférocytose des débris cellulaires et des corps apoptotiques. Mais il semblerait qu'ils soient aussi pro-athérogènes à cause de la présence élevée d'IL-4 dans les lésions, probablement produite par les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) ou les cellules NKT (Natural Killer T). En effet,

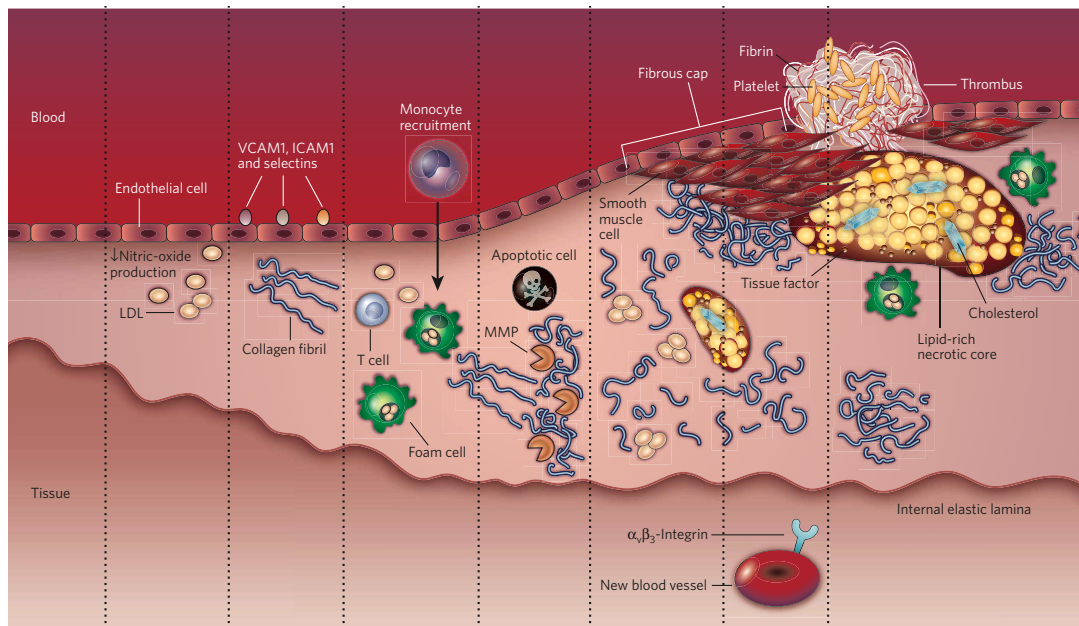


Figure 1.16. Principales étapes de l'évolution d'une lésion athéroscléreuse.

La formation d'une plaque athéroscléreuse commence par une augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale, provoquée entre autres par les perturbations du flux sanguin. Cette perméabilité permet ainsi l'infiltration, dans l'intima de l'artère, des LDLs. Ces LDLs subissent des modifications, qui vont aboutir à l'activation des cellules endothéliales. Celles-ci sécrètent alors des chimokines, qui induisent le recrutement des monocytes. Ces derniers, une fois arrivés dans le tissu, se différencient en macrophages et via l'expression de récepteurs « scavenger », se chargent en LDLs oxydées. Ils deviennent ainsi des macrophages spumeux.

De plus, les cellules musculaires migrent de la média vers l'intima, en présence de chimokines et de facteurs de croissance (tel le PDGF). Elles participent à la formation de la cape fibreuse en synthétisant du collagène ou peuvent également devenir spumeuses.

Le cœur nécrotique est lui formé par l'accumulation de cellules spumeuses et de dépôts de cholestérol extracellulaire. Il semble que les macrophages du cœur nécrotique puissent entrer en apoptose. Ce phénomène, ainsi que la néovascularisation, perturbe la plaque et peut mener à sa rupture. Cette rupture mène à la formation d'un thrombus qui obstrue la lumière artérielle.

(Sanz and Fayad, 2008)

ces macrophages IL-4-dépendants surexpriment CD36, un récepteur « scavenger » responsable de la charge de LDLs oxydées, et donc de la formation de cellules spumeuses. La cytokine IL-4 induit aussi l'expression de métalloprotéinases de matrice, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire [(Martinez et al., 2006), (Mosser and Edwards, 2008), (Pello et al., 2011), (Thorp and Tabas, 2009)].

Les liens entre l'athérosclérose et la polarisation des macrophages seront détaillés dans le chapitre suivant. Le comportement *in vivo* des macrophages polarisés, au niveau des lésions, y sera également décrit.

1.2. Macrophages et athérosclérose

Les macrophages sont un des principaux types cellulaires, avec les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, à être impliqués dans la formation et l'évolution des plaques athéroscléreuses [(Mantovani et al., 2009), (Sanz and Fayad, 2008), (van Tits et al., 2011)].

Etant donné que les LDLs sont impliquées dans la formation des cellules spumeuses et jouent probablement un rôle dans le processus de polarisation des macrophages, il est utile d'expliquer brièvement le processus d'athérogenèse, ainsi que le rôle des lipoprotéines dans l'évolution de la maladie.

1.2.1. L'athérosclérose : contexte général, définition et facteurs de risque

Les maladies cardiovasculaires se trouvent actuellement en première place dans le classement des causes de mortalité dans les pays industrialisés, avant les cancers, les maladies respiratoires chroniques, les accidents de la circulation et le diabète. En effet, environ 29 % des décès annuels mondiaux sont imputés à ces maladies [(Ghosh et al., 2010), (Glass and Witztum, 2001)]. Il semblerait que les maladies cardiovasculaires deviennent aussi une des trois causes de morbidité et mortalité dans les pays en développement d'ici 2020 (Pepine, 2001).

Les maladies cardiovasculaires englobent tant les cardiopathies coronariennes que les accidents vasculaires-cérébraux (AVC), les malformations cardiaques congénitales, les artériopathies périphériques, les thromboses veineuses profondes ou les embolies cardiaques ou pulmonaires (Mackman, 2008).

L'une des causes les plus courantes et principales de ces affections, l'athérosclérose, est de plus en plus étudiée, tant au niveau cellulaire que moléculaire. Elle est décrite comme étant une forme particulière d'artériosclérose, qui correspond à une diminution de l'élasticité artérielle et à son épaissement associés au vieillissement normal de l'artère (Lusis, 2000).

L'athérosclérose est aujourd'hui considérée comme une maladie inflammatoire chronique. Elle affecte principalement les artères de gros et moyen calibres. Son processus de développement (*Fig. 1.16*) jusqu'à l'obtention d'une lésion avancée peut prendre jusqu'à quatre décennies. Cette inflammation se développe à partir de l'interaction observée entre des monocytes différenciés en macrophages, des cellules T, d'autres cellules présentes dans la paroi artérielle et des lipoprotéines modifiées. Ce phénomène inflammatoire, en s'aggravant, mène à la formation de plaques ou lésions athéroscléreuses, appelées « athéromes », qui sont constituées d'un cœur nécrotique. Cette structure est composée de dépôts lipidiques

Facteurs à composante constitutive
Hypertension
Diabète
Insulino-résistance
Obésité
Syndrome métabolique
Hérédité
Sexe mâle
Concentration plasmatique élevée en LDLs et VLDLs
Concentration plasmatique faible en HDLs
Facteurs à composante environnementale
Manque d'exercice
Alimentation riche en graisses
Tabagisme
Agents infectieux

Tableau 1.1. Athérosclérose : facteurs de risque.
Adapté de (Glass and Witztum, 2001).

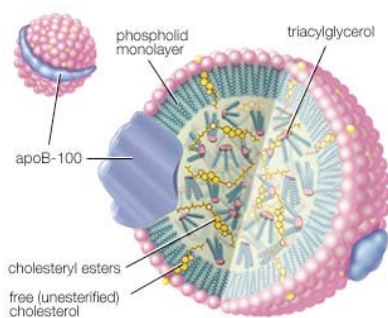


Figure 1.17. Description d'une particule de LDL.

La LDL est structurée par l'apolipoprotéine B-100. Elle est composée d'un centre hydrophobe, lui même constitué de triglycérides et surtout d'esters de cholestérol. Ce coeur est entouré de cholestérol libre et de phospholipides.

(Encyclopedia Britannica, 11/03/2010)

extracellulaires, de macrophages, de cellules spumeuses, mais aussi de cellules dendritiques et est recouverte de cellules musculaires lisses ainsi que d'une matrice enrichie en collagène, appelée la cape fibreuse. [(Glass and Witztum, 2001), (Lusis, 2000), (Navab et al., 1996), (Pepine, 2001), (Wolfs et al., 2011), (Woollard and Geissmann, 2010)].

La lésion se développe au niveau de l'intima, avec d'abord un élargissement compensatoire de l'artère. C'est le remodelage positif. Mais au plus le stade de la plaque devient avancé et plus une sténose luminale se développe, créant ainsi des perturbations dans le flux sanguin (Pepine, 2001). Le processus de formation d'une plaque athéroscléreuse est expliqué dans le point « 1.2.1.2. Le processus athéroscléreux » (*Fig. 1.16*).

Il s'avère que ces lésions ont une tendance particulière à se former au niveau des troncs artériels (ex. : branches ou bifurcations artérielles), à un endroit où le flux sanguin est perturbé en devenant plus lent ou oscillatoire.

Les complications de l'athérosclérose, telles qu'un infarctus du myocarde ou une attaque, sont imputées à la rupture de ces plaques et à la formation d'un thrombus obstructif [(Glass and Witztum, 2001), (Lusis, 2000), (Navab et al., 1996), (Woollard and Geissmann, 2010)]. Ce thrombus a pour conséquence de priver les tissus en aval d'oxygène et de nutriments et ainsi d'entraîner leur nécrose. Ce phénomène conduit le plus souvent à un infarctus du myocarde, qui résulte en réalité d'une thrombose au niveau d'une artère coronaire, ou à un accident vasculaire cérébral, résultant d'une thrombose au niveau d'une artère irriguant le cerveau (Pepine, 2001).

Cette affection est liée à différents facteurs de risque, tant constitutifs qu'environnementaux. Les facteurs de risque constitutifs comprennent l'hypertension, l'obésité, le diabète ou bien le syndrome métabolique par exemple. Tandis que le manque d'exercice, la cigarette ou une alimentation trop riche peuvent être notamment cités comme facteurs de risque environnementaux (*Tableau 1.1*) [(Glass and Witztum, 2001), (Schuett et al., 2009), (Stocker and Keaney, 2004)]. L'athéromatose a une tendance à se développer à partir de l'adolescence, tout en restant asymptomatique et indétectable pendant de nombreuses années, pour la plupart des personnes (Pepine, 2001).

1.2.1.1. Athérosclérose et lipoprotéines

Les lipoprotéines, de part leurs modifications, provoquent une inflammation locale et par la suite, mènent à la formation de lésions athéromateuses. Les lipoprotéines regroupent les chylomicrons, VLDLs (« very low-density lipoproteins »), IDLs (« intermediate-density lipoproteins »), LDLs (« low-density lipoproteins ») et HDLs (« high-density lipoproteins ») (Rader and Daugherty, 2008). Elles ont comme rôle principal de transporter le cholestérol et les triglycérides. En effet, les chylomicrons, composés en majeure partie de triglycérides, transportent les lipides provenant de l'alimentation de l'intestin vers le foie. Tandis que les autres (VLDLs, IDLs et LDLs) ont pour fonction de transporter les lipides endogènes du foie vers les tissus périphériques (Mansbach and Siddiqi, 2010). En effet, les VLDLs, synthétisées par le foie et composées principalement de triglycérides et de cholestérol, véhiculent les acides gras vers le tissu adipeux et les muscles. Au niveau du tissu périphérique, les lipases agissent sur ces VLDLs, celles-ci permettant la récupération des acides gras. Ceux-ci deviennent alors des LDLs, composées majoritairement de cholestérol estérifié (42 %) et munies seulement de l'apolipoprotéine-B100 (Apo-B100) qui assure un maintien de la structure de la particule (*Fig. 1.17*) (Berneis and Krauss, 2002). Elles ont la capacité de transporter le cholestérol aux tissus périphériques et au foie (Glass and Witztum, 2001).

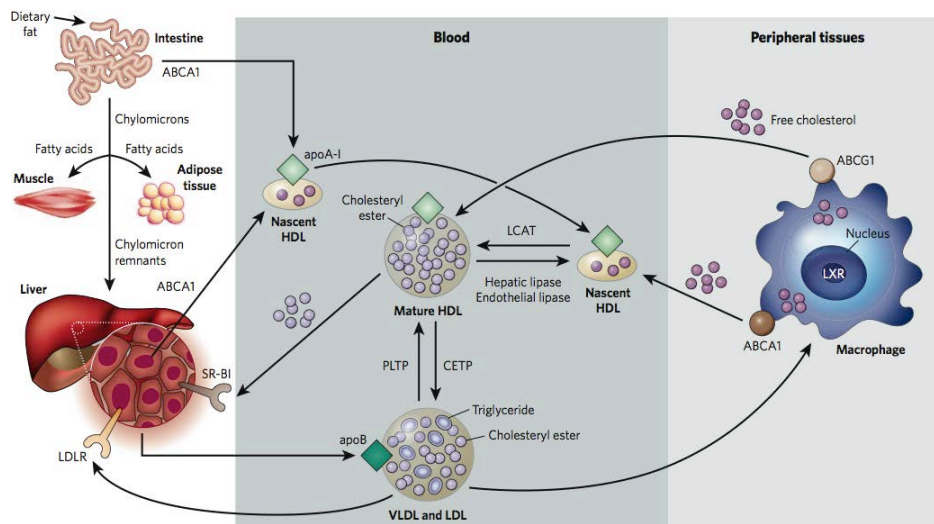


Figure 1.18. Origine et métabolisme des lipoprotéines.

Le cholestérol, ainsi que les triglycérides, proviennent de l'alimentation et donc de la digestion. Ils sont ensuite absorbés au niveau intestinal et transportés sous forme de chylomicrons dans la circulation sanguine.

Une partie de ces chylomicrons est dégradée en acides gras, nécessaires aux muscles et aux tissus adipeux, via la lipoprotéine lipase. Les chylomicrons se transforment progressivement en chylomicrons résiduels captés par le foie. C'est à cet endroit que sont formés les VLDLs (lipoprotéines de très faible densité), dont une partie se transforme en LDLs dans la circulation sanguine. Les LDLs apportent le cholestérol aux tissus périphériques ou sont captées par le foie via les LDL-Rs (récepteurs aux LDLs).

L'excès de cholestérol présent dans les tissus périphériques est prélevé par les HDLs (lipoprotéines de haute densité), formées dans l'intestin et le foie. Cette capture est permise via le transporteur membranaire ABCA1 (« ATP-binding cassette type A1 »). Le cholestérol capturé est estérifié via la LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase) : les HDLs matures sont formées et peuvent également fixer le cholestérol via un autre transporteur, ABCG1 (« ATP-binding cassette type G1 »).

Enfin, les HDLs apportent ce cholestérol au foie via le récepteur SR-BI.

Le cholestérol des HDLs peut également être transféré aux LDLs ou VLDLs via la CETP (« cholesteryl ester transfer protein »).

(Rader and Daugherty, 2008)

L'équilibre de l'organisme est maintenu via l'intervention des HDLs. Ainsi, à l'aide de l'ABCA1 (« ATP-binding cassette de type A1 ») et de la LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase), elles prélèvent le cholestérol présent au niveau des tissus périphériques et l'amènent au niveau du foie où il est métabolisé en sels biliaires. (Glass and Witztum, 2001). Cette récupération du cholestérol tissulaire est connue sous le nom de transport inverse du cholestérol (ou « reverse cholesterol transfert » : RCT) [(Fredenrich and Bayer, 2003; Khera and Rader, 2010)]. En effet, les particules de HDLs sont reconnues par les récepteurs SR-BI (« scavenger » receptor-BI), ce qui permet de les décharger de leur contenu lipidique dans les cellules hépatiques cibles. Les HDLs sont ensuite libérées dans la circulation et peuvent à nouveau prélever le cholestérol accumulé dans les tissus (*Fig. 1.18*) (Fidge, 1999). Les HDLs transfèrent également une grande partie du cholestérol estérifié aux LDLs via la CETP (« cholesteryl ester transfer protein »).

C'est pour cette raison que, chez les humains, la majorité du cholestérol est transportée par les LDLs. Celles-ci sont reconnues, au niveau du domaine N-terminal de l'Apo-B100, par des récepteurs aux LDLs natives (LDL-R), permettant ainsi un processus d'endocytose des LDLs, en particulier au niveau du foie [(Glass and Witztum, 2001), (Goldstein and Brown, 2009), (Innerarity et al., 1990)].

Ces récepteurs reconnaissent également les LDLs ayant subi une modification minimale (mmLDLs), c'est-à-dire qui n'affecte que les lipides. Dès que cette modification ou oxydation devient plus importante, c'est-à-dire que l'Apo-B100 est fragmentée et que les résidus lysine sont modifiés de façon covalente, les LDLs modifiées sont alors reconnues par des récepteurs dits « scavenger » [(Glass and Witztum, 2001), (Steinberg, 2009)].

Cette modification se produit au niveau de l'intima, mais elle pourrait également avoir lieu localement dans le plasma, au niveau de la matrice extracellulaire (MEC) qui retient les particules de LDLs, en surface des cellules endothéliales [(Glass and Witztum, 2001), (Weber and Noels, 2011)].

1.2.1.2. Le processus athéroscléreux : importance d'un contexte inflammatoire et de l'oxydation des LDLs

Le processus inflammatoire de l'athérosclérose commence, tout d'abord, par une augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale. Cette augmentation est entre autres due à des perturbations du flux sanguin ou à une blessure locale. C'est pourquoi les lésions athéroscléreuses ont une tendance à se former au niveau de bifurcations artérielles, ou de zones vasculaires endommagées. La perméabilité croissante de la barrière permet une infiltration plus importante, entre autres, de lipoprotéines. Elles subissent par la suite des modifications après leur entrée dans la paroi artérielle et s'oxydent, devenant plus athérogènes [(Aukrust et al., 2008), (Lusis, 2000), (Sanz and Fayad, 2008)] et capables d'activer l'endothélium. Les cellules endothéliales sécrètent alors des chémokines (ex. : MCP-1 « monocyte chemotactic protein-1 »), des cytokines (ex. : IL-8) et permettent ainsi le recrutement de monocytes. Ceux-ci, via la sécrétion des chémokines, des cytokines ou voire même en partie de part la présence de LDLs oxydées, migrent dans le tissu ciblé en passant par les jonctions endothéliales (*Fig. 1.16*) [(Libby, 2002), (Sanz and Fayad, 2008), (Webb, 2009), (Wolfs et al., 2011)]. Arrivés dans le tissu, ils se différencient en macrophages qui expriment de nombreux récepteurs, dont les récepteurs « scavenger » (ex. : SR-A, CD36). Ces derniers, exprimés également par les cellules musculaires lisses, ont la capacité de reconnaître les LDLs modifiées et plus particulièrement les phospholipides oxydés et la partie protéique

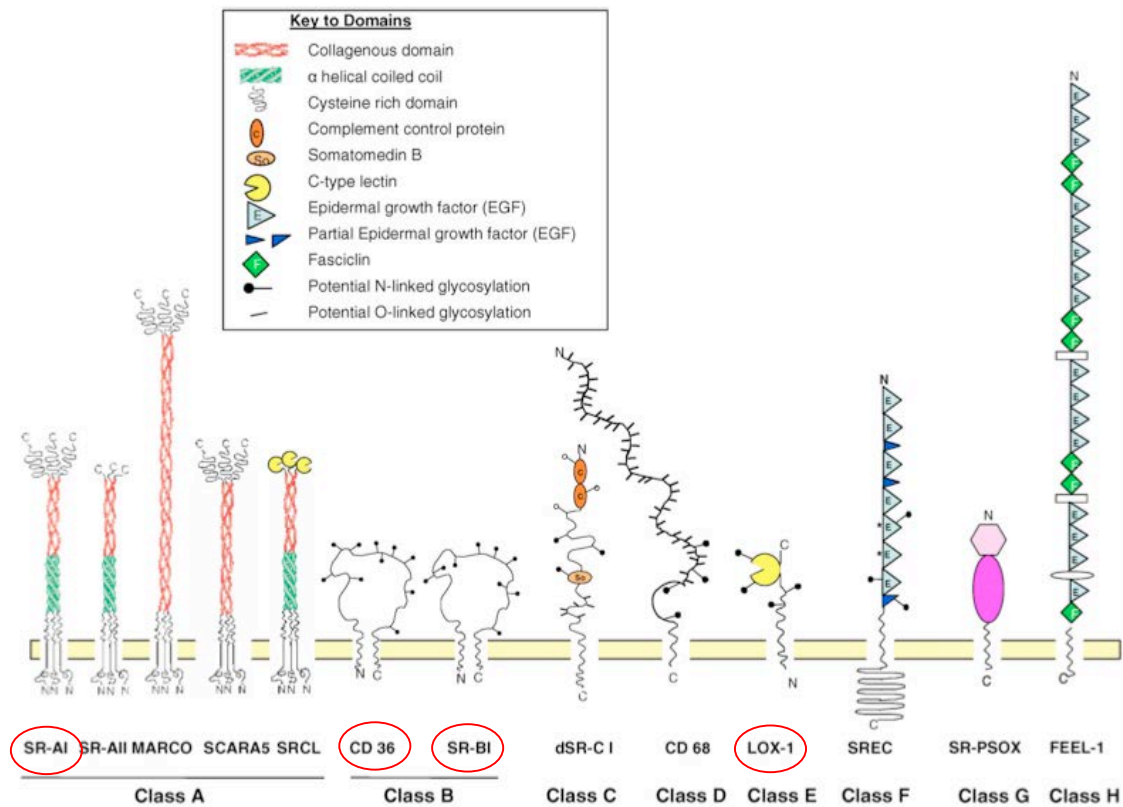


Figure 1.19. Récepteurs “scavenger”.

Les récepteurs “scavenger” sont classés en fonction de leur homologie de structure. Les récepteurs Msr1 (SR-AI), CD36, SR-BI et LOX-1 sont étudiés chez les macrophages M0, M1 et M2 stimulés ou non.

Les domaines sont décrits dans la légende.

Adapté de (Pluddemann et al., 2007)

modifiée de ces LDLs (*Fig. 1.19*) [(Glass and Witztum, 2001), (Lusis, 2000), (Pluddemann et al., 2007)].

Cette capacité de reconnaissance des LDLs a, en premier lieu, pour but d'éliminer les LDLs modifiées aux propriétés pro-inflammatoires ainsi que les corps cellulaires apoptotiques. Mais plus les macrophages accumulent ces particules cytotoxiques, moins leur capacité de résorption est efficace. Les macrophages deviennent des cellules spumeuses s'accumulant dans l'intima, des cellules clés retrouvées dans les lésions athéroscléreuses tant précoces que tardives (*Fig. 1.16*) (Glass and Witztum, 2001). Au premier stade, lorsque la lésion n'est formée que de cellules spumeuses et de cellules inflammatoires, elle est dénommée « strie lipidique » ou « fatty streak » (Pepine, 2001).

Il est intéressant de noter que dans l'athérosclérose, les monocytes jouent un rôle prédominant. Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) pourraient cependant aussi être impliqués. Sans doute trop négligés jusqu'à présent, les PMNs (2 % des leucocytes de la lésion) semblent jouer un rôle dans la phase initiale de formation de la plaque chez la souris : des signaux inflammatoires (sécrétion de protéines granulaires telle l'azurocidine cationique) provenant des neutrophiles ont comme conséquence l'induction du recrutement des monocytes, qui se différencient ensuite en macrophages. Les PMNs sont recrutés au niveau de la plaque via différents stimuli tels que les LDLs modifiées, l'activation du TLR4 ou 6, du récepteur Fc ou de récepteurs aux cytokines (Weber and Noels, 2011).

Les macrophages et les cellules endothéliales ne sont pas les seuls impliqués dans la formation de la lésion. En effet, en présence de chémokines et de facteurs de croissance tels que le PDGF, les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima. Elles participent ainsi à la formation de la cape fibreuse via la synthèse de collagène, mais elles peuvent aussi devenir spumeuses. Les cellules musculaires lisses et macrophages jouent un rôle clef dans la stabilité de la cape fibreuse via la synthèse des constituants de la MEC et de métalloprotéinases. (*Fig. 1.16*) [(Glass and Witztum, 2001), (Libby, 2002), (Lusis, 2000)].

Enfin, les cellules spumeuses entrent en apoptose et en nécrose dans l'intima du vaisseau sanguin. Leur nécrose permet la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, alimentant ainsi les mécanismes d'évolution de la lésion. Les macrophages se déchargent aussi de leur contenu lipidique, formant le cœur nécrotique. Lorsque la lésion est entourée d'une cape fibreuse et que celle-ci devient de plus en plus vulnérable, elle peut se rompre à tout moment. La rupture entraînerait la formation d'un thrombus, qui aurait pour conséquence de diminuer le diamètre de la lumière artérielle ou de l'obstruer complètement (*Fig. 1.16*) [(Glass and Witztum, 2001), (Lusis, 2000), (Sanz and Fayad, 2008)].

1.2.1.3. Mécanismes d'oxydation des LDLs

Afin de comprendre l'oxydation des LDLs, plusieurs protocoles d'oxydation ont été développés *in vitro*. Les modifications subies par les LDLs sont reproduites *in vitro* au sein du laboratoire d'URBC par deux techniques d'oxydation : via l'utilisation de sulfate de cuivre (CuSO₄) et via l'action d'une enzyme appelée myéloperoxydase.

Le sulfate de cuivre a pour propriété d'oxyder, dans un premier temps, les LDLs au niveau de la partie lipidique : cette peroxydation lipidique se répercute au niveau de la partie protéique en l'oxydant à son tour (Boudjeltia K. Z., 2006). L'apoB-100 modifiée n'est ainsi plus reconnue par le LDL-R, mais bien par les récepteurs « scavenger ». Par contre, il est à noter que lorsque seulement la partie lipidique est oxydée, la particule de LDL est appelée mmLDLs (« minimally oxidized LDLs ») et est encore reconnaissable par les LDL-Rs (Miller et al., 2010).

Cependant, l'oxydation via le sulfate de cuivre est aujourd'hui controversée. En effet, la concentration utilisée *in vitro* (10 à 30 μM) est de loin supérieure à celle observée physiologiquement (0,03 μM) (Ziouzenkova et al., 1998).

Plusieurs systèmes pro-oxydatifs, ciblant les LDLs, existent néanmoins dans l'organisme : les NAD(P)H oxydases (source majeure de $\text{O}_2^{\cdot-}$), xanthine oxydases (source d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2), lipoxygénases, la respiration mitochondriale, la eNOS découplée (avec diminution de la production de NO et augmentation de la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$), et la myéloperoxydase (MPO) [(Lau and Baldus, 2006), (Pepine, 2001), (Yoshida and Kisugi, 2010)].

Contrairement à l'oxydation due au cuivre, la myéloperoxydase, système oxydatif choisi au laboratoire d'URBC, de part l'action de ses co-oxydants (ex.: H_2O_2 via la formation de HOCl), oxyde principalement la partie protéique de la lipoprotéine, sans qu'il n'y ait de peroxydation des lipides [(Schindhelm et al., 2009), (Lau and Baldus, 2006)]. La MPO, mais aussi les chloro-tyrosines, résultant de son activité, sont décelées par immunohistochimie au niveau des lésions athéroscléreuses [(Daugherty et al., 1994), (Hazen and Heinecke, 1997), (Moguilovsky et al., 2004)].

Néanmoins, les LDLs oxydées sont également hétérogènes, c'est pourquoi il n'existe pas de protocole d'oxydation universel (Berneis and Krauss, 2002).

Le lieu d'oxydation des LDLs *in vivo* est une question actuellement débattue. En effet, l'oxydation aurait lieu soit au niveau de l'intima (dogme actuel), soit déjà dans le plasma. Pour la première théorie, il semblerait qu'un système oxydatif tel que la myéloperoxydase, une enzyme hémique cationique, sécrétée par les neutrophiles, monocytes et macrophages, soit bien présent dans la subendothéliale. Grâce à son interaction avec les glycosaminoglycans, la MPO est internalisée et se retrouve en présence des LDLs dans les espaces endothéliaux et subendothéliaux via transcytose. Cependant, il est possible que l'oxydation puisse avoir lieu dans le milieu sanguin. Les LDLs seraient piégées au niveau de la barrière endothéliale par les glycosaminoglycans et ensuite oxydées par la myéloperoxydase cationique, libérée par les PMNs circulants. Son caractère cationique lui confère la capacité d'interagir avec les héparanes sulfate-glycosaminoglycans chargés négativement à la surface de l'endothélium. De plus, Carr et son équipe ont montré que la MPO pouvait se lier aux LDLs, tout en conservant son activité catalytique (Carr et al., 2000). Ainsi modifiées, les LDLs seraient recrutées vers le site inflammatoire [(Lau and Baldus, 2006), (Malle et al., 2007), (Miller et al., 2010)].

Dans un cas comme dans l'autre, ces LDLs modifiées au niveau de l'apolipoprotéine-B100 (ou Apo-B100) sont reconnues par des récepteurs « scavenger » non-régulés, favorisant ainsi l'accumulation de cholestérol et de lipides et la formation de cellules spumeuses (Fig. 1.19). Les cellules spumeuses constituent le composant majeur des lésions athéroscléreuses.

1.2.2. Le système des phagocytes mononucléés dans le contexte de l'athérosclérose

1.2.2.1. Recrutement des monocytes dans la lésion athéroscléreuse

Le système des phagocytes mononucléés regroupe les monocytes circulants, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques dérivées des monocytes (Fig. 1.1). Ce système est particulièrement dynamique dans des situations d'inflammation ou d'infection afin de mener au recrutement des monocytes dans le tissu lésé (Lawrence and Natoli, 2011).

Les monocytes entrent dans le tissu, migrent vers le site enflammé de la lésion athéroscléreuse et se différencient en macrophages.

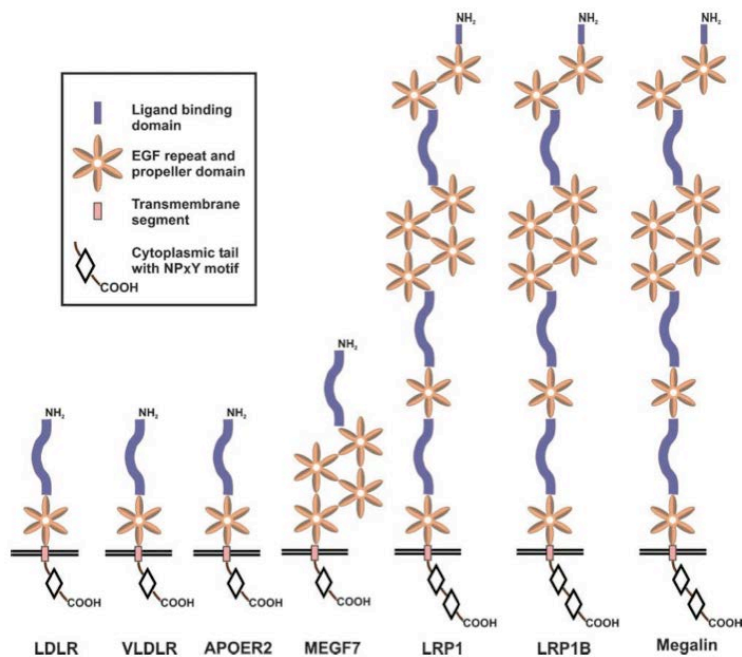


Figure 1.20. Famille du LDL-R.

Chacun des 7 membres de la famille du LDL-R possède un voire plusieurs domaines de liaison au ligand. Ils sont également constitués de domaines d'homologie à l'EGF (« Epidermal Growth Factor »), d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Le motif NPxY de la queue cytoplasmique est impliqué dans l'endocytose et dans le clustering de protéines adaptatrices nécessaires dans les voies de signalisation.

Adapté de (Beffert et al., 2004)

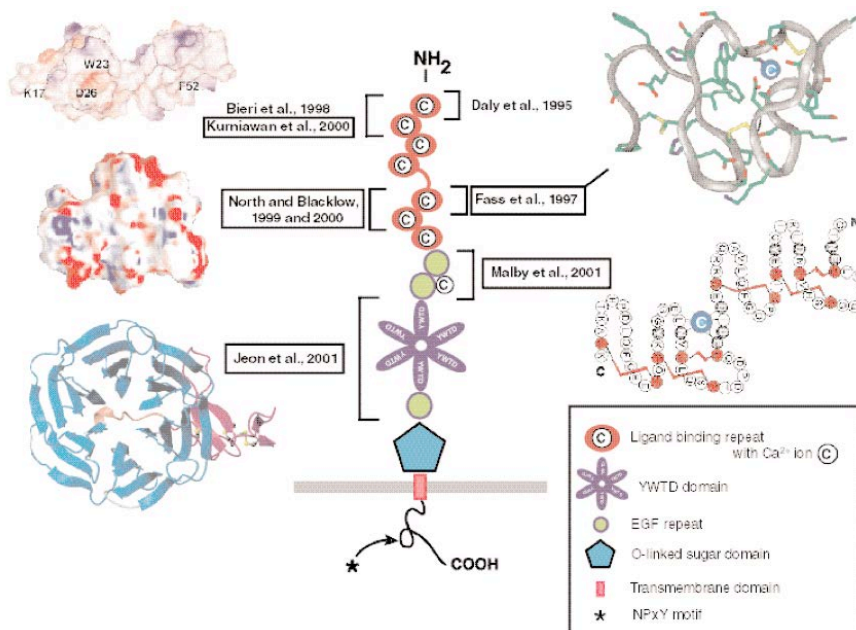


Figure 1.21. Structure du LDL-R.

Le LDL-R est une protéine transmembranaire constituée d'un domaine de liaison au ligand (avec ions Ca^{2+}), d'un domaine EGFP (« Epidermal Growth Factor Precursor »), comprenant deux modules EGF-like, de six répétitions YMTD (domaine « propulseur »), d'un troisième module EGF-like et d'un domaine porteur de sucres O-liés. Sa queue cytoplasmique, contient un motif NPxY, nécessaire pour l'endocytose et le clustering de protéines adaptatrices.

(Herz, 2001)

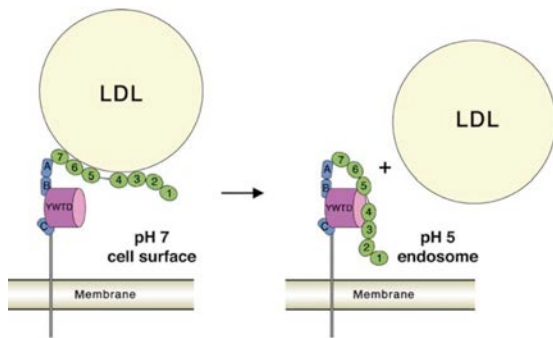


Figure 1.22. Relargage des LDLs en fonction du pH.

Le LDL-R est une protéine transmembranaire, possédant un domaine EGFP (« Epidermal Growth Factor Precursor »), comprenant deux modules EGF-like suivis de six répétitions YMTD (domaine « propulseur ») et d'un troisième module EGF-like, suivi de sept répétitions LA (« LDL-receptor de type A »). Les modules LA 3 à 7 permettent la liaison des LDLs au récepteur. Cependant, le pH plus acide des endosomes entraîne la libération des particules de LDLs: en effet, à pH 5, le récepteur prend une conformation fermée. Les modules LA 4 et 5 interagissent avec le domaine « propulseur », empêchant ainsi la liaison de la lipoprotéine aux modules LA 3 à 7.

(Jeon and Blacklow, 2005)

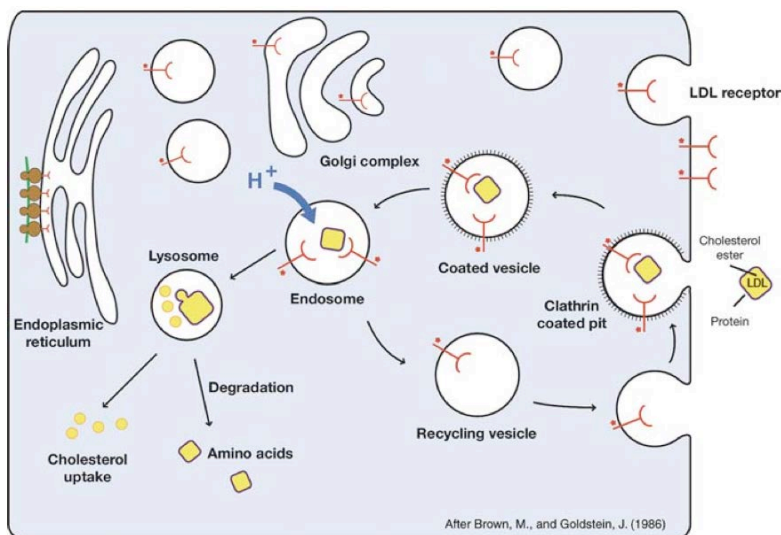


Figure 1.23. Voie d'internalisation et de recyclage du LDL-R et de la particule de LDL.

Le LDL-R est un récepteur capable de reconnaître l'apoE de la β -VLDL, mais surtout, l'apo-B100 des LDLs natives. La reconnaissance est possible grâce aux sept modules LA (« LDL-receptor type A ») : la liaison a lieu lorsque le pH du milieu est neutre. Le complexe LDL-LDL-R est alors internalisé dans une vésicule tapissée de clathrine, qui s'acidifie et devient un endosome. A pH plus acide, le complexe se dissocie à cause de la conformation fermée qu'adopte le récepteur. En effet, les modules LA 4 et 5 interagissent avec le domaine « propulseur », empêchant ainsi la liaison de la lipoprotéine aux modules LA 3 à 7.

Le récepteur retourne en surface cellulaire tandis que les LDLs subissent une dégradation lysosomale et sont recyclées en cholestérol et en acides aminés.

(Jeon and Blacklow, 2005)

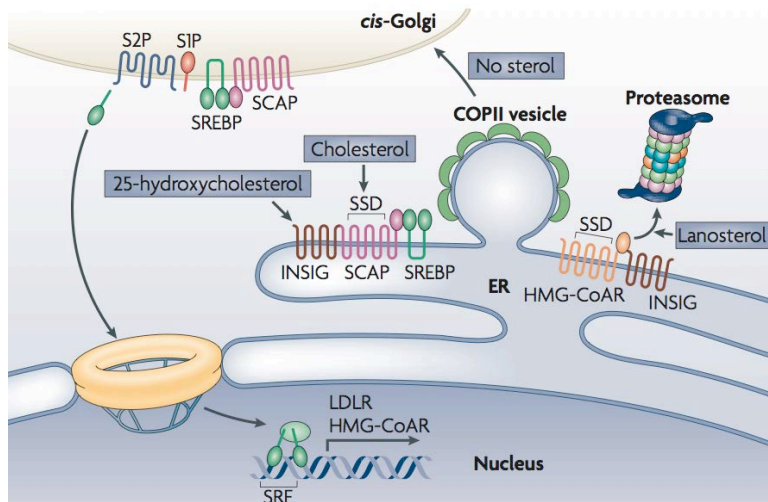


Figure 1.24. Régulation du métabolisme du cholestérol par SREBP.

Lorsque la concentration en cholestérol est suffisante, SREBP (« sterol regulatory element binding protein ») est retenu en membrane du réticulum endoplasmique (RE) par deux protéines chaperones : SCAP (« SREBP cleavage activating protein »), qui permet l'export de SREBP du RE vers le Golgi, et INSIG, qui ancre le complexe en membrane du RE. Lorsque SCAP lie le cholestérol via son SSD (« sterol binding domain ») et INSIG lie le 25-hydroxycholestérol, ces deux protéines forment un complexe, empêchant SCAP d'exporter SREBP.

Par contre, lorsque le cholestérol vient à manquer, SREBP est transporté dans le Golgi, via SCAP, où il sera clivé. Le fragment résultant de la protéolyse est ensuite importé dans le noyau et se lie à la région SRE (« sterol regulatory element »), permettant ainsi l'induction de la transcription des gènes codant pour le LDL-R et la HMG-CoA réductase (enzyme essentielle impliquée dans la synthèse du cholestérol).

En présence de lanostérol, la HMG-CoA réductase est dégradée par le protéasome.

(Ikonen, 2008)

Le processus de recrutement des monocytes a déjà été évoqué dans le point « 1.1.1. Origine et fonctions des macrophages ».

En présence de LDLs modifiées, les macrophages se chargent en lipides et deviennent spumeux.

1.2.2.2. Formation des cellules spumeuses

1.2.2.2.1. Rôle des récepteurs aux LDLs

La formation et la progression des lésions athéroscléreuses sont en majeure partie dues à la présence des macrophages et à leur capacité de transformation en cellules spumeuses via l'internalisation massive de lipoprotéines modifiées. Cette charge en lipides est rendue possible via la reconnaissance, entre autres, d'Ox-LDLs et de Mox-LDLs, par des récepteurs particuliers appelés récepteurs « scavenger » (*Fig. 1.19*), par des transporteurs aux lipoprotéines tels que les transporteurs ATPases, ou par des récepteurs du complément tels que les récepteurs Fcγ.

Par contre, la stimulation avec les LDLs natives, reconnues par le LDL-R, n'induit pas, quant à elles, la formation de cellules spumeuses.

1.2.2.2.1.1. Le récepteur aux LDLs natives (LDL-R)

Le LDL-R (« low-density lipoprotein receptor »), ou récepteur de lipoprotéine de faible densité, a pour rôle physiologique de permettre l'internalisation des lipoprotéines transportant le cholestérol. Il a été découvert, en 1973, grâce aux travaux de Goldstein et Brown portant sur l'hypercholestérolémie familiale (Goldstein and Brown, 1973).

L'expression du LDL-R est ubiquitaire. Son expression est soumise à une régulation contrôlée par la concentration intracellulaire en cholestérol.

Ce récepteur lie les lipoprotéines en surface cellulaire dans un environnement à pH neutre et fait partie de la famille des récepteurs aux LDLs (*Fig. 1.20*). Sept modules LA (« LDL-receptor type A ») permettent la liaison du ligand au récepteur. Tandis que le domaine EGFP (« Epidermal Growth Factor Precursor »), comprenant deux modules EGF-like suivis de six répétitions YMTD (domaine « propulseur ») et d'un troisième module EGF-like, est responsable de la libération de la particule de LDL dans l'endosome (*Fig. 1.21 et 1.22*). Le complexe récepteur-ligand est ensuite endocyté via une vésicule tapissée de clathrine et est délivré aux endosomes (*Fig. 1.23*). Le pH plus acide des endosomes entraîne la libération des particules de LDLs : en effet, à plus faible pH (pH 5), le récepteur passe d'une conformation ouverte à fermée. Les modules LA 4 et 5 interagissent avec le domaine « propulseur », affaiblissant ainsi la liaison de la lipoprotéine aux modules LA 3 à 7 (*Fig. 1.22*) [(Beffert et al., 2004), (Gent and Braakman, 2004), (Herz, 2001), (Jeon and Blacklow, 2005)].

Enfin, le récepteur retourne en surface cellulaire tandis que les LDLs sont dégradées après la fusion avec les lysosomes : le cholestérol est rendu à nouveau disponible pour la cellule, grâce à l'hydrolyse des esters de cholestérol ; il en est de même pour les acides aminés (*Fig. 1.23*).

Cette étape de recyclage du cholestérol est suivie d'une fine régulation des gènes codant le LDL-R, les enzymes de la synthèse du cholestérol et de son estérification, via le facteur SREBP (*Fig. 1.24*) [(Ikonen, 2008), (Toussaint et al, 2003)].

Les LDLs natives n'induisent donc pas la formation de cellules spumeuses, au contraire des LDLs oxydées [(Gent and Braakman, 2004), (Jeon and Blacklow, 2005)].

Class	Scavenger receptor	Ligands	Expression profile	Involvement in CVD?
A	SR-A	AcLDL, OxLDL, β -amyloid, molecular chaperones, ECM, AGE, apoptotic cells, activated B-cell, bacteria	Macrophages, mast, dendritic, endothelial and smooth muscle cells	Yes—involved in OxLDL uptake by macrophages leading to foam cell formation
A	MARCO	AcLDL, OxLDL, apoptotic cells, B cells, bacteria	Macrophages, dendritic cells	No
B	SR-B	HDL, LDL, OxLDL, apoptotic cells	Monocytes/macrophages, hepatocytes and adipocytes	Reduces atherosclerosis through reverse cholesterol transport of HDL
B	CD36	AcLDL, OxLDL, HDL, LDL, VLDL, β -amyloid, AGE, apoptotic cells	Macrophages, platelets, adipocytes, epithelial and endothelial cells	Yes—OxLDL uptake into macrophages leading to foam cell formation
E	LOX-1	OxLDL, molecular chaperones, ECM, AGE, apoptotic cells, activated platelets, bacteria	Endothelial and smooth muscle cells, macrophages, and platelets	Yes—OxLDL uptake in endothelial cells, leads to endothelial dysfunction
F	SRECI/II	AcLDL, OxLDL, molecular chaperones, apoptotic cells	Endothelial cells and macrophages	Low levels of AcLDL uptake
G	SR-PSOX	OxLDL and bacteria	Macrophages, smooth muscle, dendritic, endothelial cells, and B- and T cells.	Yes—involved in OxLDL uptake in macrophages
H	FEEL-I/II	AcLDL, molecular chaperones, ECM, AGE, bacteria	Monocytes/macrophages, endothelial cell	No known link

SR-A: scavenger receptor class A, AcLDL: acetylated low density lipoprotein, OxLDL: oxidised low density lipoprotein, ECM: extracellular matrix, AGE: advanced glycation end products, MARCO: macrophage receptor with collagenous structure, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, VLDL: very low density lipoprotein, LOX-1: lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, FEEL-I/II: fasciclin, epidermal growth factor (EGF)-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1.

Tableau 1.2. Les récepteurs « scavenger », leurs principaux ligands et leurs profils d’expression.
(Stephen et al., 2010)

Lorsque les autres lipoprotéines, et plus précisément lorsque l'apoE (des β -VLDLs) ou l'apo-B100, ont été modifiées, elles ne sont pas reconnues par ce récepteur. C'est donc une autre famille de récepteurs, les récepteurs « scavenger », qui les reconnaît (*Fig. 1.19*).

Au contraire du LDL-R, l'internalisation des LDLs par les récepteurs « scavenger » n'est pas suivie d'une régulation concertée. C'est la raison pour laquelle les macrophages se chargent massivement en lipides et forment des cellules spumeuses [(Gent and Braakman, 2004), (Jeon and Blacklow, 2005)].

1.2.2.2.1.2. Récepteurs « scavenger »

Les macrophages expriment la plupart des récepteurs « scavenger » illustrés à la *figure 1.19*. Nous nous focaliserons sur trois classes principales, les récepteurs de classe A, B et E. Les récepteurs sont également exprimés sur d'autres types cellulaires (Tableau 1.2) et reconnaissent des ligands très diversifiés, dont les lipoprotéines modifiées (ou non), des cellules apoptotiques et des bactéries.

a. Récepteurs « scavenger » de classe A

Les récepteurs SR-AI sont des glycoprotéines membranaires homotrimériques avec 6 domaines distincts : un domaine cytoplasmique N-terminal court, un domaine transmembranaire, une région intermédiaire, un motif en hélices α « coiled coil », un domaine collagène et enfin, un domaine C-terminal riche en cystéine. Ce dernier est absent dans les récepteurs SRA-II [(Greaves and Gordon, 2009), (Moore and Freeman, 2006), (Murphy et al., 2005), (Pluddemann et al., 2007), (Stephen et al., 2010)].

Les récepteurs « scavenger » de classe A (SR-A) (*Fig. 1.19*) sont majoritairement exprimés dans les macrophages, mais aussi au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Ces récepteurs reconnaissent préférentiellement les LDLs acétylées (Ac-LDLs) et ont une affinité plus faible pour les Ox-LDLs (pour une revue, voir (Moore and Freeman, 2006)). Leur expression en ARNm est fortement induite en présence d'Ox-LDLs. Il est intéressant de noter que la présence de TNF α , de TGF β 1, de N-acétylcystéine et d'IFN γ entraîne une diminution de l'expression en ARNm de ces SR-A et ainsi une diminution de la liaison des Ac-LDLs qu'ils reconnaissent (Murphy et al., 2005).

Les SR-A reconnaissent les LDLs modifiées, et plus précisément, les résidus lysine, dérivatisés par des produits spécifiques de la peroxydation lipidique, tels que l'hydroxynonéal (HNE), ou acétylés au niveau de l'ApoB-100.

En plus de ces LDLs modifiées, les SR-A reconnaissent aussi différents types de bactéries et des molécules non-lipoprotéiques chargées négativement (Tableau 1.2) [(Greaves and Gordon, 2009), (Moore and Freeman, 2006), (Murphy et al., 2005), (Pluddemann et al., 2007)].

Un exemple de SR-AI, dont l'expression est étudiée au cours de ce mémoire, est le récepteur Msr1 (Macrophage scavenger receptor-1).

b. Récepteurs « scavenger » de classe B

Le récepteur CD36 (alias Scarb3) (*Fig. 1.19*) est un membre de la famille de récepteurs « scavenger » de classe B. Le récepteur CD36 est une glycoprotéine avec deux domaines transmembranaires dont les extrémités N- et C-terminales sont toutes deux cytoplasmiques. Le domaine central extracellulaire de CD36 contient des ponts disulfures intra-chaînes (Murphy et al., 2005).

Il est à la fois exprimé dans les monocytes, les macrophages, mais aussi au niveau des plaquettes, des cellules endothéliales, des adipocytes, des cellules musculaires lisses et de certains types de cellules épithéliales (Tableau 1.2) (Murphy et al., 2005), (Stephen et al., 2010).

Son expression est augmentée en présence des LDLs modifiées, telles que les Ac-LDLs et Ox-LDLs, mais aussi en présence d'IL-4 ou de M-CSF, mais par contre pas en présence de HDLs, du LPS ou de l'IFN γ (Murphy et al., 2005). Cette augmentation de l'expression de CD36 par les Ox-LDLs ou l'IL-4 est médiée par l'activation du facteur de transcription PPAR γ . CD36 reconnaît les LDLs modifiées et les internalise, ce qui n'est pas le cas pour les LDLs natives.

Au contraire des SR-A, le récepteur CD36 reconnaît surtout les produits d'oxydation des phospholipides (PL) oxydés (ex. : Cu²⁺-oxidized 1-palmitoyl 2-linoleyl phosphatidylcholine) [(Podrez et al., 2002a), (Podrez et al., 2002b), (Podrez et al., 2003), (Rigotti et al., 1995)].

La structure de SR-BI (alias Scarb1) (*Fig. 1.19*) est très similaire à celle de CD36. De plus, ce récepteur est également exprimé dans les monocytes et les macrophages, avec comme différence un haut niveau d'expression dans les tissus adipeux et stéroïdogènes.

De même, cette glycoprotéine a la capacité de lier les Ac-LDLs et les Ox-LDLs. Cependant, elle reconnaît aussi les HDLs natives et son expression est régulée par SREBP1, un important facteur de transcription régulant la synthèse du cholestérol (*Fig. 1.24*).

SR-BI joue un rôle essentiel dans le transport inverse du cholestérol et dans son métabolisme, car il favorise le transfert de cholestérol des cellules aux HDLs et le transport sélectif de ce cholestérol au foie (*Fig. 18*). Ce récepteur a donc une action plutôt anti-athérogénique [(Ikonen, 2008), (Lopez and McLean, 1999), (Pluddemann et al., 2007)].

Ce sont, dans ce cas-ci, les Ox-LDLs, le TNF α , l'IL-1 et le LPS qui induisent une diminution de l'expression de SR-BI au niveau ARNm et donc de la prise d'esters de cholestérol par les HDLs (Murphy et al., 2005).

Tout comme CD36, SR-BI est capable de former des dimères ou des multimères (Pluddemann et al., 2007).

c. Récepteurs « scavenger » de classe E

LOX-1 (« Lectin-like oxidized LDL receptor-1 » alias Olr1 « Oxidized low-density lipoprotein-1 ») (*Fig. 1.19*) est un récepteur de classe E, exprimé dans les cellules endothéliales exclusivement dans les lésions précoces, ainsi que dans les macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes. Cette glycoprotéine membranaire possède un domaine N-terminal cytoplasmique court, un domaine transmembranaire, un domaine « neck » et un domaine C-proximal lectin-like (type C) (Murphy et al., 2005).

Les Ox-LDLs et le TNF α , notamment, ont comme action d'augmenter l'expression de LOX-1 tant au niveau ARNm qu'au niveau protéique et donc d'augmenter la prise d'Ox-LDLs. En d'autres mots, ce récepteur reconnaît majoritairement les Ox-LDLs, mais aussi, entre autres, la protéine pro-inflammatoire CRP (C-reactive protein) et la phosphatidylsérine. De plus, ce récepteur joue un rôle dans l'étape d'adhérence lors du recrutement des monocytes pendant le processus inflammatoire [(Adachi and Tsujimoto, 2006), (Murphy et al., 2006), (Mehta et al., 2006), (Pluddemann et al., 2007), (Taylor et al., 2005)].

1.2.2.2.1.3. Les transporteurs ATPases

Outre les récepteurs « scavenger », il existe d'autres molécules reconnaissant les lipoprotéines, appartenant à la famille des transporteurs « ABC » (ou « ATP-Binding

Cassette »). Ces protéines sont également membranaires (avec un domaine cytoplasmique ABC et un domaine transmembranaire) et ont la capacité de transporter différents substrats à travers les membranes cellulaires, en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs ABC de type A1, G1 ou G4 participent activement à la formation des cellules spumeuses, via le transport des lipides (Lorkowski and Cullen, 2002).

Nous décrirons le type G1 brièvement, puisqu'il sera étudié dans ce mémoire. Ce transporteur est ubiquitaire et comme dit précédemment, il semble impliqué dans le transport cellulaire du cholestérol. Cela est cohérent avec sa présence dans la membrane cellulaire (Lorkowski and Cullen, 2002). Ce transport est soit un processus passif vers le milieu extracellulaire ou soit un processus de transfert du cholestérol aux HDLs natives interagissant en membrane avec SR-BI [(Cavelier et al., 2006), (Yvan-Charvet et al., 2010)].

ABCG4 représente le membre de la famille des ABCG ayant le plus haut degré d'homologie avec ABCG1. Il est hautement exprimé au niveau ARNm dans le cerveau, la moelle osseuse et dans le foie chez la souris. Alors que chez l'homme, il l'est seulement dans le cerveau. Comme dans le cas d'ABCG1, le gène d'ABCG4 est notamment régulé par la présence d'oxystérols. Une déplétion en cholestérol (avec de la cyclodextrine synthétique, accepteur de cholestérol) induit une diminution de son expression, tout comme pour ABCA1 et ABCG1. Même si ce n'a pas encore été prouvé, il est très probable qu'ABCG4 ait un rôle similaire à celui d'ABCG1 [(Lorkowski and Cullen, 2002), (Yoshikawa et al., 2002), (Yvan-Charvet et al., 2010)].

1.2.2.2.1.4. Autres récepteurs aux lipoprotéines : TLR4 et FcγIII

Dans cette reconnaissance des LDLs modifiées, sont également impliqués certains TLRs (« Toll-like receptors ») et plus précisément le TLR4. Les TLRs appartiennent à la grande famille des PRRs (« Pattern Recognition Receptors ») et ont la particularité de reconnaître les PAMPs (« Pathogen-associated molecular patterns ») qu'ils soient exogènes (ex. : LPS) ou endogènes et modifiés (ex. : mmLDLs, Ox-LDLs) [(Miller et al., 2005), (Miller et al., 2009), (Miller et al., 2010)]. Il a été observé qu'une déficience en TLR4 provoque une atténuation du développement du processus athéroscléreux chez des souris ApoE^{-/-} hyperlipidémiques. Ceci résulte probablement d'une diminution du recrutement des macrophages dans les lésions athérogéniques [(Bjorkbacka et al., 2004), (Michelsen et al., 2004)].

Le récepteur FcγIII (Fc γ receptor III alias CD16) intervient, quant à lui, dans l'internalisation des complexes immuns de part la reconnaissance de la région Fc des IgG. Ces complexes immuns peuvent être formés par l'association d'auto-anticorps liés à des LDLs oxydées. Leur internalisation mènera alors à la formation de cellules spumeuses (Lopes-Virella et al., 1997). Il est intéressant de noter que ce récepteur n'est pas exprimé dans les macrophages humains THP-1 (Lopes-Virella et al., 1997).

1.2.2.2.2. Importance des macrophages dans la formation des lésions athéroscléreuses

Les macrophages, sous forme de cellules spumeuses, sont déjà présents dans les lésions précoces, mais ils en constituent, de plus, le type cellulaire principal [(Goldstein et al., 1979), (Gordon, 2007)].

Les cellules spumeuses, au sein des plaques athéroscléreuses naissantes, participent à l'accentuation et à l'amplification de la réponse inflammatoire. En effet, elles induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et de lipides bioactifs tels que la PGE₂ (prostaglandine E₂) ou même des facteurs de croissance tels que le PDGF (« platelet-derived

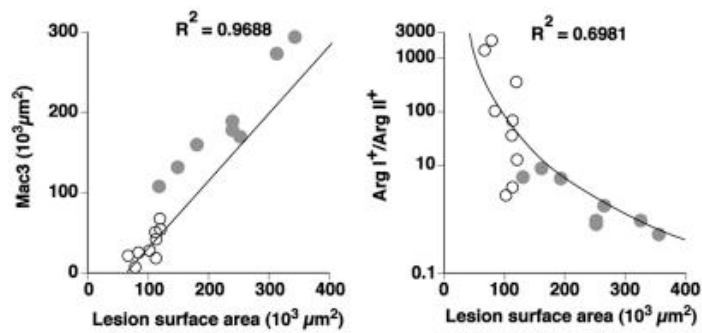


Figure 1.25. Expression de marqueurs M1 et M2 dans les lésions athéroscléreuses de souris ApoE^{-/-} en fonction de l'évolution des lésions.

Dans leur étude, Khallou-Laschet et son équipe ont caractérisé les lésions précoces et avancées et plus particulièrement, le nombre et le phénotype des macrophages dans ces lésions.

Ils ont remarqué que le nombre de macrophages était faible dans les lésions précoces, avec une prédominance de macrophages avec le phénotype M2. Par contre, dans les lésions plus étendues et plus avancées, le nombre de macrophages avait augmenté. De plus, de manière plus intéressante, le phénotype M1 prédominait, suggérant un échange ou « switch » phénotypique de M2 à M1. Afin de déterminer le phénotype des macrophages, l'expression de l'Arg2 (*arginase-2*) fut étudiée en tant que marqueur M1 et celle de l'Arg1 (*arginase-1*) en tant que marqueur M2.

(Khallou-Laschet et al., 2010)

growth factor »). Toutes ces molécules ont comme action de participer à la formation du cœur nécrotique de la lésion mais aussi de produire et de renforcer la cape fibreuse de la plaque avec l'aide des cellules musculaires lisses. Cependant, lorsque ces dernières produisent un excès de métalloprotéases, cela mène à un affaiblissement de la plaque, ce qui accroît le risque de rupture de la lésion. (Goldstein et al., 1979).

In vitro, les cellules spumeuses se forment via l'incubation des macrophages avec des LDLs modifiées. Dans ce travail, ce sont les macrophages murins de la lignée RAW 264.7 qui ont été utilisés. Par contre, les LDLs natives ne sont pas capables d'induire une accumulation persistante de cholestérol dans les macrophages [(Goldstein et al., 1979), (Thèse de D. Calay, 2011)].

De manière intéressante, il semblerait que les modifications oxydatives des LDLs *in vivo* soient également dues à l'interaction de ces lipoprotéines, « piégées au niveau de l'espace sous-endothélial, avec des cellules vasculaires résidentes telles que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les macrophages » (Stocker and Kearney, 2004).

1.2.2.3. Polarisation des macrophages dans la lésion

1.2.2.3.1. Comportement des macrophages M1 et M2 *in vivo*

A nouveau, peu de littérature concernant la polarisation des macrophages dans un contexte *in vivo* est disponible. Khallou-Laschet et son équipe ont étudié la polarisation des macrophages dans les lésions de souris ApoE^{-/-}. Ce modèle murin est le modèle le plus courant dans la recherche *in vivo* en athérosclérose : il s'agit de souris hypercholestérolémiques en régime normal, déficientes pour l'apolipoprotéine E. Cette glycoprotéine, riche en arginine, est un constituant des chylomicrons, VLDLs et HDLs. Elle se révèle nécessaire dans le transport et le métabolisme des lipides et est importante de part ses propriétés anti-oxydantes. [(Davignon et al., 1999), (Khallou-Laschet et al., 2010), (Woollard and Geissmann, 2010)]. L'invalidation de l'ApoE empêche la capture des lipoprotéines par le foie et entraîne une augmentation drastique des taux plasmatiques en VLDLs. Il faut savoir que chez la souris, les taux de LDLs restent faibles.

Sur ce modèle de souris, Khallou-Laschet et al (2010) ont observé l'évolution des plaques athéroscléreuses. Au sein de celles-ci, ils ont à la fois dénombré les macrophages présents, mais ont aussi caractérisé le phénotype de ces macrophages. Les résultats obtenus sont interpellants : dans les plaques précoces, le nombre de macrophages est faible, tout en affichant un phénotype anti-inflammatoire (M2) (cellules Arg1⁺). Plus la plaque évolue et s'étend, plus le nombre de macrophages augmente, mais surtout le phénotype de ces macrophages devient de manière prédominante le phénotype pro-inflammatoire (M1) (cellules Arg2⁺) (Fig. 1.25) (Khallou-Laschet et al., 2010).

Ce changement de phénotype, et donc de fonctions des macrophages, n'est aujourd'hui pas entièrement compris. Il serait probablement dû à un changement des cytokines présentes dans le microenvironnement, hypothétiquement sécrétées par d'autres cellules immunes présentes dans la lésion [(Khallou-Laschet et al., 2010), (Feig et al., 2011), (Wolfs et al., 2011)]. D'après Wolfs et al (2011), la présence de M-CSF (« Macrophage-Colony Stimulating Factor ») et de GM-CSF (« Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor ») pourrait être un facteur à prendre en considération. En effet, l'expression de M-CSF est constitutive et induit un phénotype M2 chez les macrophages, au contraire du GM-CSF. Ce dernier est présent de manière importante seulement au niveau des lésions athéroscléreuses. Il s'avère

que plus la plaque s'étend, et plus la production de M-CSF et de GM-CSF augmente à cause de stimuli inflammatoires ou des Ox-LDLs. Le ratio entre ces deux facteurs est ainsi compromis et entraînerait l'induction d'un phénotype M1 chez les macrophages (Wolfs et al., 2011). Ce raisonnement pourrait expliquer les observations de l'équipe de Khallou-Laschet. De même les travaux de l'équipe de Fisher semblent corroborer ces affirmations. Les auteurs utilisent les souris Reversa (Lieu et al., 2003). Il s'agit de souris *LDL-R^{-/-} ApoB^{100/100}*, croisées avec des souris homozygotes pour un allèle conditionnel de *Mttp* (codant pour « Microsomal triglyceride transfer protein ») et le transgène inducible *Mx1-Cre*. Les souris *LDL-R^{-/-} ApoB^{100/100}* (invalidées pour le *LDL-R* et qui n'expriment que l'Apo-B100, et pas l'Apo-B48) font des lésions athéromateuses sévères, avec des taux plasmatiques élevés en LDLs, ce qui n'est pas le cas des souris *ApoE^{-/-}*. Croisées avec les souris *Mttp^{fl/fl} Mx1-Cre^{+/+}* et traitées avec du pIpC (« polyinosinic-polycitidylic ribonucleic acid »), *Mttp* n'est plus exprimé et la sécrétion hépatique des lipoprotéines est abolie, ce qui conduit à corriger l'hypercholestérolémie et à faire régresser les lésions (Feig et al., 2011). Feig et al (2011) observent également que les macrophages M2 deviennent prédominants dans les lésions en voie de régression (Feig et al., 2011).

La difficulté de ce type d'étude est notamment liée à la complexité et à l'hétérogénéité du microenvironnement dans les plaques athéroscléreuses. En effet, il comprend, à la fois, des inducteurs des macrophages M1 et M2, ainsi que d'autres facteurs capables de modifier ces phénotypes. De ce fait, d'autres macrophages, aux phénotypes intermédiaires voire même radicalement différents, sont détectés dans ces lésions (Wolfs et al., 2011).

1.2.2.4. LDLs et polarisation des macrophages

Peu de données sont disponibles dans la littérature scientifique en ce qui concerne l'interférence des LDLs dans le processus de polarisation des macrophages.

Les recherches de Marathe, Ghisletti et Joseph ont, séparément, conduit à la constatation que les Ox-LDLs semblent induire un phénotype M2 chez les macrophages. L'internalisation d'Ox-LDLs, par les macrophages, mène, en effet, à une augmentation de la concentration en oxystérols. Ceux-ci, en se liant aux LXRs (Liver X Receptors) les activent, via un mécanisme encore inexpliqué, et ainsi promeuvent des actions anti-inflammatoires que sont : « l' induction de l'efflux de cholestérol, l'inhibition de NF-κB, la répression de la production de cytokines pro-inflammatoires, de chémokines (ex. : CCL2) et de l'iNOS » [(Ghisletti et al., 2007), (Joseph et al., 2003), pour une revue, voir (Mantovani et al., 2009), (Marathe et al., 2006)].

van Tits a lui aussi observé que des macrophages, en présence d'Ox-LDLs, affichent un phénotype anti-inflammatoire. Selon l'auteur, ce phénotype semble pertinent puisque les cellules M2 sont des macrophages exprimant un haut niveau de récepteurs de type « scavenger ». Ils seraient ainsi plus aptes à internaliser les Ox-LDLs. Et une plus haute expression de récepteurs « scavenger » peut alors être associée à une plus grande capacité à former des cellules spumeuses. Cependant, van Tits précise que la « possible capacité à accumuler des LDLs oxydées par le cuivre n'a pas encore été étudiée chez les macrophages M1 et M2 » (van Tits et al., 2011).

Groeneweg et son équipe montrent, quant à eux, que des macrophages murins dérivés de précurseurs de la moelle osseuse traités préalablement avec des Ox-LDLs présentent une réponse inflammatoire plus marquée en présence de LPS [(Groeneweg et al., 2006), (van Tits et al., 2011)]. Cependant, cette constatation n'exclut pas la possibilité d'une induction vers un

phénotype M2 par les Ox-LDLs. Une hypothèse à vérifier serait qu'en réponse au LPS, les macrophages M2 modifieraient leur expression génique pour surexprimer des gènes pro-inflammatoires, menant les cellules vers un phénotype M1. Ces cellules phagocytaires seraient alors plus aptes au processus d'endocytose, sachant que le LPS est un stimulus bactérien.

L'étude de l'impact des Mox-LDLs sur le phénotype des macrophages n'a pas été encore, à ce jour, publié.

Il est donc avéré et prouvé que les macrophages sont impliqués dès les premiers stades de la maladie. Ils jouent, à la fois, un rôle de résolution via l'expression de gènes anti-inflammatoires (M2) permettant la résorption de la lésion, et un rôle d'amplification de la maladie via l'expression de gènes pro-inflammatoires (M1). Mais le rôle éventuel que les lipoprotéines, et en particulier les LDLs modifiées, pourraient jouer dans la polarisation, reste largement méconnu, ainsi que l'effet de la polarisation sur la capacité à former des cellules spumeuses.

1.3. Objectifs du mémoire

Ce mémoire s'inscrit dans la continuation de la thèse de Damien Calay qui a notamment étudié les effets de LDLs modifiées sur les macrophages murins RAW 264.7, capables de former des cellules spumeuses en leur présence. Dans ce travail, des macrophages M0 avaient été étudiés. De plus, deux types de LDLs modifiées avaient été évaluées, les LDLs oxydées au CuSO_4 (Ox-LDLs) (modèle classique, peu pertinent) et les LDLs oxydées avec de la myéloperoxydase (Mox-LDLs) (plus pertinentes). Calay et al (2010) observaient une plus forte accumulation des lipides intracellulaires après exposition aux Mox-LDLs.

Les macrophages RAW constituent un modèle d'étude robuste. Ils sont utilisés notamment dans l'étude de l'athérosclérose (Calay et al., 2010) et d'infections bactériennes telles que *Brucella* (Cha et al., 2011). Ce modèle est de plus très commode pour la culture cellulaire. La validation des résultats se fait ensuite le plus souvent sur des monocytes sanguins humains différenciés en macrophages à l'aide de M-CSF. Or, jusque maintenant, aucun article parlant de l'impact des LDLs sur le phénotype des macrophages RAW 264.7 n'a été trouvé.

Au vu du nombre croissant de publications concernant la polarisation M1 et M2 des macrophages, nous avons voulu étudier *in vitro* les effets des LDLs natives ou modifiées sur des macrophages M1 et M2, dans le cadre de l'athérosclérose.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis au point un protocole de polarisation M1/M2, des macrophages de la lignée RAW 264.7, afin qu'il soit correct et reproductible. Nous avons tout d'abord commencé par sélectionner un « housekeeping gene » invariant aux stimuli de polarisation, ainsi qu'une concentration en LPS qui soit tout à la fois un compromis entre une bonne induction des marqueurs géniques M1 et une cytotoxicité réduite pour les macrophages. Nous avons enfin étudié l'expression de marqueurs géniques M1 et M2, aux niveaux ARNm (qRT-PCR) et protéique (cytométrie de flux et ELISA), dans des macrophages M0 (contrôles), M1 (pro-inflammatoires) et M2 (anti-inflammatoires).

Dans la deuxième partie du mémoire, nous avons poursuivi ce travail en étudiant l'impact des LDLs oxydées au CuSO_4 ou à la myéloperoxydase sur le phénotype des macrophages RAW polarisés. Nous avons, pour ce faire, étudié l'expression des marqueurs géniques M1 et M2, aux niveaux ARNm et protéique, dans des macrophages polarisés et stimulés avec des

Nat-LDLs, des Ox-LDLs et des Mox-LDLs. Nous avons également suivi l'expression de quelques récepteurs « scavenger » et de transporteurs aux lipoprotéines, puisque ceux-ci sont impliqués dans la formation des cellules spumeuses.

Ces données ont été complétées par un marquage des lipides internalisés dans les macrophages spumeux, polarisés ou non, à l'Oil Red O et au Bodipy. Ces cellules spumeuses ont aussi été observées au microscope holographique digital.

L'objectif général de ce mémoire est donc de valider un protocole de polarisation M1/M2 sur des macrophages murins RAW 264.7, d'étudier l'impact des LDLs oxydées sur les cellules polarisées et de voir dans quelle mesure les macrophages polarisés conservent leur capacité de former des cellules spumeuses, tout en discriminant les Ox- et les Mox-LDLs.

MATERIELS ET METHODES

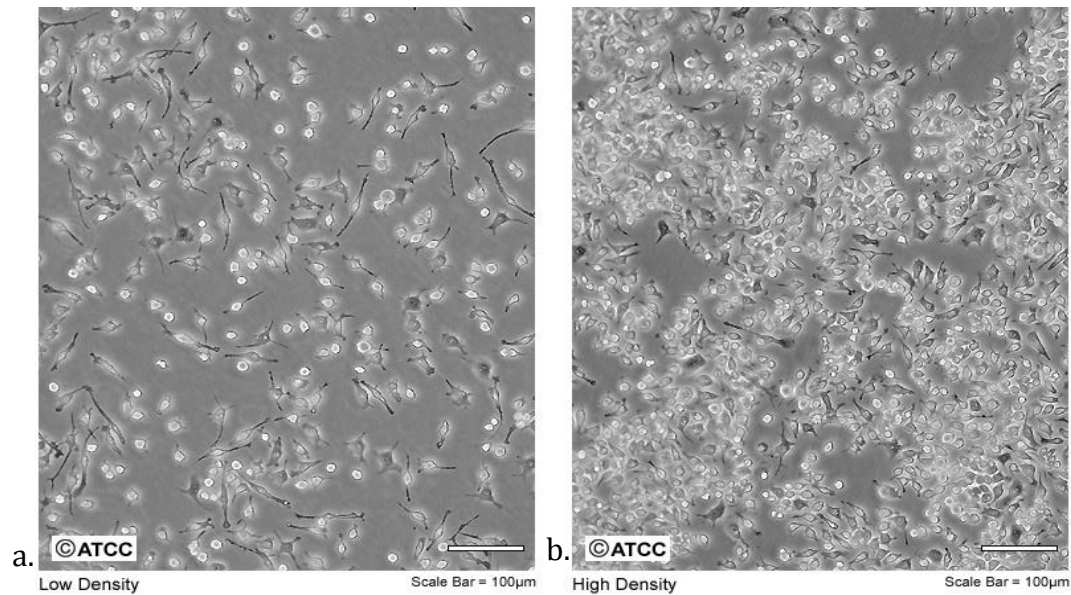


Figure 2.1. : Macrophages murins RAW 264.7

Macrophages de la lignée RAW 264.7 lorsqu'ils sont en culture dans du milieu DHG-L1 + 10 % HIS, à faible densité (a) et en culture à forte densité (b).

(« American Type Culture Collection » (Manassas, USA))

Tableau 2.1. : Réactifs et matériels nécessaires pour le repiquage de cellules de la lignée RAW 264.7

Milieu de culture	- Milieu DHG-L1 (Dulbecco High Glucose) (Gibco, UK) contenant 1,5 g/l de NaHCO_3 + 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco, UK) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes ou + 1 % de ce sérum avant stimulation avec les LDLs
Boîtes de culture	Boîtes de culture de 75 cm ² (T75) (Corning, USA) ou de 25 cm ² (T25)
Grattoirs	Grattoirs 24 cm (TPP, Switzerland)

Tableau 2.2. : Test de cytotoxicité : mesure de relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) via le « Cytotoxicity Detection Kit » (ROCHE)

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaques 24 puits (Corning, USA) à une densité de 1×10^6 par T25
Rinçage	PBS non stérile (0,9 % NaCl (Merck, Germany), KH_2PO_4 10 mM (Merck, Germany) à pH = 7,4)
Kit de détection	Kit ROCHE (Roche Applied Science, Switzerland) placé à -20°C : la bouteille n°1 est reconstituée avec 1 ml d'eau distillée ; la bouteille n°2 est dégelée et placée à 4°C
Matériel supplémentaire	- PBS-Triton X-100 10 % (Merck, Germany) - Microtubes (Eppendorf, Germany) - Multichannel (Labosystems-Thermo Fisher Scientific, USA) - Plaque 96 puits (Corning, USA) - Lecteur de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA) - Centrifugeuse (Eppendorf Centrifuge 5415R, Germany)

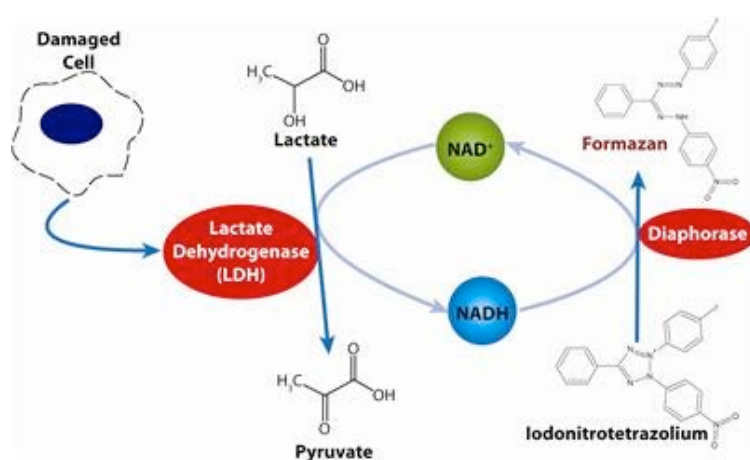


Figure 2.2. : Relargage de la lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH, relarguée par la cellule endommagée, permet en présence de NAD^+ , la conversion du lactate en pyruvate. Cette réaction permet la formation de NADH qui joue le rôle de cofacteur pour l'enzyme diaphorase, catalysant la réduction des sels de tétrazolium en formazan. L'absorbance de ce dernier est lue et permet de déterminer ainsi l'activité de la LDH.

(CytoScanTM LDH Cytotoxicity assay)

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Type cellulaire utilisé

Le modèle cellulaire utilisé au cours de ce mémoire est la lignée de macrophages RAW 264.7. Celle-ci a été obtenue via la transformation de monocytes de souris BALB/c par le virus de la leucémie murine d'Abelson (A-MuLV) (Hsueh et Roach, 2008).

Elle provient de l'ATCC ou « American Type Culture Collection » (Manassas, USA) (Fig. 2.1).

2.1.2. Repiquage des cellules de la lignée RAW 264.7

2.1.2.1. Réactifs et matériels (tableau 2.1)

2.1.2.2. Méthode

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées dans du milieu DHG-L1 (Dulbecco's modified Eagle's medium + High Glucose (4,5 g/l) et NaHCO_3 (1,5 g/l)) contenant 10 % de sérum inactivé HIS (« Heat-Inactivated fetal calf Serum ») (Gibco BRL, USA) (Calay et al., 2010). Ces cellules sont cultivées en boîtes de culture T75 (Corning, USA) et placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO_2 .

Elles sont réensemencées tous les deux jours à une dilution de 1/10 en semaine (densité initiale : 3×10^6 cellules par T75) et à une dilution de 1/20 pour le week-end (densité initiale : $1,5 \times 10^6$ cellules par T75). Le réensemencement des cellules est arrêté dès 20 passages puisqu'il semble qu'au delà, les macrophages ne répondent plus aux stimuli oxydatifs de la même manière (Thèse de D. Calay, 2011).

2.2. Détermination de la cytotoxicité due au LPS

2.2.1. Test LDH (« Cytotoxicity Detection Kit » de ROCHE)

2.2.1.1. Principe

La cytotoxicité due au LPS a tout d'abord été évaluée. Ainsi, un test LDH (lactate déshydrogénase) a été réalisé afin d'optimiser la concentration en LPS. Ce test est un dosage colorimétrique qui a pour but de mesurer l'activité de l'enzyme cytoplasmique lactate déshydrogénase libérée dans le milieu extracellulaire lorsque la membrane plasmique est altérée.

Le principe de ce test est relativement simple : trois fractions (cellules adhérentes, cellules détachées et corps apoptotiques, surnageants) sont obtenues pour chacune des conditions de culture. A chacune de ces fractions est ajouté un mélange réactionnel contenant du lactate, du NAD^+ , des sels de tétrazolium et une enzyme catalysant la conversion des sels en formazan en présence de $\text{NADH} + \text{H}^+$, la diaphorase. C'est grâce à la présence de la LDH que le $\text{NADH} + \text{H}^+$ est formé, par oxydation du lactate en pyruvate, et que le formazan peut être produit (Figure 2.2). Son absorbance est alors mesurée dans chacune des fractions. Elle permet ainsi de déterminer l'activité de la LDH.

2.2.1.2. Réactifs et matériels (tableau 2.2.)

2.2.1.3. Méthode

Les cellules RAW (1×10^6 cellules/4 ml) ont été traitées avec un mélange de LPS (0,1, 1, 10, 50 et 100 ng/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et d'IFN γ (20 ng/ml) (R&D Systems,

Tableau 2.3. : Test de viabilité cellulaire: test MTT

Matériel cellulaire	- Cellules repiquées en plaques 24 puits (Costar, USA) à une densité de 75 000 par puits - Cellules M1 polarisées par ajout de LPS (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et de IFNγ (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) - Cellules M2 polarisées par ajout de IL-4 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et IL-13 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA)
Solution de coloration	- MTT (« 3-[4,4-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ») (2,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA)
Solution de lyse	- Solution de lyse : SDS (« Sodium Dodecyl Sulfate ») 30 % (2 volumes) (MP Biochemicals, LLC, USA) et N,N-diméthyl-formamide (1 volume) (Sigma-Aldrich Life Science, USA), pH 4,7
Matériel supplémentaire	- Plaque 24 puits (Corning, USA) - Lecteur de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA)

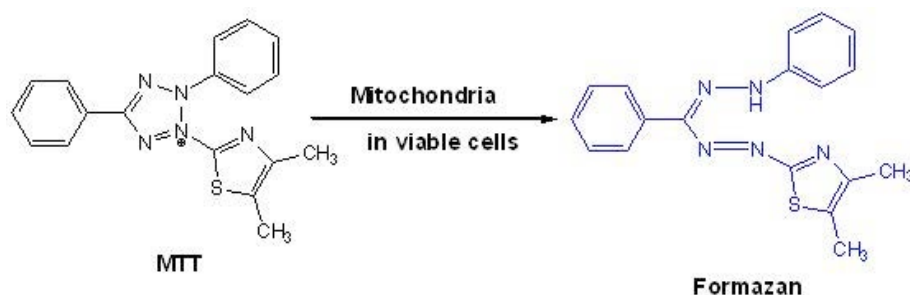


Figure 2.3. : Test de viabilité cellulaire (MTT)

Les réductases cellulaires catalysent la réaction permettant la conversion du MTT en dérivé formazan. L'absorbance de ce dernier est mesurée à 570 nm et permet d'établir une corrélation avec la viabilité cellulaire.

(MCLAB : Colorimetric cell proliferation assay kit (MTT assay)).

USA), ainsi qu'il l'est décrit dans la littérature [(Hirose et al., 2011), (Lopez-Castejon et al., 2010)]. Elles sont ensuite transférées dans des plaques 24 puits (Corning, USA) et incubées pendant 18 ou 24 heures. L'activité LDH dans les surnageants est finalement déterminée.

Le milieu de culture de chaque condition est récolté et transféré dans des microtubes légendés « culture medium » (C) placés sur glace. 250 µl de PBS-Triton X-100 10 % sont ajoutés sur les cellules adhérentes aux puits : ces cellules subissent donc une lyse, à température ambiante (RT). Au bout de 10 minutes, les cellules lysées sont transférées dans des microtubes légendés « lysats » (L). Ces tubes sont ensuite centrifugés à 2000 rpm pendant 5 minutes.

Les surnageants obtenus sont alors placés dans des microtubes légendés « surnageants » (S), tandis que les culots sont resuspendus dans 250 µl de PBS-Triton X-100 10 % (L). Cette dernière fraction, la fraction « lysats », est diluée 50x pour l'étape suivante.

Les puits d'une plaque 96 puits sont remplis avec 100 µl de chacune de ces fractions.

Le blanc « surnageants » est constitué de 100 µl de milieu DHG-L1 + 10 % HIS seul, alors que les blancs « culots » et « lysats » sont constitués de 100 µl de PBS-Triton X-100 10 %.

100 µl de réactif, préparé à partir de 222 µl de solution 1 et de 10 ml de solution 2, sont ajoutés par puits.

La plaque 96 puits est conservée à l'abri de la lumière, à température ambiante, et l'absorbance des fractions est lue à 500 nm via un lecteur de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA).

Enfin, le pourcentage de cytotoxicité est calculé via la formule mathématique :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{100 * (C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4)}{(C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4 + ((L\text{-blc}) * 20))}$$

Afin de valider les résultats obtenus avec le test LDH, nous avons également utilisé le test MTT (Bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium) (Sigma-Aldrich Life Science, USA).

2.2.2. Test MTT

2.2.2.1. Principe

Les cellules viables, c'est-à-dire métaboliquement actives, ont la capacité d'incorporer le MTT et de le cliver en formazan, dont l'absorbance est mesurée. Cette réaction est catalysée par des réductases cellulaires (*Figure 2.3*). Une corrélation entre la production de formazan et la viabilité cellulaire peut ainsi être établie.

2.2.2.2. Réactifs et matériels (tableau 2.3.)

2.2.2.3. Méthode

Les cellules RAW (75 000 cellules/puits) sont traitées ou non avec un mélange de LPS (0,1, 1, 10, 50 et 100 ng/ml) et d'IFNγ (20 ng/ml) ou avec un mélange d'IL-4 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et d'IL-13 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA), dans 1 ml de DHG-L1 + 10 % HIS dans des plaques 24 puits (Corning, USA). Après 18 heures de polarisation, 500 µl de milieu de culture sont enlevés et remplacés par 500 µl de solution de coloration dans lequel les cellules sont mises à incuber pour 2 heures et demi, à 37°C et dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Ce temps d'incubation est nécessaire afin que les cellules incorporent le MTT et le clivent en dérivé formazan. Après 3 heures, la solution est enlevée et remplacée par 1 ml de solution de lyse, qui lyse les cellules et solubilise les cristaux de formazan. Une

Tableau 2.4. : Réactifs et matériels nécessaires pour la polarisation M1/M2 des macrophages RAW 264.7

Milieu de culture	- Milieu DHG-L1 + 10 % HIS (Heat-inactivated serum)
Matériel cellulaire	- Cellules M1 polarisées par ajout de LPS (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et de IFN γ (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) - Cellules M2 polarisées par ajout d'IL-4 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et IL-13 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA)
Boîtes de culture ou plaque multi-puits	- T25 (25 cm ²) (Corning, USA) : cellules repiquées à 1x10 ⁶ cellules par T25 - Plaque 6 puits (Corning, USA) : cellules repiquées à 375 000 cellules par puits

Tableau 2.5. : Réactifs et matériels nécessaires pour l'étude de l'expression génique (ARNm) en real-time RT-PCR

Extraction d'ARNm	- Kit RNeasy Mini kit : Buffer RLT, RPE, RW1, H ₂ O RNase Free, Colonnes (RNeasy Mini Spin Columns), tubes de 1,5 ml et 2 ml (QIAGEN, Germany) - Paillasse RNase Free - SDS 1 % (MP Biomedicals, France) - H ₂ O RNase Free - Microtubes RNase Free (Eppendorf, Germany) - Tips RNase Free (One Touch Tips) (Sorenson Bioscience Inc, USA) - Grattoirs 13 cm (SPL Life Sciences, Korea) - PBS RNase Free (stérile, sans Ca ²⁺ ni Mg ²⁺) (Lonza, Switzerland) - Cellules repiquées en T25 (Corning, USA) à une densité de 1 x 10 ⁶ cellules/T25, 25 heures avant extraction
RT (rétro-transcription)	- Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (ROCHE, Switzerland) : Primer oligo (dT), Reverse Transcriptase (1), Buffer RT 5 x (2), Protector RNase Inhibitor (3), dNTP mix (4). Par tube de mix réactionnel : 4 μ l (2), 2 μ l (4), 0,5 μ l (1) et 0,5 μ l (3). - H ₂ O RNase Free
RT-PCR quantitative	- Master mix SyBr Green PCR (Applied Biosystems, USA) - Amorces sens et antisens (voir <i>Fig. 2.4.b/c</i>) - H ₂ O RNase Free - Tips RNase Free - Plaque 96 puits (« 96 well optical reaction plate ») (Applied Biosystems, USA) - Logiciel 7000 SDS (« Sequence Detection System ») (Applied Biosystems, USA) - Centrifugeuse (Centra CL3R, Thermo IEC, USA)

heure après cela, la viabilité des cellules est mesurée en lisant la D.O. (densité optique) à 570 nm, en utilisant un lecteur de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA).

2.3. Polarisation M1/M2 des macrophages RAW 264.7

2.3.1. Réactifs et matériels (tableau 2.4.)

2.3.2. Méthode

Afin de polariser les macrophages en cellules M1 et M2, les macrophages RAW 264.7, dits M0, sontensemencés à une densité de 1 million de cellules par T25 (Corning, USA) ou à une densité de 350 000 cellules par puits en plaques 6 puits (Corning, USA).

Ces cellules sont capables d'adhérer rapidement sur un support, tel que celui des T25 ou des puits. C'est donc après environ 7 heures à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂, que les macrophages sont polarisés en M1 via l'ajout du mélange LPS (Lipopolysaccharide) (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et IFN γ (Interféron γ) (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) dans du milieu DHG-L1 + 10 % HIS. Le phénotype M2 est quant à lui obtenu via l'addition du mélange IL-4 (Interleukine-4) (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et IL-13 (Interleukine-13) (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) dans le milieu DHG-L1 + 10 % HIS. Ce processus de polarisation dure pendant une période de 18 ou 24 heures.

2.4. Analyse par RT-PCR quantitative

2.4.1. Extraction d'ARN total

2.4.1.1. Réactifs et matériels (tableau 2.5.)

2.4.1.1. Méthode

Après 18 heures de polarisation, les T25 contenant les macrophages polarisés M1 ou M2 sont décantées de leur milieu et rincées avec du PBS RNase-free glacé. 600 μ l de RLT (tampon de lyse) sont ensuite ajoutés et les cellules sont raclées afin de les lyser. Les lysats cellulaires sont transférés dans des microtubes RNase-free et sont mis à incuber pendant 5 minutes à température ambiante. L'extraction d'ARNm est réalisée avec le Qiacube (QIAGEN, Germany), en condition « large samples » avec un volume d'élution modifié à 30 μ l.

Afin d'économiser la quantité de LDLs disponibles, les ensemencements sont faits en plaques 6 puits (Corning, USA) par la suite. Dans ce cas, 300 μ l de RLT sont utilisés et l'extraction se fait donc en condition « standard ».

Toutes les manipulations avec de l'ARN se font en conditions RNase-free.

2.4.2. Rétro-transcription de l'ARNm en ADNc

2.4.2.1. Réactifs et matériels (tableau 2.5.)

2.4.2.1. Méthode

L'ARNm est rétro-transcrit en ADNc pour une analyse de RT-PCR quantitative : 5 μ g d'ARNm sont engagés pour la rétro-transcription (Transcriptor First Hand cDNA synthesis kit de ROCHE Applied Science, Switzerland). De l'H₂O RNase-free est donc ajoutée afin de porter le volume à 12 μ l. 1 μ l d'oligo-dT est également ajouté à chaque échantillon : ceux-ci sont alors mis à incuber à 65 °C pendant 10 minutes.

Ensuite, 7 μ l de mix réactionnel (pour la composition : voir tableau 2.5.) sont ajoutés dans chaque échantillon. Ces derniers sont incubés 30 minutes à 55°C et 5 minutes à 85 °C, afin d'arrêter la réaction de rétro-transcription.

Les échantillons d'ADNc sont conservés à -20 °C pour l'analyse par RT-PCR en temps réel.

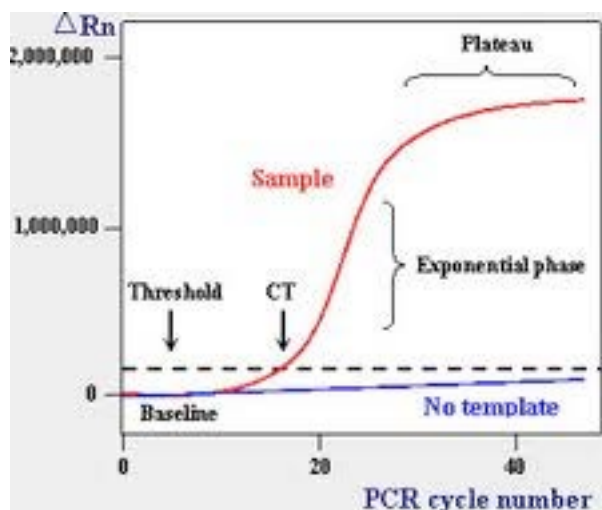


Figure 2.4. : Courbe d'amplification obtenue par qRT-PCR

La courbe d'amplification se dessine sous la forme d'une phase exponentielle suivie d'un plateau. La phase exponentielle s'explique par l'excès de réactifs présents au tout début de la réaction, tandis que le plateau représente la compétition entre renaturation et liaison des amorces.

C'est au niveau de la partie linéaire de la phase exponentielle qu'est établie une valeur seuil. Le Ct ou « Cycle threshold » est déterminé à partir de cette valeur seuil : le Ct correspond au nombre d'amplifications nécessaire pour que la fluorescence émise par l'ADNc amplifié dépasse la valeur seuil.

Tableau 2.6. : Séquences et dilutions optimales des amorces

« Housekeeping genes »

Nom	Séquence de l'amorce Reverse	Séquence de l'amorce Forward	Dilution des primers
<i>mActb</i>	ACCAGAGGCATACAGGGA CA	CTAAGGCCAACCGTGAA AAG	900/900
<i>mGAPDH</i>	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	CATGGCCTTCCGTGTTCC T	300/300
<i>mHPRT</i>	CCACAGGACTAGAACACCTG CTAA	AAAGCCTAAGATGAGCG CAAGT	300/300
<i>mRPL13</i>	TTCAGGCGCTGCACGTT	GCACCATCGGCATCTCTG T	300/300
<i>mTBP</i>	TAGTGCTGCAGGGTGATTTC AG	CAGTTACAGGTGGCAGC ATGA	300/300
<i>mTub</i>	ACACCAACCTCCTCATAATCC TTCT	TGGAGGAGGGTCAGTTC TC TGA	300/300

Marqueurs géniques M2

Nom	Séquence de l'amorce Reverse	Séquence de l'amorce Forward	Dilution des primers
<i>mArg1</i>	GCATCCACCCAAATGACAC A	GTGGTGGCAGAGGTCCA GAA	300/300
<i>mCD36</i>	AGATCCGAACACAGCGTAG AT	GCCAAGCTATTGCGACA TGAT	300/300
<i>mMRC1</i> (=CD206)	TGGTAGCTTCCACTGCTCGT	GGCGAGCATCAAGAGTA AAGA	300/300

Marqueurs géniques M1

Nom	Séquence de l'amorce Reverse	Séquence de l'amorce Forward	Dilution des primers
<i>mArg2</i>	ATGTCCGCATGAGCATCAAC	GAGACCACAGCCTGGCA ATAG	900/900
<i>mIL-6</i>	TCGTAGAGAACAACATAAGT CAGATACCT	CCTAGTGCGTTATGCCTA AGCA	300/300
<i>miNOS</i>	CGCACATCTCCGCAAATGTA	GGCAAACCCAAGGTCTA CGTT	300/300
<i>mTNFα</i>	CATTCGAGGCTCCAGTGAAT TC	GAAACACAAGATGCTGG GACAGT	300/300

Récepteurs « scavenger » et transporteurs aux lipoprotéines

Nom	Séquence de l'amorce Reverse	Séquence de l'amorce Forward	Dilution des primers
<i>mABCG1</i>	TGGGACGTCATCCAGTATACG ATA	GCCTACTACCTGGCAAAG ACCAT	300/300
<i>mABCG4</i>	CAAGGCTGAGAAGAGCAGGA	TGATGTGCCCTTCCAGGT	600/600
<i>mFcgr3</i>	GAGGCACATCACTAGGGAGA A	CAAGCCTGTCACCATCAC TG	300/300
<i>mMsr1</i>	ATTCACGGATTCTGAACTGC	CTTTACCAGCAATGACAA AAGAGA	300/300
<i>mOlr1</i> <i>=(LOX-1)</i>	ACATCTGCCCTTCCAGGATA	CAGTGACCCTTATTGTAC AGTGGA	600/300
<i>mScarb1</i> <i>=(SRBI)</i>	CGTTGTAGGTCAGCTTCATGG	TCATGACACCCGAATCCT C	600/300
<i>mTlr4</i>	CTGATCCATGCATTGGTAGGT	GGACTCTGATCATGGCAC TG	300/300

Les amorces ont été « designées » pour la qRT-PCR, grâce au logiciel Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Elles sont fournies par Integrated DNA Technologies, BE.

2.4.3. RT-PCR quantitative

2.4.3.1. Principe

L'abondance en ARNm d'un gène donné, dans les cellules M0 (cellules contrôles), dans les macrophages M1 et M2, est mesurée via l'analyse de qRT-PCR (« quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction »). Cette méthode est dite « en temps réel » car l'augmentation de la quantité d'ADN est suivie tout au long de la réaction.

Cette réaction commence par une phase exponentielle qui s'explique de part l'excès de réactifs présents au départ. Cette phase est suivie d'un plateau, dû à la compétition entre renaturation et liaison des amorces. (*Figure 2.4.*)

La quantité d'amplicons obtenue par PCR est évaluée grâce à l'intercalant fluorescent SYBR Green.

Au niveau de la partie linéaire de la phase exponentielle a lieu la quantification de la quantité d'ADNc introduite au départ. A cet endroit est établie une valeur seuil. Ainsi, le nombre d'amplifications nécessaire pour que la fluorescence, émise à partir de l'amplicon spécifiquement formé, dépasse cette valeur seuil correspond au Ct (Cycle Threshold). La valeur de Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ et donc d'ARNm. La valeur de Ct est normalisée avec la valeur de Ct d'un gène exprimé invariablement selon les conditions de stimulation (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010). Le « housekeeping gene » (HKG) généralement utilisé est le gène encodant l'actine, une protéine impliquée dans le cytosquelette, mais plusieurs mises au point ont dû être réalisées avant de sélectionner cet HKG, parmi d'autres HKG potentiels (*tableau 2.6.*).

Une courbe de dissociation est réalisée à la fin de la PCR afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Cette courbe correspond à une chute de fluorescence à la température à laquelle les brins de l'amplicon se séparent (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010).

2.4.3.2. Réactifs et matériels (*tableau 2.5.*)

2.4.3.3. Méthode

La réaction d'amplification est effectuée dans des plaques 96 puits contenant par puits : 12,5 µl de Power SYBR Green PCR Mix 1x (ROCHE, Switzerland), 2,5 µl d'amorce « forward », 2,5 µl d'amorce « reverse » diluées à leur concentration optimale (*tableau 2.6.*), 2,5 µl d'eau MilliQ RNase-free ainsi que 5 µl d'ADNc dilué 100 x. Dès que chaque puits est rempli, la plaque est scellée et ensuite, centrifugée à 600 rpm pendant 30 secondes.

Le processus commence par une étape de dénaturation à une température de 95°C pendant 10 minutes et est suivi de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 15 secondes (dénaturation) et à 65°C pendant 1 minute (hybridation des amorces et élongation), en utilisant le système 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA).

Le traitement des données est réalisé via la méthode des $\delta\delta Ct$. La valeur de Ct de l'HKG est soustraite à la valeur correspondante d'un autre gène étudié à la même condition (δCt). Les valeurs de δCt obtenues pour la condition contrôle sont soustraites à chaque valeur δCt des conditions de stimulation pour un même gène étudié ($\delta\delta Ct$). Enfin, en effectuant le calcul $2^{-\delta\delta Ct}$, pour chaque condition de stimulation, le niveau d'induction du gène par rapport à la condition contrôle de stimulation est obtenu (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010).

Les amorces (*tableau 2.6.*) ont été conçues, pour la real-time RT-PCR, avec le logiciel Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, USA). La p value a été calculée avec le logiciel libre GraphPad.

Tableau 2.7. : Réactifs et matériels nécessaires pour l'analyse par cytométrie de flux (FACS – « Fluorescence Activated Cell Sorting »)

Matériel cellulaire	- Cellules repiquées en plaques 6 puits (Corning, USA) à une densité de 375 000 par puits - Cellules M1 polarisées par ajout de LPS (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et de IFNγ (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) - Cellules M2 polarisées par ajout de IL-4 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et IL-13 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA)
Solution de rinçage	- dPBS (Dulbecco's modified Phosphate Buffered Saline) non stérile (0,8 % NaCl (Merck, Germany), KH ₂ PO ₄ 1,5 mM (Merck, Germany), KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, à pH = 7,4)
Solution inhibant l'adhérence cellulaire	- EDTA 5 mM (« ethylene diamine tetraacetic acid ») (Merck, Germany)
Solution de fixation	- Paraformaldéhyde (PAF) 2 % (Merck, Germany) -Glycine 0,1 M (Merck, Germany)
Solution de « blocking »	- dPBS + sérum murin 1 % + azide de sodium 0,1 % (Merck, Germany) -ou : dPBS + BSA 1 % + azide de sodium 0,1 % glacé (BSA ou Bovine Serum Albumin : PAA – The cell culture company, USA ; azide de sodium : Merck, Germany)
Anticorps	- Anticorps anti-récepteurs Fc (BD Pharmingen, USA) - Anticorps anti-MRC1 (Abcam, UK) - Anticorps secondaire conjugué à l'Alexa-488 (Molecular Probes-Invitrogen, UK) - Anticorps anti-CD86 couplé à la phycoérythrine (PE) (BD Pharmingen, USA) - Contrôle isotypique IgG2a κ (BD Pharmingen, USA)
Matériel supplémentaire	- Plaques 6 puits (Corning, USA) - Grattoirs 13 cm (SPL Life Sciences, Korea) - Tubes de 15 ml (Corning, USA) - Centrifugeuse : Labofuge 400 R, Heraeus Instrument, Germany - FACSCalibur (BD Biosciences, USA) - Logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences, USA)

2.5. Analyse par cytométrie de flux (FACS – « fluorescence activated cell sorting »)

2.5.1. Principe

Les cellules sont préparées et marquées ou non avec un anticorps d'intérêt couplé à un fluorochrome. Elles se retrouvent en suspension dans un flux laminaire liquide leur permettant d'être analysées l'une après l'autre. Elles sont alors illuminées une à une par une source lumineuse (laser), ayant la propriété d'exciter le fluorochrome.

Si la cellule exprime l'antigène d'intérêt, elle émettra une fluorescence plus importante et caractéristique, qui la classera comme étant positive. Cette fluorescence émise lui permet ainsi de se distinguer de la population.

De plus, ces cellules sont à la fois comptées et caractérisées (taille FSC et granulosité SSC).

2.5.2. Réactifs et matériels (tableau 2.7.)

2.5.3. Méthode

Les cellules RAW 264.7 sontensemencées dans des plaques 6 puits (Corning, USA) à une densité de 375 000 cellules par puits.

Elles sont ensuite polarisées via l'addition du mélange LPS/IFN γ (10 ng/ml) en macrophages M1 et via l'ajout du mélange IL-4/IL-13 (20 ng/ml) en macrophages M2 ; les macrophages M0 servent de contrôle.

Après 18 heures de polarisation, les cellules sont rapidement rincées avec 2 ml de dPBS (modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) et ensuite avec 1 ml d'EDTA 5 mM (acide éthylène-diamine-tétra-acétique) (Merck, Germany). La solution est enlevée et remplacée par 500 μ l d'EDTA 5 mM, qui agit pendant 5 à 15 minutes à température ambiante (RT). Dès que les cellules se sont détachées de leur support, 1 ml de dPBS + BSA 1 % + azide de sodium 0,1 % glacé (BSA ou Bovine Serum Albumin : PAA – The cell culture company, USA ; azide de sodium : Merck, Germany) est ajouté et les cellules sont alors transférées dans des tubes de 15 ml pour trois centrifugations et rinçages (centrifugeuse : Labofuge 400 R, Heraeus Instrument, Germany). La composition du dPBS + azide de sodium 0,1 % a été mise au point afin de réduire le bruit de fond, en remplaçant la BSA par du sérum murin normal (1 %).

Les cellules sont ensuite incubées pendant 20 minutes à 4°C avec l'anticorps anti-récepteurs Fc (dilution 100 x) (BD Pharmingen, USA) dans le but de diminuer le bruit de fond. Cependant, ce bruit de fond était encore trop important, c'est pourquoi du sérum de souris fut ajouté à la composition de la solution de « blocking » (Sigma-Aldrich Life Science, USA). Ce sérum est conservé à - 20°C.

Les cellules M2 sont par la suite marquées via l'anticorps monoclonal murin anti-MRC1 (dilution : 50 x) (Abcam, UK). Ce processus de marquage dure une heure et est suivi par une fixation des cellules avec 500 μ l de paraformaldéhyde 2 % (Merck, Germany) pendant 20 minutes à température ambiante (RT). Cette étape est suivie d'une centrifugation puis de l'ajout de 500 μ l glycine 0,1 M (Merck, Germany) pendant 10 minutes, afin d'éliminer tout aldéhyde résiduel encore présent dans le milieu de suspension. Elle est aussi suivie d'une seconde incubation d'une heure avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa-488 (dilution : 200 x ; IgG de chèvre anti-IgG anti-murin) permettant de révéler MRC1 (Molecular Probes-Invitrogen, UK) (Hirose et al., 2011).

Ce protocole a été adapté à partir du protocole original de marquage de surface cellulaire du Dr. Isabelle Hamer (URPhyM, FUNDP) (communication personnelle).

Tableau 2.8. : Réactifs et matériels nécessaires pour la détection d'IL-6 par les macrophages RAW via le test ELISA

Matériel cellulaire	- Cellules repiquées en plaques 24 puits (Corning, USA) à une densité de 75 000 cellules par puits - Cellules M1 polarisées par ajout de LPS (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et d'IFNγ (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) - Cellules M2 polarisées par ajout d'IL-4 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA) et IL-13 (20 ng/ml) (R&D Systems, USA)
Kit ELISA (IL-6) (R&D Systems, USA), conservé à 4 °C	- 2 plaques 96 puits pré-coatées avec un anticorps monoclonal spécifique de l'IL-6 murine - Conjugué IL-6 murin : solution contenant l'anticorps polyclonal reconnaissant l'IL-6 murine, conjugué à la peroxydase de raifort, avec des agents de conservation - Standard (Etalon) : solution protéique tamponnée contenant de l'IL-6 murine recombinante (exprimée chez <i>E. coli</i>) et des agents de conservation ; lyophilisé. Reconstitué avec 5 ml de Calibrator (concentration finale : 500 pg/ml). - Assay diluent RD1-14 : solution protéique tamponnée avec agents de conservation. - Calibrator diluent RD5T : solution protéique tamponnée avec agents de conservation. - Solution de rinçage : 25 ml de la solution dans 600 ml d'eau Milli-Q (Millipore, USA) - Réactifs A et B de coloration : mélangés en volumes égaux afin de former la solution « substrat » - Solution « Stop » : solution d'acide chlorhydrique
Dosage protéique	- PBS stérile (Lonza, Switzerland) - BSA 2 mg/ml (Thermo Scientific, USA) - NaOH 0,5 N ; 1 N ; 2 N (Merck, Germany) - Na₂CO₃ 2 % (Merck, Germany) - Solution A : composée de 10 ml de Na₂CO₃ (Merck, Germany), de 100 μl de tartrate (Merck, Germany) et de 100 μl de CuSO₄ (UCB, Belgium). - Solution de Folin-Ciocalteu (Merck, Germany) - Agitateur pour plaques : 500 rpm (Ika, Germany) - Lecteur de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA)
Matériel supplémentaire	- Eau milli-Q (Millipore, USA)

Les cellules M1 sont quant à elles marquées via l'anticorps monoclonal murin anti-CD86 couplé à la phycoérythrine (dilution : 25 x) (BD Pharmingen, USA) (Hirose et al., 2011). Le contrôle négatif pour cet anticorps est l'isotype contrôle IgG2a κ (BD Pharmingen, USA). Après une heure d'incubation avec cet anticorps, les cellules marquées sont ensuite fixées pendant 20 minutes à la paraformaldéhyde 2 %, puis la glycine 0,1 M est ajoutée pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 800 μ l de dPBS + sérum murin 1 % + azide de sodium 0,1 % et analysées.

Nous avons utilisé le FACSCalibur (BD Biosciences, USA) [(Hirose et al., 2011), (Khallou-Laschet et al., 2010)]. Les données ont été analysées via l'utilisation du logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences, USA).

2.6. Détection d'IL-6 sécrétée par les macrophages M1 par test ELISA

2.6.1. Principe

Une plaque multi-puits a été « pré-coatée » avec un anticorps monoclonal spécifique d'IL-6 : toute IL-6 présente dans le surnageant d'un échantillon se lie donc automatiquement à l'anticorps immobilisé. Après plusieurs rinçages, un anticorps polyclonal, conjugué à la HRP (« horseradish peroxidase »), spécifique d'IL-6, la reconnaît. Celle-ci est donc prise en « sandwich ». Une solution substrat est ajoutée après les rinçages : les puits deviennent bleus, puis jaunes après ajout de la solution Stop. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'IL-6 qui s'est liée à la première étape.

2.6.2 Réactifs et matériels (tableau 2.8.)

2.6.3. Méthode

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits (75 000/puits). Après 7 heures d'adhésion, elles sont polarisées via l'ajout du mix LPS/IFN γ ou IL-4/IL-13. La polarisation dure 18 heures. Ensuite, les cellules sont stimulées ou non, pendant 24 heures, avec les Nat-LDLs, Ox-LDLs ou Mox-LDLs à une concentration de 200 μ g/ml.

Après ce temps de stimulation, les surnageants sont prélevés et congelés à -20 °C. Les cellules sont, quant à elles, rincées deux fois avec du PBS stérile.

Ensuite, un dosage protéique est réalisé afin de normaliser les résultats obtenus par l'ELISA. 200 μ l de NaOH 0,5 N sont ajoutés dans chaque puits : la lyse dure au minimum 30 minutes. Les cellules sont ensuite « splachées » et transférées dans des microtubes de 1,5 ml.

Pendant ce temps, une courbe de calibration à la BSA (2 mg/ml) est réalisée via la lecture de l'absorbance aux concentrations de 25, 50, 100, 200 et 400 μ g/ml. Elle est traitée à son tour avec du NaOH 1 N pendant 30 minutes au minimum.

Ensuite, 30 μ l de chaque lysat cellulaire, de chaque échantillon de BSA et les blancs (NaOH 0,5 N) sont transférés, en double, dans une plaque 96 puits.

A ces 30 μ l sont ajoutés 150 μ l de solution A. Cette solution va permettre de neutraliser l'activité du NaOH. La solution agit pendant 10 minutes avec une agitation constante de 500 rpm.

Enfin 15 μ l de réactif de Folin dilué deux fois (dans de l'eau Mili-Q) sont ajoutés par puits. La plaque est agitée pendant 5 minutes à une vitesse de 500 rpm, puis est posée sur la paillasse pendant 30 minutes. L'absorbance est enfin lue à 740 nm avec le lecteur de multi-plaques.

Le test ELISA est réalisé après récolte des surnageants de toutes les conditions à analyser. Ce test permet de détecter l'IL-6, normalement exprimée et sécrétée par les macrophages M1 pro-inflammatoires.

Tableau 2.9. : Réactifs et matériels nécessaires pour l'isolation des lipoprotéines de faible densité

Colonnes à dessaler	- Colonnes de désalage PD-10 (GE Healthcare, UK)
Milieu d'équilibration final des LDLs	- Milieu RPMI (Lonza BioWhittaker RPMI 1640° (Lonza, Switzerland) exempt de glutamine
Milieu d'équilibration de la solution servant à générer les Ox-LDLs	- PBS sans EDTA (Lonza, Switzerland)
Milieu d'équilibration de la solution servant à générer les Mox-LDLs	- PBSox (complémenté en EDTA (1 g/l) (Centre Hospitalier Universitaire André Vésale de Charleroi, Belgium)
Matériel supplémentaire	- Tubes de 50 ml (Corning, USA) - Filtres 0,22 µm Filtropur S membrane (Germany) - Centrifugeuse (Eppendorf Centrifuge 5415R, Germany)

Tableau 2.10. : Réactifs nécessaires pour l'oxydation des LDLs au sulfate de cuivre

Réactifs oxydants	- Solution de CuSO ₄ 1 mM (UBC, Belgium) - Solution de PBSox
Solution Stop	- BHT (2,6 Diterbutyl 4-méthyl phénol) (Sigma, UK)

Tableau 2.11. : Réactifs nécessaires pour le dosage des LDLs via la méthode de Folin-Ciocalteu

Solution réactive A	- NaOH 0,1 M, Na ₂ CO ₃ 2 % (4 g NaOH (Merck, Germany) et 20 g Na ₂ CO ₃ (Merck, Germany) pour 1 l d'eau milli-Q (Millipore, USA))
Solution réactive B	- 50 ml de réactif A complémenté avec 500 µl de solution de tartrate de sodium 2 % et 500 µl de solution de CuSO ₄ (UBC, Belgium) 1 %
Matériel supplémentaire	- Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck, Germany), dilué 2 x dans du NaCl 0,9 % - Solution NaCl 0,9 % (Merck, Germany) - Solution de tartrate de sodium 2 % - Solution de CuSO ₄ 1 % (UBC, Belgium) - Ovalbumine 1 mg/ml - Tubes de spectrophotomètre de masse (Kartels, Italy) - Spectrophotomètre de masse (UviKon, Beun DeRonde SERLABO B.V.B.A, Belgium)

Après reconstitution de toutes les solutions (tableau 2.8.) et réalisation de la droite d'étalonnage (0 ; 7,8 ; 15,6 ; 31,2 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 pg/ml), 50 µl de diluant RD1-14 sont ajoutés aux puits. 50 µl de solution standard ou d'échantillons sont ajoutés à ces 50 µl de diluant. Cette étape est suivie de 2 heures d'incubation. Ensuite, chaque puits est rincé 5 fois avec la solution de rinçage et 100 µl de conjugué sont ajoutés dans chaque puits. Deux nouvelles heures d'incubation sont nécessaires ainsi que 5 rinçages. Enfin, 100 µl de solution « substrat » sont ajoutés à chaque puits, avec une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière. 100 µl de solution « Stop » sont ajoutés et la densité optique est déterminée par une lecture de l'absorbance à 450 nm et avec une correction à 540 nm (absorbance du plastique). La droite d'étalonnage est calculée, ainsi que les concentrations en IL-6 (pg/ml) dans chaque puits.

2.7. Isolation, oxydation et caractérisation des lipoprotéines de faible densité (LDLs)

2.7.1. Isolation des LDLs

2.7.1.1. Réactifs et matériels (tableau 2.9.)

2.7.1.2. Méthode

Les LDLs natives sont obtenues à partir de donneurs de sang humains en bonne santé et sont préparées à partir du plasma sanguin poolé. Elles sont isolées via ultracentrifugations séquentielles [(Boudjeltia K. Z., 2006), (Calay et al., 2010)]. Elles sont ensuite stockées sous hélium à 4°C dans l'obscurité. Cette ultracentrifugation est effectuée par le Centre Hospitalier Universitaire Vésale de Charleroi (en collaboration avec le Dr. K. Zouaoui Boudjeltia) (Boudjeltia K. Z., 2006).

Avant d'être équilibrées dans du milieu de culture et pour les Ox-LDLs et les Mox-LDLs, avant de respectivement subir une modification chimique et enzymatique, ces LDLs doivent subir un dessalage (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010). Natives ou modifiées, elles seront utilisées afin de stimuler les macrophages RAW 264.7.

Les colonnes de dessalage PD-10 (GE Healthcare, UK) sont respectivement équilibrées pour les LDLs natives, les Ox-LDLs et les Mox-LDLs avec 25 ml de RPMI sans glutamine (Lonza, Switzerland), 25 ml de PBS sans EDTA (Lonza, Switzerland) et 25 ml de PBSox complémenté en EDTA (1 g/l) (fourni par le Centre Hospitalier Universitaire Vésale de Charleroi, Belgium). Un volume de 2,5 ml de LDLs est déposé en haut de chaque colonne ; les colonnes sont ensuite lavées avec 3,5 ml de milieu RPMI pour les LDLs natives, 3,5 ml de PBS pour la solution servant à préparer les Ox-LDLs ou 3,5 ml de PBSox pour la solution servant à préparer les Mox-LDLs (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010).

Après modification des LDLs, les solutions finales d'Ox- et Mox-LDLs sont éluées à la manière des LDLs natives avec du RPMI. Les solutions de LDLs sont ensuite rendues stériles par filtration (filtres de 0,22 µM) (Filtropur S membrane, Germany) et stockées à 4°C dans l'obscurité. Ces solutions sont dosées, par la suite, par la méthode de Folin-Ciocalteu (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010).

2.7.2. Oxydation des LDLs

2.7.2.1. Réactifs et matériels (tableau 2.10. et 2.11.)

2.7.2.2. Méthode

Deux protocoles différents d'oxydation des LDLs ont été utilisés : l'oxydation des LDLs par les ions de cuivre et l'oxydation des LDLs par la myéloperoxydase (MPO). Les LDLs oxydées au cuivre sont obtenues par incubation des LDLs, dont la concentration est ajustée à

Tableau 2.12. : Réactifs nécessaires pour la migration des lipoprotéines sur gel d'agarose

TBE 10 x (1 l)	- 108 g de Tris, 55 g d'acide borique, 9,3 g de Titriplex III, EDTA disodique (Invitrogen, UK)
Bleu de charge 5 x (50 ml)	- 10 ml de Tris 2 M pH 6,8 (Merck, Germany), 12,5 ml de β -mercaptoéthanol (FlukaChemi AG, Switzerland), 25 ml de glycérol (Merck, Germany), 50 mg de bleu de bromophénol (Janssens Chemicals)
Bleu de Coomassie (200 ml)	- 100 ml d'eau milli-Q (Millipore, USA), 80 ml de méthanol (Accros Organic, USA), 20 ml d'acide acétique, 0,3 g de bleu de Coomassie
Solution de décoloration (1 l)	- 500 ml d'eau milli-Q (Millipore, USA), 400 ml de méthanol (Accros Organics, USA), 100 ml d'acide acétique
Gel de migration	- Gel d'agarose 0,8 %

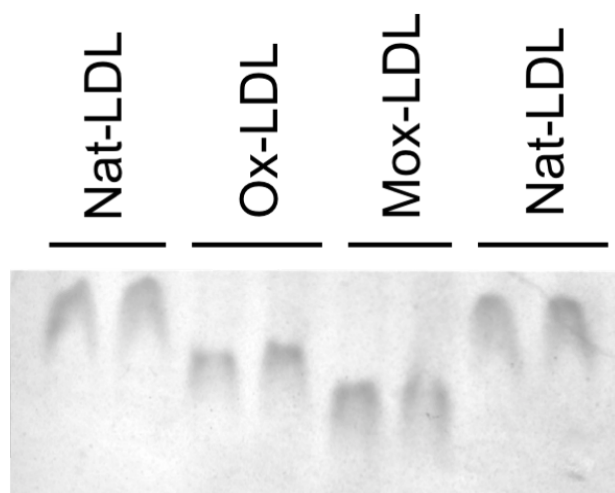


Figure 2.5. : Mobilités électrophorétiques des Nat-LDLs, Ox-LDLs et Mox-LDLs

Un gel d'agarose a été coulé afin de vérifier si le CuSO_4 et la myéloperoxydase ont correctement oxydé les LDLs.

1 mg/ml dans du PBS, pendant 24 heures à 37°C, avec de sulfate de cuivre 10 μ M (CuSO_4) (Calay et al., 2010). L'oxydation au cuivre est arrêtée par ajout de 2,6-ditertbutyl 4-méthyl phénol 25 μ M (BHT) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) et par une mise sur glace pendant 1 heure. Après cette étape, la solution d'Ox-LDLs est équilibrée dans du RPMI avant d'être dosée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

L'oxydation des LDLs par la myéloperoxydase commence par une incubation de 1600 μ g de LDLs équilibrées dans du PBSox avec de l'HCl 4 mM, 2,6 unités chlorantes de MPO recombinante humaine par mg (rhMPO à 92,4 U/ml est fournie par le Laboratoire de Médecine Expérimentale ULB Unité 222 du CHU de Charleroi, Belgium) de LDLs en présence de H_2O_2 1 mM pour une durée de 5 minutes à 37°C (bain-marie). Le volume est ajusté à 2 ml en ajoutant du PBS contenant 1 g/l d'EDTA à pH 6.5 (Calay et al., 2010), (Mémoire de L. Caesens-Koenig, 2010).

Finalement, la réaction est arrêtée via une incubation de 1 minute sur glace. Les Mox-LDLs sont enfin équilibrées dans du RPMI et filtrées avant d'être dosées par la méthode de Folin-Ciocalteu (tableau 2.11).

Cette méthode de dosage permet de réaliser une courbe d'étalonnage. Cette courbe se fait avec de l'ovalbumine à une concentration de 1 mg/ml. Le volume de chaque tube est ajusté à 100 μ l avec du PBSox. Les échantillons sont composés de 20 μ l LDLs + 80 μ l PBSox. Le blanc correspond à 100 μ l de PBSox. 400 μ l de NaCl 0,9 % (Merck, Germany) sont ajoutés dans chaque tube afin d'obtenir un volume final de 500 μ l. 2,5 ml de réactif B sont ajoutés par tube. Cette addition de réactif B est suivie d'une incubation de 10 minutes à température ambiante (RT). 250 μ l de réactif de Folin (Merck, Germany) sont ajoutés dans chaque tube, étant ensuite incubés 30 minutes à l'obscurité à RT. Enfin, la lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre à 750 nm (UviKon, Beun DeRonde SERLABO B.V.B.A, Belgium) (tableau 2.11.).

2.7.3. Caractérisation des LDLs : migration sur gel d'agarose

2.7.3.1. Réactifs et matériels (tableau 2.12.)

2.7.3.2. Méthode

Les LDLs natives (Nat-LDLs), les LDLs oxydées au cuivre (Ox-LDLs) ou à la myéloperoxydase (Mox-LDLs) possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. En effet, les modifications des résidus lysine de l'apo-B100 des LDLs provoquent une migration plus ou moins importante des lipoprotéines modifiées par rapport aux LDLs natives. Elles peuvent être facilement distinguées en utilisant la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose (Fig. 2.5.) (Calay et al., 2010).

Pour ce faire, un gel d'agarose 0,8 % est préparé : 0,8 g d'agarose est dissous dans 100 ml de tampon TBE et il suffit de 30 minutes pour obtenir un gel polymérisé.

Chaque échantillon est dilué à une concentration d'environ 500 μ g/ml dans du TBE 1 x et en les mélangeant avec du bleu de charge 5 x sans SDS. Ils sont ensuite chargés sur gel : la migration dure 2 heures, de 80 à 100 volts et à ampérage maximum.

Le gel est, par la suite, coloré au bleu de Coomassie pendant 20 minutes, ce qui permet de visualiser nettement les protéines. Le gel coloré est lavé 4 à 5 fois dans la solution de décoloration et est baigné toute une nuit dans cette solution, afin d'enlever le surplus de colorant.

Enfin, le gel est scanné et numérisé grâce au logiciel Image Master Labscan.

Tableau 2.13. : Marquage de cellules spumeuses par coloration à l'Oil Red O (ORO)

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaques 12 puits (Costar, USA) à une densité de 175 000 par puits
Colorant Oil Red O stock	Solution d'Oil Red O (1-([4-(xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol, O0625) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) 0,2 % dans de l'isopropanol 100 % (Merck, Germany)
Solution de dextrine	Solution de dextrine (Pharmacia Biotech) 1 % dans de l'eau milli-Q (Millipore, USA)
Solution colorante à utiliser	Solution d'Oil Red O (3 volumes) et de dextrine (2 volumes) filtrée 2 x juste avant utilisation
Matériel supplémentaire	-PBS non stérile (0,9 % NaCl (Merck, Germany), 10 mM KH₂PO₄ (Merck, Germany) à pH = 7,4) -Paraformaldéhyde (PAF) 4 % (Merck, Germany) -Ethanol 100 % ou 96 % (Merck, Germany) -Plaque 96 puits (Corning, USA) -Solution d'iodure de propidium 1 % (Sigma-Aldrich Life Science, USA) - Spectrophotomètre de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA)

Tableau 2.14. : Marquage de cellules spumeuses polarisées avec la sonde Bodipy 493/503

Matériel cellulaire	- Cellules repiquées en plaques 24 puits (Costar, USA), sur lamelles couvre-objets à une densité de 75 000 par puits
Molécules de marquage	- Anticorps anti-adipophiline (Progen Biotechnik GmbH, Germany) - Anticorps secondaire conjugué à l'Alexa-543 (Invitrogen Molecular Probes, UK) - Sonde Bodipy 493/503 (Invitrogen Molecular Probes, UK) - To-PRO (Invitrogen Molecular Probes, UK)) dilué dans de l'eau RNase (ICN Biochemicals, USA)
Solution de « blocking »	- PBS + 1 % BSA (PAA - The cell culture company, USA)
Solution de perméabilisation	- PBS + 1 % Triton X-100 (Merck, Germany)
Matériel supplémentaire	- PBS non stérile (0,9 % NaCl (Merck, Germany), 10 mM KH₂PO₄ (Merck, Germany) à pH = 7,4) - Paraformaldéhyde (PAF) 4 % (Merck, Germany) - Mowiol (Calbiochem, Merck, Germany) - Lamelles couvre-objets (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co, Germany) - Plaque 24 puits (Corning, USA) - Microscope confocal SP5 (Leica, Germany)

2.7.4. Stimulation des cellules RAW 264.7 avec les LDLs

Chacune des stimulations des cellules RAW avec les LDLs a été précédée par une heure de mise au repos des cellules avec du milieu DHG-L1 sans HIS. Toutes les stimulations ont été effectuées à une concentration de 200 µg LDLs/ml, dans du milieu DHG-L1 + 1 % HIS.

2.8. Marquage à l'Oil Red O (ORO) de macrophages RAW spumeux

2.8.1. Principe

La coloration lysochrome à l'Oil Red O permet de marquer les lipides et triglycérides neutres : ceux-ci sont donc facilement visualisés par microscope à contraste de phase. Cependant, l'Oil Red O peut aussi être extrait par la suite, afin d'être quantifiée via une mesure d'absorbance.

2.8.2. Réactifs et matériels (tableau 2.13.)

2.8.3. Méthode

Les macrophages sont incubés avec des LDLs natives et modifiées (Ox-LDLs et Mox-LDLs) pendant 48 heures. Ils sont ensuite lavés deux fois avec 2 ml de PBS et fixés avec 1 ml de paraformaldéhyde 4 % (Merck, Germany) pendant deux minutes et demi. Ils sont lavés une seconde fois avec 2 ml de PBS et incubés avec 1 ml de solution d'ORO (Sigma-Aldrich Life Science, USA) pendant 30 minutes, à température ambiante. Après cette incubation, la solution d'ORO est enlevée et les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml de PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 1 ml d'éthanol 100 % (Merck, Germany) pendant 30 minutes, à température ambiante. Après ce temps d'incubation, l'éthanol est enlevé, 100 µl sont transférés dans des plaques 96 puits (Corning, USA) et la D.O. est mesurée à 490 nm avec le lecteur de plaque multi-puits (BIO-RAD, USA).

Les cellules adhérentes sont incubées avec 1 ml d'iodure de propidium (10 ng/µl) (Sigma-Aldrich Life Science, USA) pendant 30 minutes à l'obscurité et la fluorescence est mesurée à l'aide d'un fluoromètre Fluoroskan Ascent microplate (ThermoFisher Scientific, USA) à 612 nm après une excitation à 518 nm.

Les résultats sont exprimés via un ratio des valeurs d'absorbance et de fluorescence.

2.9. Marquage des cellules spumeuses au Bodipy

2.9.1. Principe

La sonde lipophile Bodipy (« dipyrrometheneboron di-fluoride chelate (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) ») est un fluorophore, avec de nombreux avantages d'utilisation tels qu'une stabilité photochimique et une insensibilité aux changements de conditions expérimentales (ex. : polarité, pH, O₂). Elle est capable de se conjuguer aux lipides des membranes cellulaires et des vésicules phospholipidiques, et ainsi de les marquer. Elle lie de façon covalente les lipides, tels que les acides gras, les glycolipides, phospholipides et triglycérides (Li et al., 2006). Le marquage des lipides au sein de la cellule permettra de déterminer et de comparer la charge en Ox-LDLs ou Mox-LDLs.

2.9.2. Réactifs et matériels (tableau 2.14.)

2.9.3. Méthode

Les cellules sontensemencées sur des lamelles à raison de 75 000 cellules par puits. Elles sont ensuite polarisées (M1/M2) pendant 18 heures et stimulées avec les LDLs (Nat-LDLs, Ox-LDLs et Mox-LDLs) (200 µg/ml) pendant 24 heures.

Tableau 2.15. : Quantification de la charge en lipides dans des cellules spumeuses polarisées, dont les lipides sont marqués avec la sonde Bodipy 493/503

Matériel cellulaire	- Cellules repiquées en plaques 96 puits (BD Biosciences, USA), à une densité de 13 000 par puits
Molécules de marquage	- Phalloïdine (conjuguée à l'Alexa-555) (Invitrogen Molecular Probes, UK) - Sonde Bodipy 493/503 (Invitrogen Molecular Probes, UK) - To-PRO (Invitrogen Molecular Probes, UK) dilué dans de l'eau RNase (ICN Biochemicals, USA)
Solution de « blocking »	- PBS + 1 % BSA (PAA - The cell culture company, USA)
Solution de perméabilisation	- PBS + 1 % Triton X-100 (Merck, Germany)
Matériel supplémentaire	- PBS non stérile (0,9 % NaCl (Merck, Germany), 10 mM KH ₂ PO ₄ (Merck, Germany) à pH = 7,4) - Paraformaldéhyde (PAF) 4 % (Merck, Germany) - Plaque 96 puits (BD Biosciences, USA) - BD Pathway 855 (BD BioSciences, USA)

Après ces 24 heures de stimulation, le milieu des cellules est décanté et celles-ci sont fixées pendant 10 minutes avec 500 µl de paraformaldéhyde 4 %. Cette fixation est suivie de trois rinçages au PBS, d'une perméabilisation et d'un blocage partiel des sites d'interaction aspécifique des cellules avec 500 µl de PBS + 1 % de Triton. Après 10 minutes, les cellules sont rincées trois fois avec 1 ml de PBS + 1 % BSA. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure avec 30 µl de PBS + 1 % BSA contenant l'anticorps anti-adipophiline (dilution : 10 x).

Les cellules sont à nouveau rincées avec 1 ml de PBS + 1 % BSA, puis incubées, à l'obscurité, pendant 1 heure avec 30 µl de PBS + 1 % BSA contenant l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-543 (dilution : 500 x) dilué avec la sonde Bodipy 493/503 (20 µg/ml).

Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS, incubées 30 minutes dans 30 µl de To-PRO (dilution : 80 x) pour un marquage des noyaux, puis à nouveau rincées trois fois dans du PBS. Les lamelles sont enfin montées au Mowiol préalablement chauffé à 57 °C. Les cellules sont observées au microscope confocal Leica.

2.10. Quantification de la charge en lipides via le BD Pathway 855

2.10.1. Principe

Le BD Pathway 855 permet de capturer des images via un système confocal de type « spinning disk ». Il est muni, à la fois, d'un mode confocal et d'un mode « widefield », permettant de générer des images de haute résolution. L'avantage principal de ce dispositif est l'analyse quantitative de données sur des cellules, soit vivantes ou fixées.

L'excitation se fait via deux lampes à halogène. Le spectre d'excitation est compris entre 340 et 750 nm. L'image d'intérêt est segmentée et divisée en régions d'intérêt (ROI). La fluorescence (ex. : nombre d'objets par cellule, intensité) est alors mesurée dans cette ROI. Le BD a pour rôle notamment de quantifier un objet d'intérêt dans les cellules. Dans notre cas, il quantifie les gouttelettes lipidiques, mais il peut aussi quantifier un flux de calcium, des bactéries,...

L'acquisition et l'analyse des images sont réalisées via le logiciel ATTOVISION, tandis que l'analyse et l'exportation des données sont réalisées par le logiciel BD-IDE, basé sur le logiciel Excel (BD Biosciences, USA).

2.10.2. Réactifs et matériels (tableau 2.15.)

2.10.3. Méthode

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à raison de 13 000 cellules par puits. Elles sont ensuite polarisées (M1/M2) pendant 18 heures, puis stimulées avec les LDLs natives et modifiées (200 µg/ml) pendant 24 heures.

Après ces 24 heures de stimulation, le milieu des cellules est décanté et celles-ci sont fixées pendant 10 minutes avec 50 µl de paraformaldéhyde 4 %. Cette fixation est suivie de trois rinçages au PBS, d'une perméabilisation des cellules avec 50 µl de PBS + 1 % de Triton. Après 10 minutes, les cellules sont rincées deux fois avec 200 µl de PBS + 1 % BSA pour un blocage partiel des sites d'interaction aspécifique. Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 minutes avec 50 µl de PBS + 1 % BSA contenant la phalloïdine couplée à l'Alexa-555 (dilution : 100 x) (37 °C, à l'obscurité). Les cellules sont à nouveau rincées avec 200 µl de PBS + 1 % BSA, puis incubées, à l'obscurité, pendant 1 heure avec 50 µl de PBS + 1 % BSA contenant la sonde Bodipy 493/503 (20 µg/ml). Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS, incubées 30 minutes dans 50 µl de To-PRO (dilution : 80 x) pour un marquage des noyaux, puis à nouveau rincées trois fois dans du PBS.

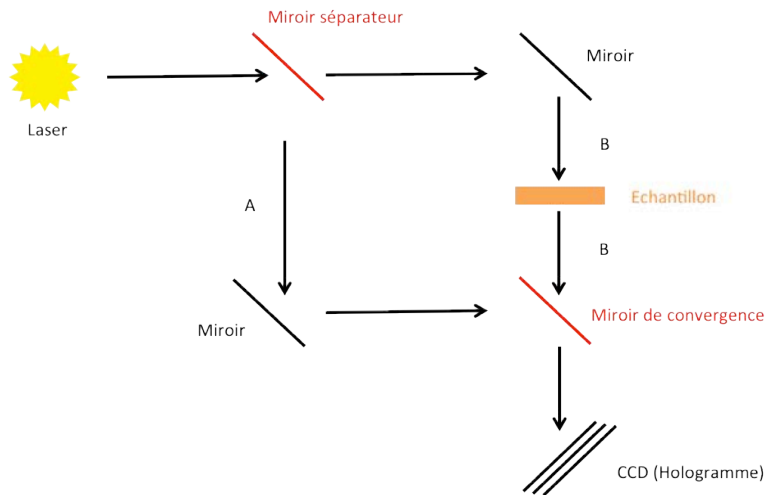


Figure 2.6. Microscope holographique interférométrique digital.

Une source lumineuse (laser) est envoyée sur l'échantillon. Avant de l'atteindre, le faisceau lumineux est séparé en deux faisceaux : un faisceau de référence et un faisceau associé à l'échantillon. Ceux-ci seront à nouveau unis grâce à un miroir de « convergence ».

Le faisceau est ensuite envoyé vers la caméra CCD, permettant ainsi de créer un hologramme. Enfin, l'image de l'échantillon est reconstruite via un algorithme de reconstruction numérique.

A : faisceau de référence

B : faisceau traversant l'échantillon

La quantification des gouttelettes lipidiques est ensuite réalisée via le logiciel ATTOVISION (acquisition et analyses des images) et avec le logiciel BD-IDE (analyses des données) du BD Pathway 855 (objectif : 20 x).

2.11. Microscope holographique interférométrique digital (MHD)

Bien que cette technique semble marginale par rapport au canevas des techniques de ce mémoire, l'observation au microscope holographique des cellules M0 et des macrophages polarisés M1 ou M2 est toutefois intéressante. En effet, ce microscope nous permet d'observer qualitativement, pour le moment, la charge en lipides dans les cellules. Plus tard, il nous permettra de quantifier cette charge en lipides.

2.11.1. Principe

La microscopie holographique digitale permet l'observation de cellules en fonction de l'indice de réfraction. Les images obtenues sont représentées sous forme d'un hologramme ou d'une image en 3 dimensions. Cette technique est basée sur l'interférence de deux rayons lumineux : un de référence et un autre traversant l'échantillon étudié. Via un système de miroirs, les deux faisceaux convergent vers une caméra CCD (« Couple Charge Device ») afin de créer un hologramme (*Fig. 2.6.*). Ensuite, l'image de l'objet est reconstruite via un algorithme de reconstruction numérique, qui, dans le cas d'un microscope traditionnel, remplace la lentille (Ovizio's Quantitative Imaging Devices, 2011). L'image peut être observée en mode contraste de phase, en mode intensité ou en mode 3D. Lorsque les cellules sont observées via le mode 3D, elles sont représentées numériquement selon leur hauteur optique. Celle-ci est proportionnelle à la hauteur physique et à l'indice de réfraction. Puisque les lipides ont un indice de réfraction supérieur à celui du cytosol (c'est-à-dire de l'eau), la cellule présentera des « crêtes » au niveau de ces inclusions lipidiques.

L'intérêt de cette technique est qu'elle permet d'observer des cellules vivantes et donc d'éviter une étape de fixation et de coloration (ex. : Oil Red O).

2.11.2. Méthode

Les cellules RAW M0, M1 et M2 sont observées via le microscope holographique digital, avec un objectif 40 x, après stimulation avec les LDLs (200 µg/ml).

Une digitalisation des cellules dans chaque condition est réalisée. Les cellules sont observées en contraste de phase et en mode 3D, ce qui permet de déterminer qualitativement la charge en lipides contenus dans les macrophages.

RESULTATS

Conditions (ng/ml)	% cytotoxicité (18h)
Contrôle	2,35
LPS 0,1	2,34
LPS 1	4,01
LPS 10	5,09
LPS 50	6,63
LPS 100	6,64

Conditions (ng/ml)	% cytotoxicité (24h)
Contrôle	5,38
LPS 0,1	3,42
LPS 1	4,15
LPS 10	5,98
LPS 50	5,43
LPS 100	6,27

Tableau 3.1. Cytotoxicité du LPS étudiée à des concentrations croissantes.
La cytotoxicité due au LPS a été mesurée par un test LDH. (Cfr 2.2.1. *Matériels et méthodes*)

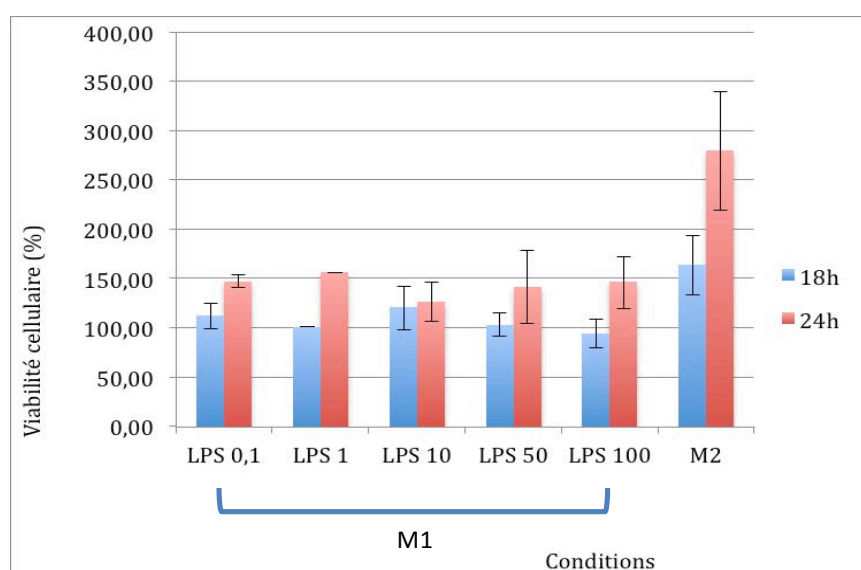


Figure 3.1. Viabilité cellulaire durant la polarisation M1 et M2, estimée par un test MTT (décrit dans 2.2.2. *Matériels et méthodes*).

Les cellules ont été incubées en présence d'IFN γ (20 ng/ml) et de concentrations croissantes de LPS (de 0,1 à 100 ng/ml), pour la polarisation M1. Pour la polarisation M2, les macrophages ont été incubés en présence d'IL-4 (20 ng/ml) et d'IL-13 (20 ng/ml), tandis que les cellules contrôles n'ont pas été polarisées.

Ce processus dure 18 ou 24 heures pour chacune des conditions. Les cellules sont traitées pour le test MTT après 18 et 24 heures. Les résultats sont exprimés en % de viabilité en comparaison aux cellules contrôles (soit 18 ou 24 heures) et comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$).

3. Résultats

La première partie du mémoire a été consacrée à l'établissement d'un protocole de polarisation M1 et M2 des macrophages RAW 264.7 et à sa vérification au niveau de l'expression génique.

3.1. Etablissement du protocole de polarisation M1/M2 sur des macrophages RAW 264.7

3.1.1. *Evaluation de la cytotoxicité due au LPS*

Tout d'abord, le milieu de polarisation LPS/IFN γ , induisant un phénotype M1 chez les macrophages, ou plus précisément la concentration en LPS, a dû être testée. En effet, le LPS ou lipopolysaccharide est une molécule d'origine bactérienne très cytotoxique.

Dans certaines études centrées sur la polarisation M1, la concentration en LPS utilisée peut monter jusqu'à 100 ng/ml (Hirose et al., 2011), voire 1 μ g/ml (Lopez-Castejon et al., 2010).

Cependant, lorsque les cellules RAW 264.7 sont traitées avec le LPS à cette concentration, nous avons très vite observé un détachement des cellules de leur substrat.

Afin de vérifier l'importance de la cytotoxicité, un test LDH (lactate déshydrogénase) a été réalisé sur des cellules traitées avec des concentrations de LPS croissantes (0,1 à 100 ng/ml).

Néanmoins, et à notre surprise, les valeurs de cytotoxicité se sont avérées relativement faibles, bien que les concentrations de 50 et 100 ng/ml semblent plus dommageables pour les cellules que les concentrations plus faibles. En effet, la cytotoxicité mesurée pour les cellules traitées avec 50 ng/ml et 100 ng/ml est de 6,63 et 6,64 % respectivement, en comparaison à 2,34 % pour les cellules contrôles (Tableau 3.1).

Une explication proposée pour ces résultats pourrait être qu'en présence de concentrations élevées en LPS, les cellules se détachent mais continuent à survivre.

Afin de compléter les résultats obtenus et de vérifier la viabilité des cellules, un test MTT a été réalisé. Les résultats de ce test confirment la mortalité limitée induite par le LPS, quelle que soit la concentration utilisée.

De plus, nous avons même observé une augmentation du signal MTT en comparaison avec les cellules contrôles, que ce soit pour les cellules M1 ou M2, suggérant ainsi un taux de prolifération cellulaire plus élevé. Cette augmentation est particulièrement spectaculaire pour les cellules M2 (Fig. 3.1).

En plus de ces tests, l'expression de gènes marqueurs M1 a été étudiée afin de déterminer quelle concentration en LPS allie à la fois une surexpression relative en ARNm des marqueurs M1 et une faible cytotoxicité. La concentration de 10 ng/ml a été choisie puisqu'elle s'avère être un bon compromis entre ces deux paramètres (résultats non montrés).

3.1.2. *La polarisation des macrophages RAW 264.7*

La vérification de la polarisation des macrophages est effectuée en évaluant l'expression d'une série de gènes marqueurs, M1 et M2, tant au niveau ARNm qu'au niveau protéique. Nous nous sommes d'abord penchés sur l'expression de ces gènes au niveau ARNm.

3.1.2.1. Optimisation de la technique de qRT-PCR et sélection d'un HKG

Les premières analyses de qRT-PCR ont montré une forte variation dans l'expression de l'« housekeeping gene » (HKG) habituellement utilisé pour la normalisation, c'est-à-dire le

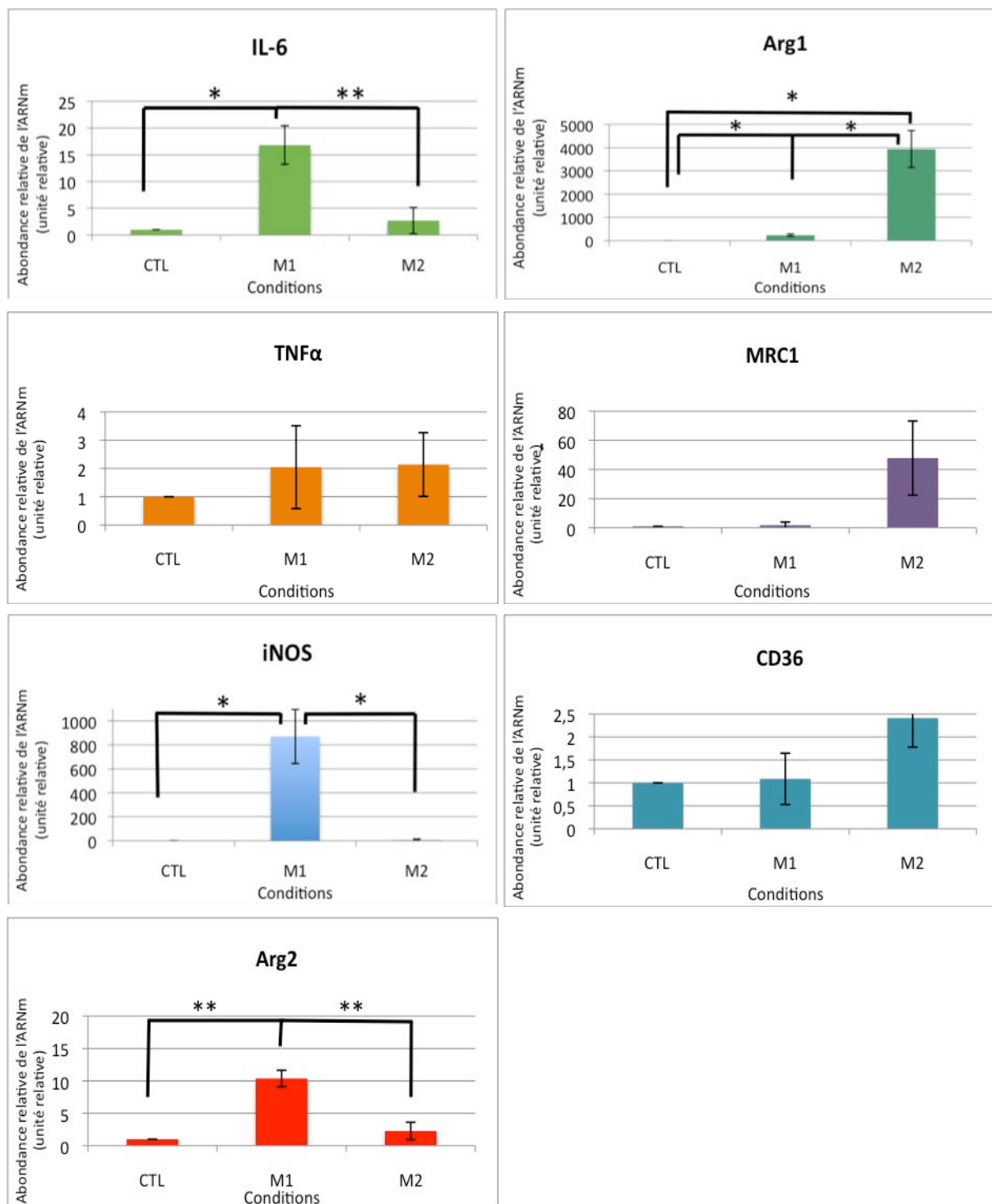


Figure 3.2. Expression des marqueurs géniques M1 et M2 après 18 heures de polarisation dans des cellules M0, M1 et M2.

L'abondance en ARNm pour les différents gènes marqueurs a été mesurée via la technique de qRT-PCR. La polarisation M1 a été confirmée en évaluant l'expression d'*IL-6*, *TNFα*, *iNOS* et *Arg2*. De façon similaire, l'expression des biomarqueurs M2, tels que *CD36*, *MRC1* et *Arg1*, a été utilisée en vue de valider le protocole de polarisation M2. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * **significatif** ($p < 0.05$) ; ** **hautement significatif** ($p < 0.01$).

gène encodant TBP (« tata-box binding protein »). Or, un HKG invariant est nécessaire pour normaliser les valeurs de l'expression relative en ARNm obtenues.

Cette variation de l'expression de *TBP* est due à l'ajout de LPS dans le milieu de culture.

Pour ce faire, d'autres HKG ont dû être testés pour la stabilité de leur expression en réponse au LPS.

Les « housekeeping genes » communément utilisés dans le cadre de la polarisation des macrophages sont *TBP* et la *GAPDH* (glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase) ((Herrero et al., 2010) et (Lopez-Castejon et al., 2010), respectivement). Cependant, dans les macrophages de la lignée RAW 264.7 traités avec le LPS, l'expression de ces HKG habituels affiche une grande variation. En effet, nous avons remarqué une variation pratiquement proche de 4 Ct pour *TBP* et de 2 Ct pour la *GAPDH* (résultats non montrés). Ce dernier HKG avait de toute façon peu de chance d'être choisi, puisqu'au cours de sa thèse, Damien Calay avait déjà montré que son expression variait lorsque les cellules étaient stimulées avec des LDLs natives ou modifiées.

Ainsi, d'autres HKG potentiels ont été testés : il s'agit des gènes encodant RPL13, HCNP, HPRT, la tubuline et l'actine. Nous avons noté, par exemple, une variation de 4 Ct pour *HPRT* (résultats non montrés). Finalement, c'est le gène encodant l'actine (*Actb*), une protéine impliquée dans le cytosquelette, qui a été choisi, étant donné que son expression varie moins que pour les autres.

3.1.2.2. Expression de gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par qRT-PCR

Les macrophages M1 et M2 peuvent être discriminés au travers de leurs différences dans l'expression de certains gènes caractéristiques, par la technique de RT-PCR en temps réel (qRT-PCR ou « quantitative RT-PCR »). En effet, les macrophages pro-inflammatoires (M1) expriment plusieurs gènes « marqueurs » tels que *iNOS* (« inducible Nitric Oxyde Synthase »), *IL-6* (interleukine-6), *Arg2* (arginase-2) et *TNFα* (« Tumor Necrosis Factor α »). Les marqueurs M2 étudiés sont *CD36* (« Cluster of Differentiation 36 », alias FAT « Fatty Acid Transporter »), *MRC1* (« Mannose Receptor type C1 ») et *Arg1* (arginase-1).

L'ensemble de ses gènes et leurs fonctions ont été décrits dans l'introduction et plus précisément dans le chapitre « 1.1.2.3. Marqueurs géniques M1 et M2 ».

Au début du mémoire, nous avons voulu tester deux temps de polarisation des cellules, soit 18 ou 24 heures. L'expression des marqueurs M1 et M2 a été évaluée par qRT-PCR afin de valider le protocole de polarisation utilisé dans cette étude.

Comme nous pouvons l'observer à la *figure 3.2*, l'expression d'*iNOS*, *IL-6* et *Arg2* est induite par les stimuli LPS et IFN γ . A 18 heures de polarisation, nous observons une augmentation significative de l'expression d'*iNOS* et d'*IL-6* de près de 870 et 17 fois respectivement. L'augmentation de l'expression d'*Arg2* est par ailleurs très significative, avec un « fold » d'induction de 10. Par contre, l'augmentation d'expression de *TNFα* n'est pas significative pour les tests effectués sur les macrophages M1 (p value = 0,3426).

De façon intéressante, nous observons peu ou pas d'expression des gènes « marqueurs » M2 au sein des cellules M1.

De même, l'expression de *MRC1* et *Arg1*, mesurée après 18 heures de polarisation, est induite dans les macrophages M2 via les stimuli que sont les cytokines IL-4 et IL-13. Les « folds » d'induction sont respectivement de 50 et 3940. Cette augmentation est significative pour *Arg1*. Cependant, elle ne l'est pas pour *MRC1* (p value = 0,6128), probablement suite à une variabilité trop importante. Dans le cas du troisième marqueur M2, *CD36*, nous observons une surexpression de seulement 2 fois, mais cette différence n'est pas significative

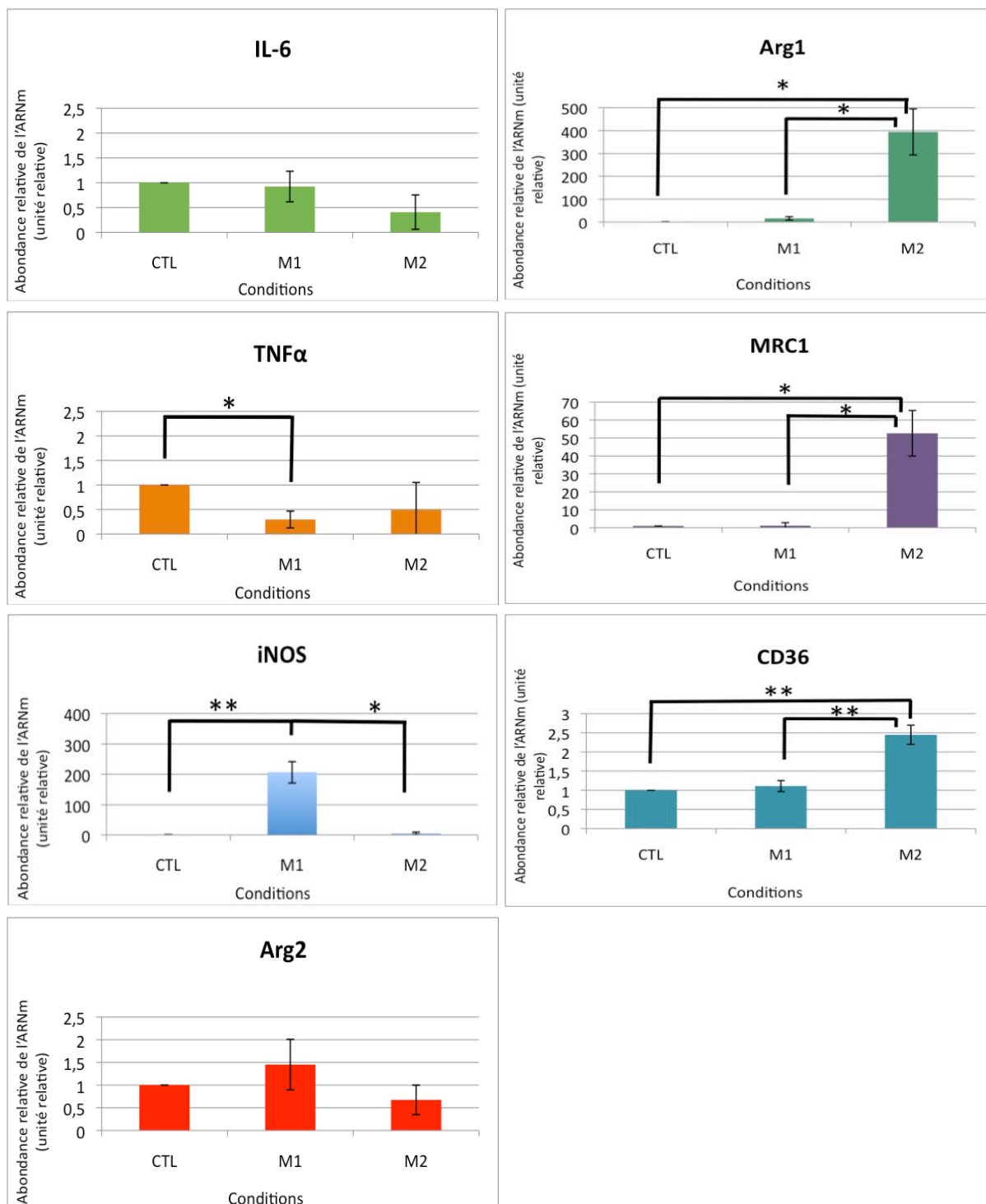


Figure 3.3. Expression des marqueurs géniques M1 et M2 après 24 heures de polarisation dans des cellules M0, M1 et M2, mesurée par qRT-PCR.

La polarisation M1 est confirmée via la détection de l'expression d'*iNOS*, *TNFα*, *IL-6* et *Arg2*. De façon similaire, la polarisation M2 a été évaluée en déterminant l'expression de *CD36*, *MRC1* et *Arg1*. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * **significatif** ($p < 0.05$) ; ** **hautement significatif** ($p < 0.01$).

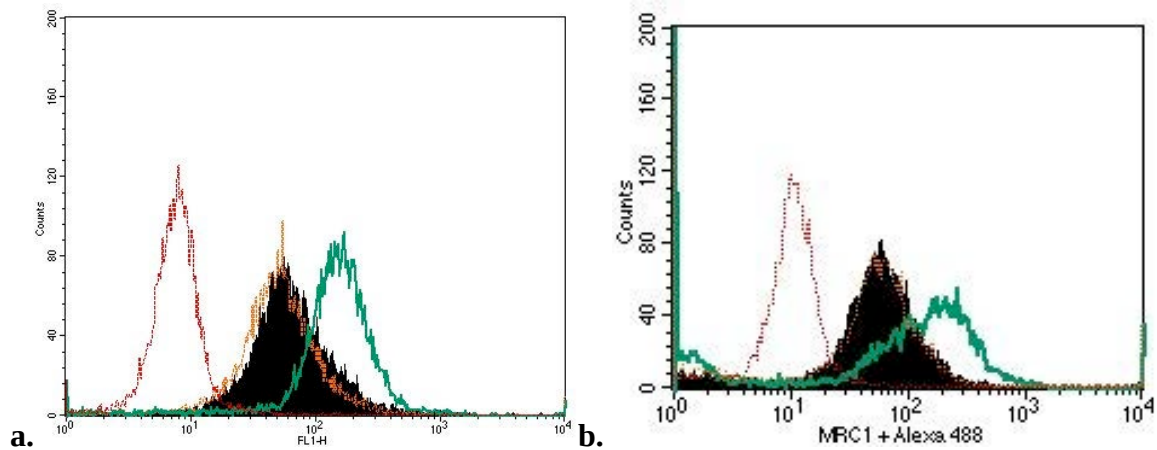


Figure 3.4. Expression de MRC1 dans des macrophages M0 (cellules contrôles) et M2, analysée par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-MRC1 (dilution : 10 x (a) et 50 x (b)) a été testé sur des macrophages M0 et M2. Cet anticorps est révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (dilution : 100 x (a) et 200 x (b)). Les cellules sont lavées avec du dPBS + 0.01 % d'azide de sodium en présence de BSA 1 % (a) ou 3 % (b). Un anticorps anti-récepteurs Fc a été ajouté afin de réduire le bruit de fond dans les deux analyses.

(Noir : cellules contrôles M0 ; Vert : macrophages M2 ; Orange : contrôle anticorps secondaire (sans anticorps primaire) ; Rouge : contrôle anticorps primaire (sans anticorps secondaire)).

(p value = 0,8115). De la même manière, nous observons peu ou pas d'expression des gènes marqueurs M2 dans les macrophages M1.

Nous avons également testé un temps de polarisation plus long en traitant les cellules 24 heures avec les milieux de polarisation M1 ou M2 (*Fig.3.3*). Ce temps de polarisation prolongé a eu pour conséquence une amélioration de la polarisation M2 : en effet, l'induction de *MRC1* et de *CD36* est devenue significative. Cependant, il s'avère que les inductions de l'expression des marqueurs M1 sont beaucoup moins marquées à ce temps de polarisation.

Nous pouvons donc conclure que, sur la base de l'expression relative des marqueurs géniques M1 et M2 mesurée par qRT-PCR, les macrophages de la lignée RAW 264.7 semblent pouvoir se polariser en macrophages pro-inflammatoires (M1) et anti-inflammatoires (M2).

Le temps de polarisation de 18 heures a été choisi, puisqu'il semble être le meilleur compromis pour la surexpression des marqueurs M1 et M2, respectivement dans les cellules M1 et M2.

3.1.2.3. Expression des gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par cytométrie de flux

a. Etude de l'expression d'un marqueur génique M2, *MRC1*, par cytométrie de flux

Ensuite, nous avons voulu valider le protocole de polarisation en mesurant l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 au niveau protéique. Pour ce faire, la technique de cytométrie de flux (FACS) a été choisie.

Tout d'abord, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'expression de *MRC1*, un marqueur des cellules M2.

Nous avons à nouveau dû procéder à quelques mises au point en ce qui concerne cette expérience.

En premier lieu, nous avons décidé d'ajouter directement un anticorps anti-récepteurs Fc aux cellules afin de diminuer le bruit de fonds. En effet, cet anticorps a la propriété de bloquer les récepteurs *FcγrIII* et *FcγrII* (alias *CD16/CD36*) mais aussi les récepteurs *FcγrI* (*CD64*), exprimés en surface des macrophages. Cela permet d'éviter ainsi la liaison non-spécifique des anticorps primaires et secondaires.

La première expérience réalisée nous a permis d'obtenir des résultats intéressants : un déplacement de la fluorescence a été observé entre les macrophages M0 (macrophages contrôles) et M2, pour l'expression de *MRC1*. La courbe correspondant au contrôle anticorps secondaire (contrôle sans ajout d'anticorps primaire) est superposée à celle des cellules contrôles M0. Cependant, de manière attendue, la courbe du contrôle anticorps primaire (contrôle sans ajout d'anticorps secondaire fluorescent) est déplacée vers la gauche par rapport aux deux autres courbes contrôles (*Fig. 3.4a*). Ainsi ces résultats mènent déjà à la conclusion que le protocole de polarisation semble fonctionner dans le cas des macrophages M2.

Malgré ces résultats, nous observons toujours du bruit de fonds avec du marquage aspécifique (*Fig. 3.4a*). Nous avons d'abord testé la BSA (Bovine Serum Albumin) à une concentration de 3 %, à la place de 1 % préconisé dans le protocole. Nous avons également testé une autre BSA, purifiée à 98 % : elle était supposée réduire le bruit de fonds, mais aucune amélioration notable n'a été constatée (*Fig. 3.4b*). Nous avons alors décidé d'utiliser du sérum murin afin de diminuer ce marquage aspécifique. Pour ce faire, trois souris ont été sacrifiées, leur séra

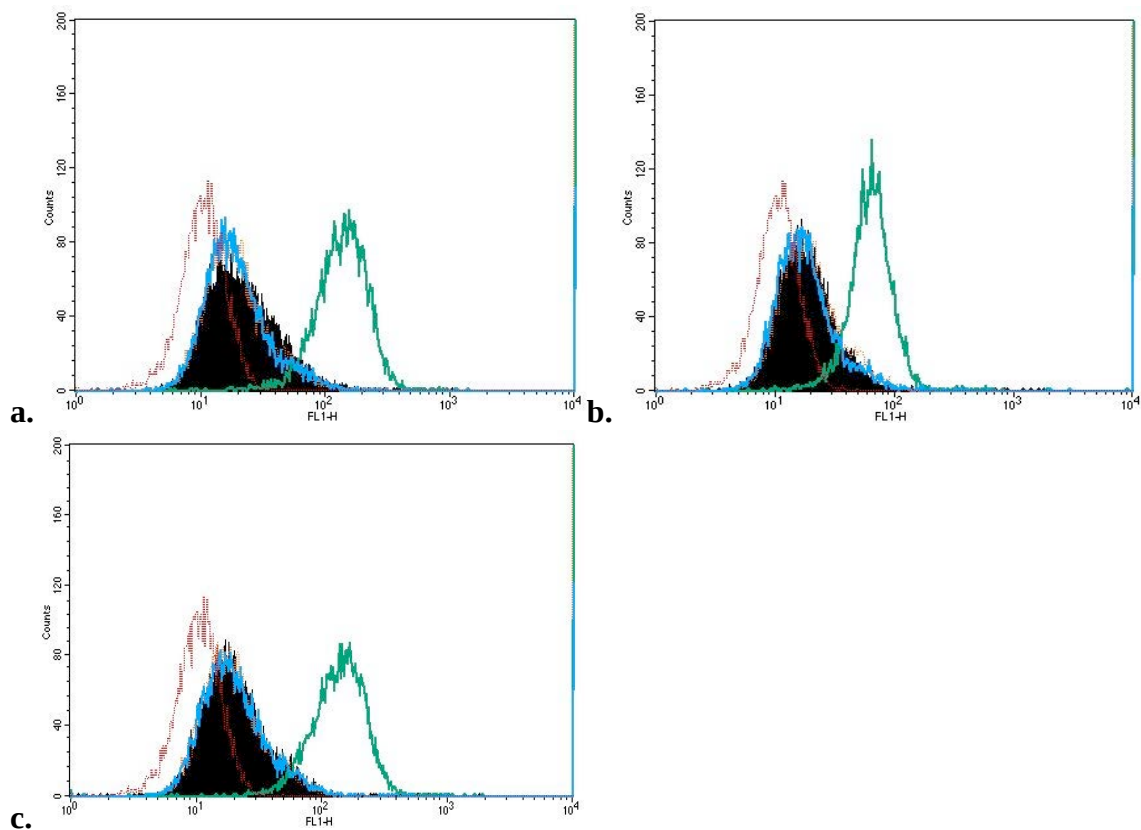


Figure 3.5. Expression de MRC1 dans des macrophages M0, M1 et M2, analysée par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-MRC1 (dilution : 10 x (a), 20 x (b) et 50 x (c)) a été testé sur des macrophages M0, M1 et M2. Cet anticorps est révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (dilution : 100 x). Les cellules sont lavées avec du dPBS + 1 % de sérum de souris + 0.01 % d'azide de sodium. Un anticorps anti-récepteurs Fc a été ajouté afin de réduire le bruit de fond.

(Noir : cellules contrôles M0 ; Bleu : macrophages M1 ; Vert : macrophages M2 ; Orange : contrôle anticorps secondaire (sans anticorps primaire) ; Rouge : contrôle anticorps primaire (sans anticorps secondaire)).

ont été collectés et ont été utilisés pour remplacer la BSA dans la solution de dPBS. Dans les expériences où le dPBS + 1 % de sérum murin a été utilisé (*Fig. 3.5*), nous pouvons observer une diminution du marquage aspécifique en comparaison aux expériences utilisant la BSA dans la solution de « blocking » (*Fig. 3.4*).

Les autres manipulations avec sérum murin ont été faites à partir de sérum commercialisé, avec des résultats comparables.

De plus, dans cette même expérience, différentes dilutions (10 x, 20 x, 50 x) de l'anticorps primaire ont été testées. A la *figure 3.5*, nous pouvons toujours observer un déplacement de la fluorescence émise par les cellules M2, quelle que soit la dilution. Les courbes étant assez similaires, la dilution 50 x de l'anticorps primaire anti-MRC1 a donc été sélectionnée.

Différentes dilutions (200 x, 500 x, 1000 x) de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 ont également été testées, mais sans résultats satisfaisants (données non montrées). La dilution 200 x a donc été conservée.

Au vu de ces résultats et de ces mises au point (dPBS + 1 % sérum murin + 0,1 % azide de sodium, anticorps primaire anti-MRC1 dilué 50 x, anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 dilué 200 x), nous pouvons tirer la conclusion que la polarisation des macrophages RAW 264.7 en macrophages M2 peut être validée par l'analyse en cytométrie de flux. En effet, nous pouvons constater au travers des résultats présentés dans les *figures 3.4* et *3.5*, qu'il y a un déplacement évident et reproductible de la fluorescence émise par les cellules polarisées M2 par rapport aux cellules contrôles. Ce déplacement suggère une surexpression de MRC1 au niveau protéique, confirmant les résultats obtenus par la technique de qRT-PCR, du moins pour *MRC1*.

b. Etude de l'expression d'un marqueur génique M1, CD86, par cytométrie de flux

La deuxième partie de l'étude de l'expression des gènes marqueurs de la polarisation au niveau protéique concerne l'étude de l'expression d'un marqueur M1, CD86 (B7-2).

CD86 est un immuno-récepteur impliqué dans les signaux de co-stimulation essentiels pour l'activation et la survie des cellules T, en partenariat avec CD80. Leurs co-récepteurs sont les molécules CD28 et CTLA-4 (alias CD152) [(Kariv et al., 1996), (Podojil and Sanders, 2005), (Sansom et al., 2003)]. Ce marqueur a été choisi puisqu'il avait déjà été utilisé par Hirose et son équipe (2011). Il a constaté que l'expression de CD86 est plus élevée dans les cellules M1 que dans les cellules M2 (macrophages humains dérivés de monocytes) (Hirose et al., 2011).

Tout comme chez Hirose, l'anticorps primaire anti-CD86 est couplé directement à la phycoérythrine (PE), ce qui a pour conséquence de diminuer le bruit de fonds. En effet, le nombre d'étapes lors de la manipulation est diminué. De plus, les cellules peuvent émettre de l'auto-fluorescence : utiliser la phycoérythrine en cytométrie de flux est un avantage puisque les « molécules auto-fluorescentes émettent davantage aux longueurs d'onde de la fluorescéine et de l'isothiocyanate » (Imbert-Marcille et al, 1999).

De la même manière que l'étude de l'expression du marqueur MRC1, l'anticorps anti-récepteurs Fc a été ajouté afin de réduire tout bruit de fonds résiduel.

De plus, l'anticorps IgG2ak de souris (G155-178), couplé à la phycoérythrine, a été commandé et constitue un contrôle isotypique dans cette expérience. Ce contrôle isotypique est un contrôle négatif qui permet de vérifier la spécificité des marquages des anticorps monoclonaux de même isotype (c'est-à-dire de vérifier l'absence de marquage aspécifique).

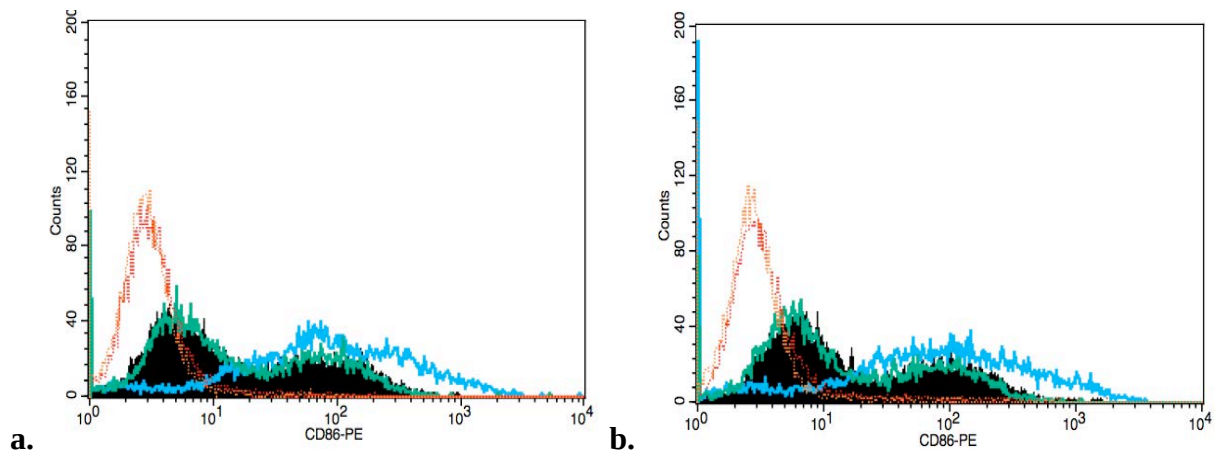


Figure 3.6. Expression de CD86 dans des macrophages M0, M1 et M2, analysée par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-CD86 (dilution : 25 x) a été testé sur des macrophages M0, M1 et M2. Cet anticorps est couplé à la phycoérythrine (PE). Les cellules sont lavées avec du dPBS + 1 % BSA (a) ou 1 % de sérum de souris (b) + 0.01 % d'azide de sodium. Un anticorps anti-récepteurs Fc a été ajouté afin de réduire le bruit de fond.

De plus, un anticorps IgG2aκ de souris (contrôle isotypique) couplé à la phycoérythrine est utilisé afin de vérifier la spécificité des marquages de l'anticorps monoclonal de même isotype.

(Noir : cellules contrôles M0 ; Bleu : macrophages M1 ; Vert : macrophages M2 ; Orange : macrophages non marqués (sans anticorps primaire) ; Rouge : contrôle isotype IgG2a κ).

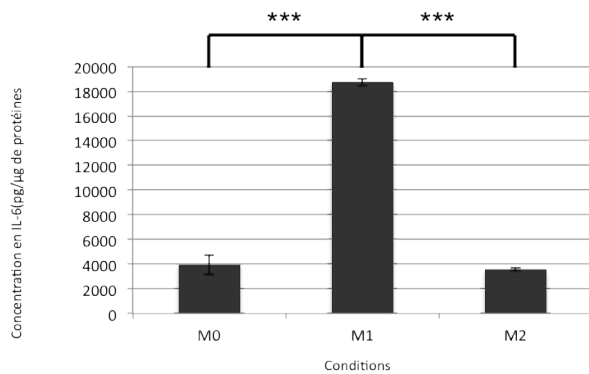


Figure 3.7. Production d'IL-6 (marqueur M1), mesurée par ELISA, dans les surnageants de macrophages M0, M1 et M2.

La polarisation M1 est confirmée via la détection de la production d'IL-6.

Les résultats sont exprimés en pg/μg de protéines comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). *** très hautement significatif ($p < 0.001$).

Un déplacement de la fluorescence est observé lorsqu'on compare les macrophages M1 et les macrophages M2 ou M0 (cellules contrôles) en ce qui concerne l'expression de CD86 (anticorps anti-CD86 : dilution 25 x) (*Fig. 3.6*). La courbe correspondant au contrôle isotypique ainsi que celle correspondant aux cellules non marquées (sans ajout d'anticorps) sont déplacées vers la gauche par rapport à celle des cellules contrôles et se superposent parfaitement (M0).

Si les cellules M1 surexpriment bien le CD86, il faut cependant souligner la grande hétérogénéité dans l'expression de CD86, illustrée par l'étalement de la courbe bleue (*Fig. 3.6*). En outre, de manière surprenante, lorsqu'on examine la courbe verte correspondant aux macrophages M2 et le profil noir correspondant aux cellules M0, nous distinguons deux sous-populations, l'une majoritaire n'exprimant que peu le CD86 et une deuxième surexprimant le CD86.

Que la solution de « blocking » contienne 1 % de BSA (*Fig. 3.6a*) ou 1 % de sérum murin (*Fig. 3.6b*), dans ce cas-ci, aucun changement notable dans la diminution du bruit de fonds n'est à rapporter.

Ces résultats confirment la polarisation des cellules M1, au niveau protéique. Ils seront toutefois renforcés par une autre technique, l'ELISA, mesurant l'expression de l'IL-6.

3.1.2.4. Etude de l'expression du gène marqueur M1, IL-6, par ELISA

Etant donné que les macrophages M1 semblent fragilisés par le traitement prolongé avec le LPS, nous avons voulu utiliser une autre technique pour suivre l'expression d'un marqueur M1 au niveau protéique, l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). En effet, il suffit de prélever le surnageant. Les cellules ne subissent donc pas de manipulations comme en cytométrie de flux. Nous avons donc choisi d'utiliser cette technique afin d'étudier la production d'IL-6 dans les macrophages polarisés ou non. L'étude de la production de cette cytokine pro-inflammatoire permet en effet de valider le protocole de polarisation des macrophages RAW 264.7 M0 en macrophage M1.

Comme attendu, les résultats de l'ELISA montrent que les cellules M1 produisent de l'IL-6 en quantité plus importante (~ 18700 pg/μg de protéine) par rapport aux cellules M0 (~ 3900 pg/μg de protéine) ou M2 (~ 3600 pg/μg de protéine) (*Fig. 3.7*). Cette augmentation de la production d'IL-6 par les cellules M1 est très hautement significative par rapport aux cellules contrôles ou par rapport aux cellules M2.

Ces résultats confirment que le « cocktail » de polarisation M1 (LPS/IFNγ) est capable d'induire un phénotype pro-inflammatoire chez les macrophages RAW 264.7.

Le protocole de polarisation a donc été confirmé pour une série de gènes marqueurs, tant au niveau ARNm, qu'au niveau protéique.

3.1.2.5. Expression de gènes codant pour les récepteurs « scavenger » ou pour les transporteurs de LDLs, étudiée par qRT-PCR

Enfin, puisque la deuxième partie du mémoire repose sur l'étude de l'interférence des LDLs sur la polarisation des macrophages, nous avons aussi étudié l'expression de quelques récepteurs « scavenger » ou de transporteurs de lipoprotéines au niveau de ces macrophages contrôles (M0) et polarisés (M1 et M2). En effet, nous nous sommes demandé si la polarisation affectait l'expression des gènes codant ces récepteurs et transporteurs. L'ensemble de ces résultats est présenté à la *figure 3.8*.

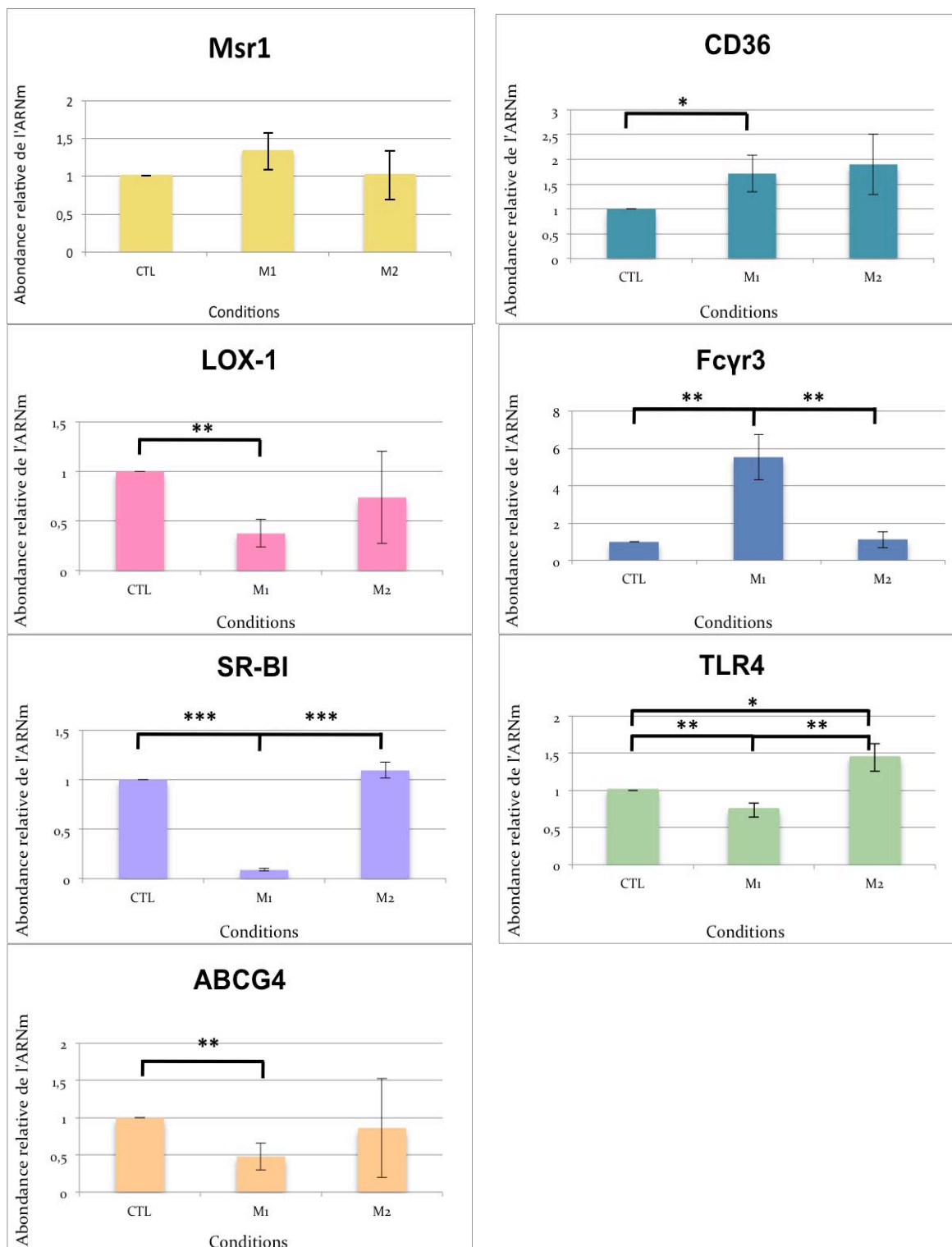


Figure 3.8. Expression de récepteurs « scavenger » et transporteurs aux LDLs après 18 heures de polarisation dans des cellules M0, M1 et M2, mesurée par qRT-PCR.

L'expression de récepteurs « scavenger » ou des transporteurs aux lipoprotéines tels que *Msr1*, *CD36*, *LOX-1*, *FcγR3*, *TLR4*, *SR-BI* et *ABCG4* a été étudiée au niveau de cellules RAW polarisées ou non. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * significatif ($p < 0.05$) ; ** hautement significatif ($p < 0.01$).

Dans l'ensemble, la polarisation ne semble pas induire de différences spectaculaires dans l'expression de ces gènes. On observe tout de même une augmentation de l'expression de *FcγrIII* dans les macrophages pro-inflammatoires par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation est très significative. Il n'y a pratiquement pas de variation de l'expression de ce gène dans les macrophages M2 en comparaison avec les cellules M0 (Fig. 3.8).

De façon intéressante, nous pouvons observer une diminution de l'expression de *SR-BI* dans les macrophages M1 par rapport aux macrophages M0. Cette diminution de l'expression est très hautement significative et semble logique sachant que SR-BI est impliqué dans le transport réverse du cholestérol et qu'on lui attribue généralement un rôle plutôt anti-athérogène et anti-inflammatoire (Fig. 3.8).

Dans le cas d'*ABCG4* et *LOX-1*, nous observons une diminution, très significative, de leur expression dans les macrophages M1 par rapport aux cellules M0. Leur expression ne varie pratiquement pas dans les cellules M2 par rapport aux cellules M0 (Fig. 3.8).

Enfin, *CD36*, le récepteur « scavenger » responsable de l'endocytose de LDLs modifiées et particulièrement au niveau des lipides, ne montre pratiquement pas de variation d'expression, que ce soit dans les macrophages M1 ou M2.

De manière étonnante, le *TLR4* est légèrement surexprimé dans les macrophages M2 (Fig. 3.8).

3.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur les macrophages polarisés (M1/M2) ou non (M0)

Pour tester la capacité des macrophages polarisés ou non à internaliser des LDLs, nous évaluerons l'effet des LDLs natives et des LDLs modifiées sur ces macrophages. Les LDLs oxydées sont obtenues soit par incubation avec le CuSO_4 pour obtenir des Ox-LDLs (modifiées au niveau des lipides avec accumulation d'hydroperoxydes lipidiques et au niveau des protéines) ou avec de la rhMPO pour obtenir des Mox-LDLs (modifiées surtout au niveau de la fraction protéique, ne contenant pas d'hydroperoxydes lipidiques).

Calay et al (2010) ont montré que les macrophages M0 sont capables de se différencier en cellules spumeuses, après une incubation avec des Ox-LDLs ou des Mox-LDLs. Cependant, cette charge en lipides est plus importante lorsqu'ils sont mis en présence de Mox-LDLs (Calay et al., 2010).

C'est une des raisons pour laquelle, dans la deuxième partie de ce mémoire, nous nous sommes penchés sur l'évaluation de la capacité des macrophages polarisés M1 et M2 à accumuler des LDLs modifiées.

Les macrophages polarisés M1 et M2 (18 heures de polarisation) ont ainsi été incubés en présence de LDLs natives, d'Ox-LDLs ou de Mox-LDLs, à raison de 200 $\mu\text{g/ml}$, pendant 12 heures ou 24 heures.

L'expression des gènes marqueurs M1 et M2, ainsi que des récepteurs « scavenger » et des transporteurs aux lipoprotéines, a été étudiée afin de vérifier toute variation de leur expression suite à la charge en LDLs.

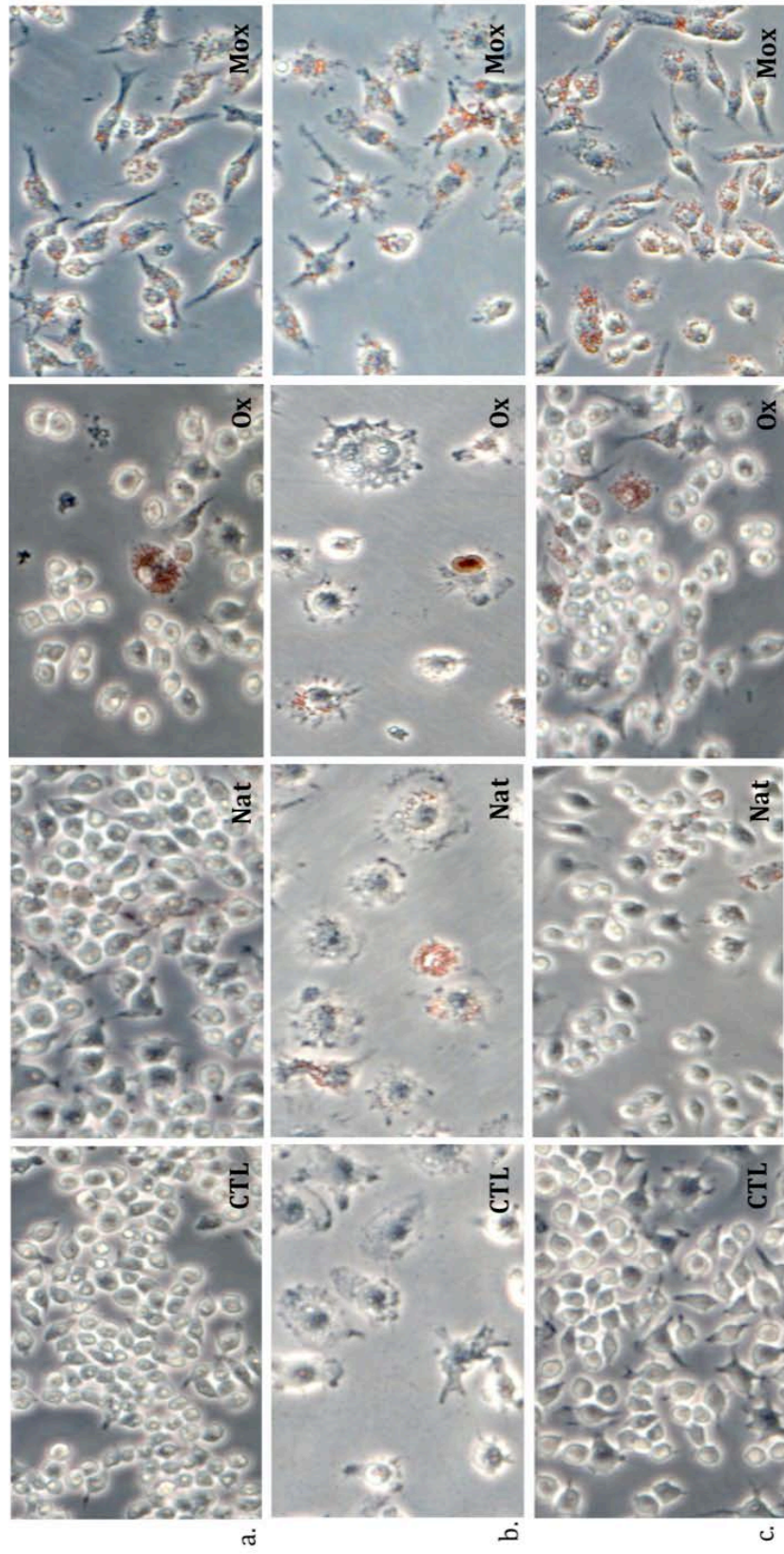


Figure 3.9. Coloration par Oil Red O de cellules RAW M0, polarisées M1 et M2, stimulées ou non avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs) (200 $\mu\text{g/ml}$).

Les lipides neutres des cellules spumeuses M0 (a), M1 (b) et M2 (c), stimulées ou non, ont été révélés avec le colorant Oil Red (objectif : 20 x).

Les techniques de qRT-PCR et de cytométrie de flux ont été choisies, ainsi que la technique de coloration à l'Oil Red O et de marquage au Bodipy permettant de quantifier la charge en lipides.

3.2.1. Analyse morphologique des cellules spumeuses contrôles et polarisées

3.2.1.1. Observation et quantification de la charge en lipides dans les macrophages polarisés ou non, par coloration à l'Oil Red O

Les lipides neutres internalisés dans les macrophages ont été colorés par l'Oil Red O (ou ORO). Cette coloration permet de visualiser la formation de cellules spumeuses.

Dans le cas de cellules M0, nous observons très clairement que ces macrophages, en présence de Mox-LDLs, se chargent en lipides de façon abondante, formant des cellules spumeuses. Ces cellules présentent de plus la caractéristique d'être étendues et munies de longues extensions cytoplasmiques (*Fig. 3.9a*).

Cependant, les cellules RAW M0, incubées en présence d'Ox-LDLs, semblent être moins enclines à internaliser ces LDLs. Seulement quelques cellules spumeuses sont observées. Les raisons en sont encore inconnues, sachant que les récepteurs aux Ox-LDLs sont exprimés dans les macrophages M0. Au contraire des cellules spumeuses chargées en Mox-LDLs, celles-ci ont une morphologie plutôt arrondie (*Fig. 3.9a*).

Les cellules M0 ne semblent pas se différencier en cellules spumeuses lorsqu'elles ont été incubées en présence de LDLs natives. En effet, comme dit précédemment dans l'introduction (« 1.2.2.2.1.1. Le récepteur aux LDLs natives »), le récepteur aux LDLs natives ou LDL-R est régulé par la concentration intracellulaire en cholestérol. La cellule prélève donc la quantité de cholestérol nécessaire, sans l'accumuler sous forme de gouttelettes lipidiques.

Des macrophages au phénotype M1 ont également été incubés avec des Nat-LDLs, des Ox-LDLs ou des Mox-LDLs. De même, la formation de cellules spumeuses est observée pour la plupart des cellules M1, lorsqu'elles sont incubées en présence de Mox-LDLs (*Fig. 9b*). Cependant, en plus d'internaliser des Mox-LDLs et des Ox-LDLs, les cellules M1 accumulent aussi étonnamment des Nat-LDLs (*Fig. 3.9b*). L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène serait que les macrophages M1 possèdent un métabolisme oxydatif exacerbé, suite à la stimulation avec le LPS. Cela pourrait avoir comme conséquence que les Nat-LDLs s'oxydent pendant l'incubation de 24 heures, ce qui permettrait leur accumulation intracellulaire.

Enfin, des macrophages M2 ont aussi été mis en présence de LDLs natives ou modifiées pendant 24 heures. A l'instar des cellules M0, elles ne deviennent pas spumeuses en présence de Nat-LDLs. Néanmoins, on observe des cellules spumeuses formées à partir d'une stimulation avec des Ox-LDLs, bien que peu nombreuses. Par contre, pratiquement tous les macrophages M2 deviennent spumeux, en présence de Mox-LDLs (*Fig. 3.9c*). Ce phénomène est semblable à celui observé chez les macrophages M0 (*Fig. 3.9a*), bien qu'il semblerait que l'internalisation des Mox-LDLs soit encore plus importante pour les macrophages M2. Cette observation est qualitative et devrait donc être confirmée.

Nous avons essayé de quantifier l'accumulation des lipides par une mesure de la D.O. après coloration des cellules avec l'ORO (Calay et al., 2010). Mais nous avons rencontré des difficultés avec la re-dissolution de l'ORO dans l'éthanol. Nous avons donc préféré un colorant fluorescent, le Bodipy.

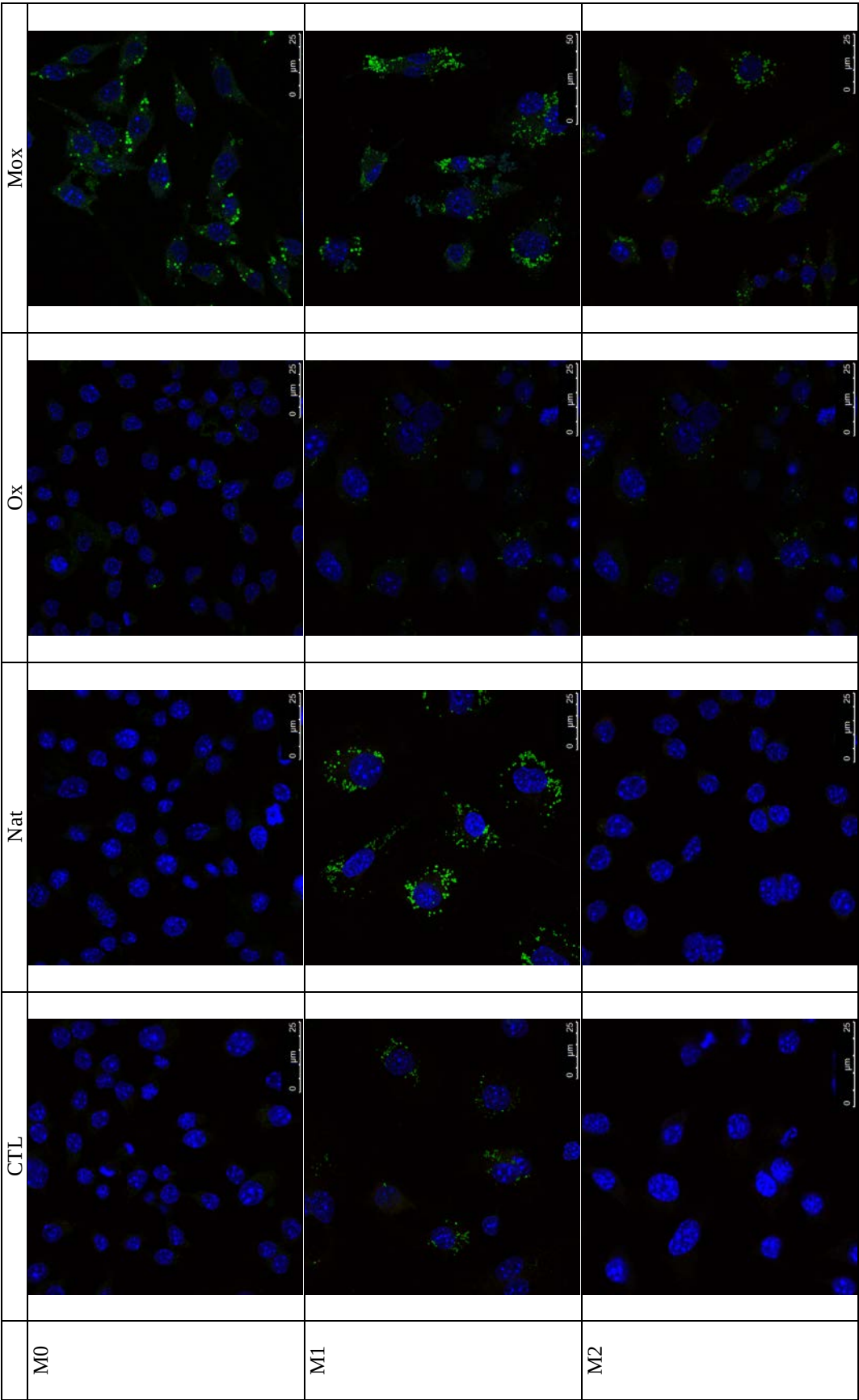


Figure 3.10. Marquage au Bodipy de cellules RAW M0, polarisées M1 et M2 stimulées ou non avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs) (200 µg/ml).

Les lipides neutres sont marqués avec le Bodipy 493/503 et les noyaux sont révélés avec le To-PRO.

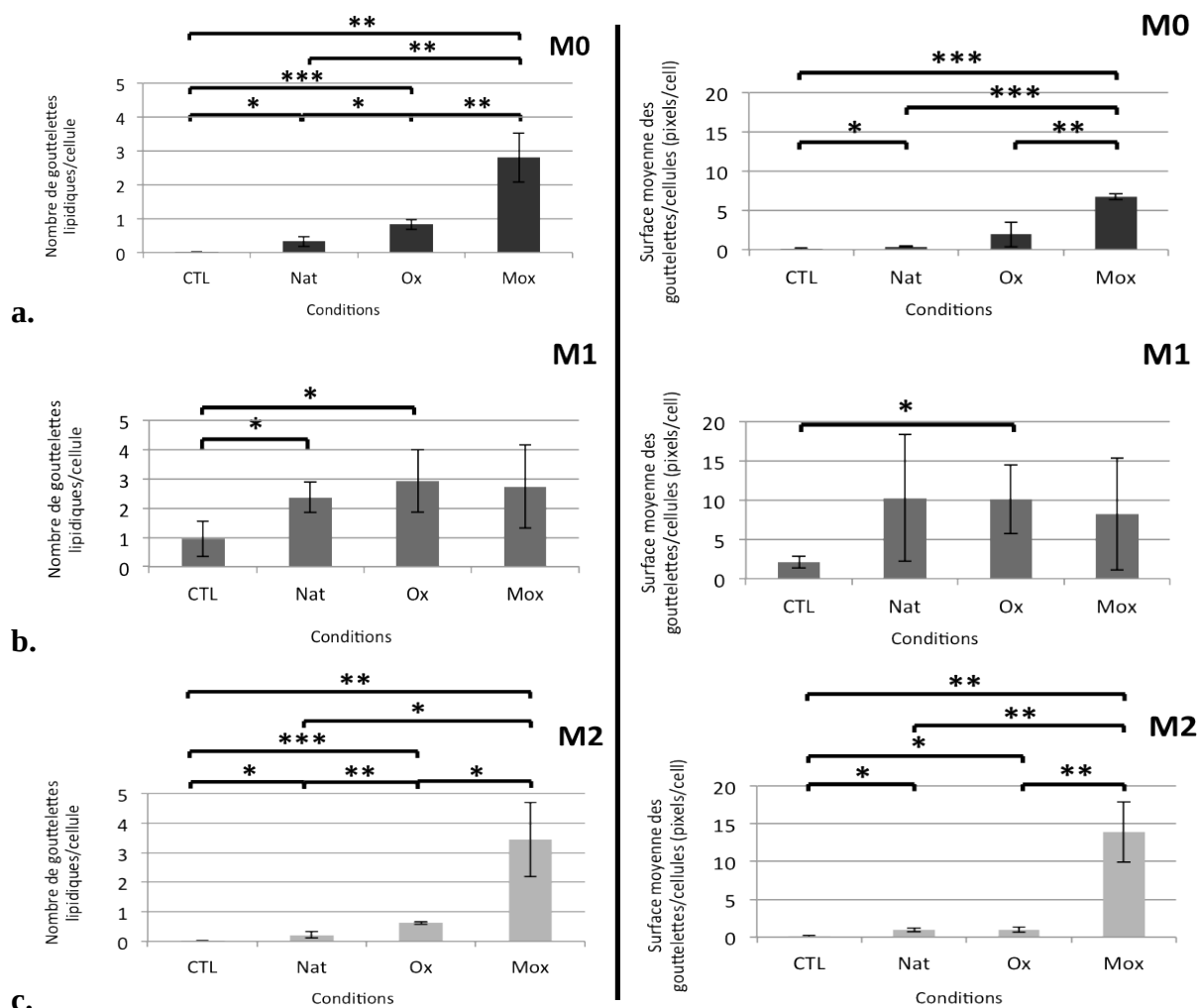


Figure 3.11. Quantification de la charge en lipides dans les macrophages RAW M0 et polarisés M1 et M2, stimulés ou non avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs) (200 µg/ml).

La charge en lipides a été mesurée grâce au logiciel du BD Pathway (BD Biosciences, USA).

Le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule a été calculé (gauche) ainsi que la surface moyenne de ces gouttelettes (droite), dans les cellules M0 (a), M1 (b) et M2 (c).

Les résultats sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * **significatif** ($p < 0.05$) ; ** **hautement significatif** ($p < 0.01$) ; *** **très hautement significatif** ($p < 0,001$).

3.2.1.2. Observation et quantification de la charge en lipides dans les macrophages polarisés ou non, par marquage avec le Bodipy

Etant donné que la quantification de la charge en LDLs s'est révélée non concluante avec la coloration à l'Oil Red O, nous avons opté pour un marquage au Bodipy, qui permet l'examen des cellules en microscopie à fluorescence et la quantification des lipides en fluorimétrie. Cette sonde fluorescente a la particularité de se lier aux lipides neutres et aux triglycérides notamment.

Les cellules M0 ou contrôles ne deviennent pas spumeuses après ajout de Nat-LDLs comme le confirme la *figure 3.10*. Ceci est cohérent avec la théorie. Peu de cellules internalisent les Ox-LDLs lorsqu'elles sont stimulées 24 heures avec elles (*Fig. 3.10*). Cependant, lorsqu'elles sont stimulées de la même manière avec les Mox-LDLs, les macrophages M0 se chargent en lipides, stockés sous forme de gouttelettes (*Fig. 3.10*).

Les mêmes observations sont réalisées pour les macrophages M2. Néanmoins, ces cellules semblent internaliser plus d'Ox-LDLs que les macrophages M0 (*Fig. 3.10*).

A l'instar des macrophages M0 et M2, les macrophages M1 forment des cellules spumeuses en présence de Mox-LDLs. Nous pouvons observer que ces cellules internalisent également de grandes quantités d'Ox-LDLs, mais aussi de Nat-LDLs. Il est possible que, suite à l'activation par le LPS, ces cellules possèdent un métabolisme oxydatif exacerbé, oxydant alors les LDLs natives pendant leur incubation avec les macrophages.

Une quantification de ces résultats a été réalisée grâce à la technologie du BD Pathway 855 acquise très récemment au laboratoire (BD Biosciences, USA). Ces résultats sont conformes aux conclusions émanant des observations précédentes. En effet, dans les cellules M0 et M2, la charge en lipides est plus importante lorsque les cellules sont stimulées avec les Mox-LDLs. L'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques par cellule est très significative (*Fig. 3.11a* et *3.11c*). Cependant, la surface moyenne des gouttelettes par cellule semble plus importante au niveau des cellules M2 en comparaison avec les cellules M0 (*Fig. 3.11a* et *3.11c*).

Il y a également une légère augmentation, très hautement significative, du nombre de gouttelettes lorsque les cellules M0 ou M2 sont stimulées avec les Ox-LDLs (*Fig. 3.11a* et *3.11c*).

Comme pour les cellules observées au microscope confocal, les macrophages M1 internalisent les Ox-LDLs, les Mox-LDLs mais aussi les Nat-LDLs. Cette augmentation est significative dans le cas d'une stimulation avec les Nat-LDLs et les Ox-LDLs (*Fig. 3.11b*). Toutefois, vu la nouveauté de l'équipement, le marquage des noyaux et du cytoplasme n'a pas été fait dans des conditions optimales. Cette manipulation sera à refaire, avec cette fois un marquage du noyau avec le DAPI et du cytosol avec la phalloïdine conjuguée à l'Alexa-555.

3.2.1.3. Observation des cellules spumeuses polarisées ou non, au microscope holographique digital

La technique de microscopie holographique digitale a été utilisée en complément des deux techniques précédentes. Ce microscope ne permet pas encore à l'heure actuelle de quantifier la charge en lipides, mais des ajustements sont réalisés actuellement par Aude Sauvage au laboratoire d'URBC, dans le cadre du projet BioWin Bioline. Cette approche a l'avantage d'analyser les cellules vivantes, sans fixation et sans coloration préalables des lipides.

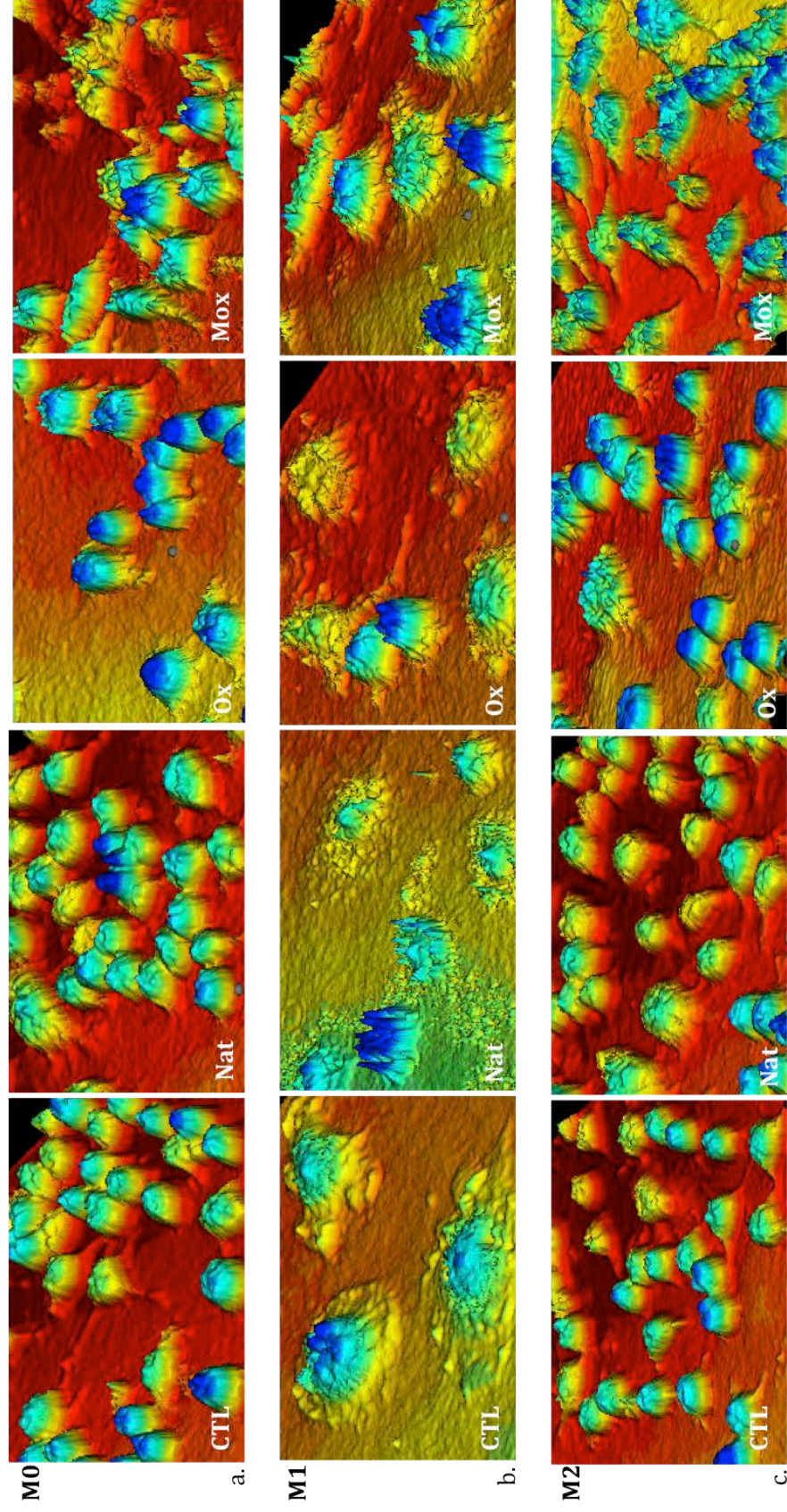
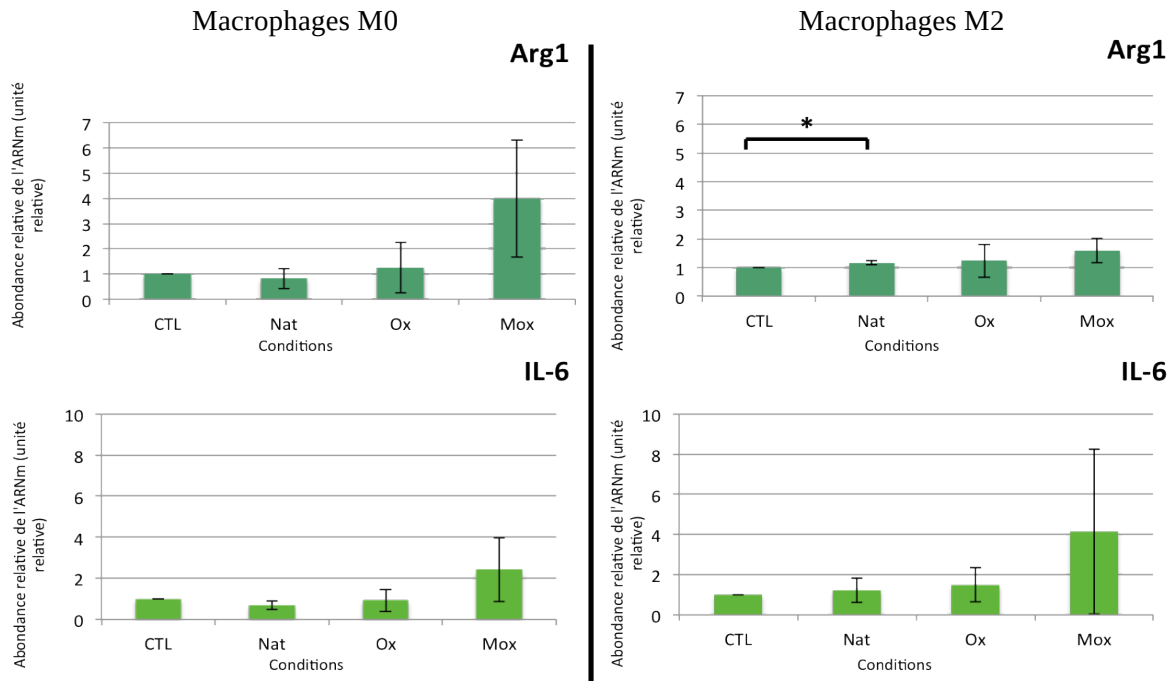


Figure 3.12. Macrophages RAW 264.7 M0 (a), polarisés M1 (b) et M2 (c), stimulés avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs) (200 $\mu\text{g/ml}$), observés au microscope holographique digital.
 Les macrophages RAW sont préalablement polarisés vers les phénotypes M1 et M2 pendant 18 heures, puis stimulés pendant 24 heures avec les Nat-LDLs, Ox-LDLs ou Mox-LDLs. Ils sont ensuite observés par microscopie holographique digitale.
 Ce microscope ne nécessite pas de fixation des cellules pour l'observation (objectif : 40x).

12h de stimulation



24h de stimulation

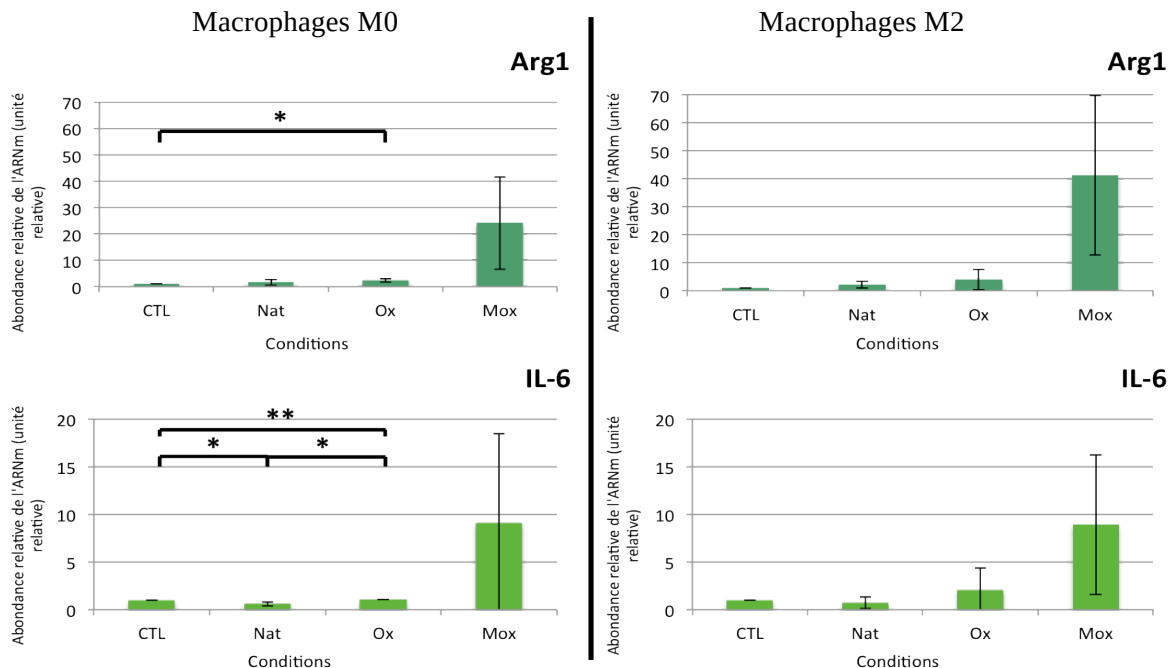
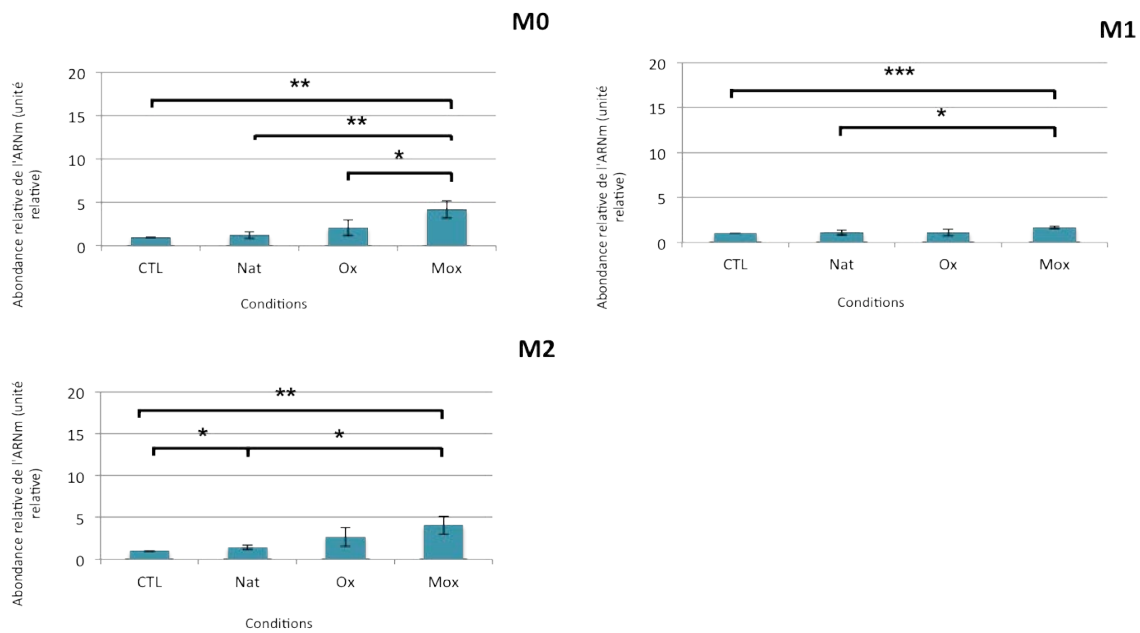


Figure 3.13. Expression de gènes encodant l'IL-6 (marqueur M1) et l'Arg1 (marqueur M2) après 18 heures de polarisation, suivie d'une stimulation avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs), dans des cellules M0 et M2, mesurée par qRT-PCR.

L'abondance en ARNm pour les deux gènes marqueurs a été mesurée via la technique de qRT-PCR. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * significatif ($p < 0.05$) ; ** hautement significatif ($p < 0.01$).

12h de stimulation



24h de stimulation

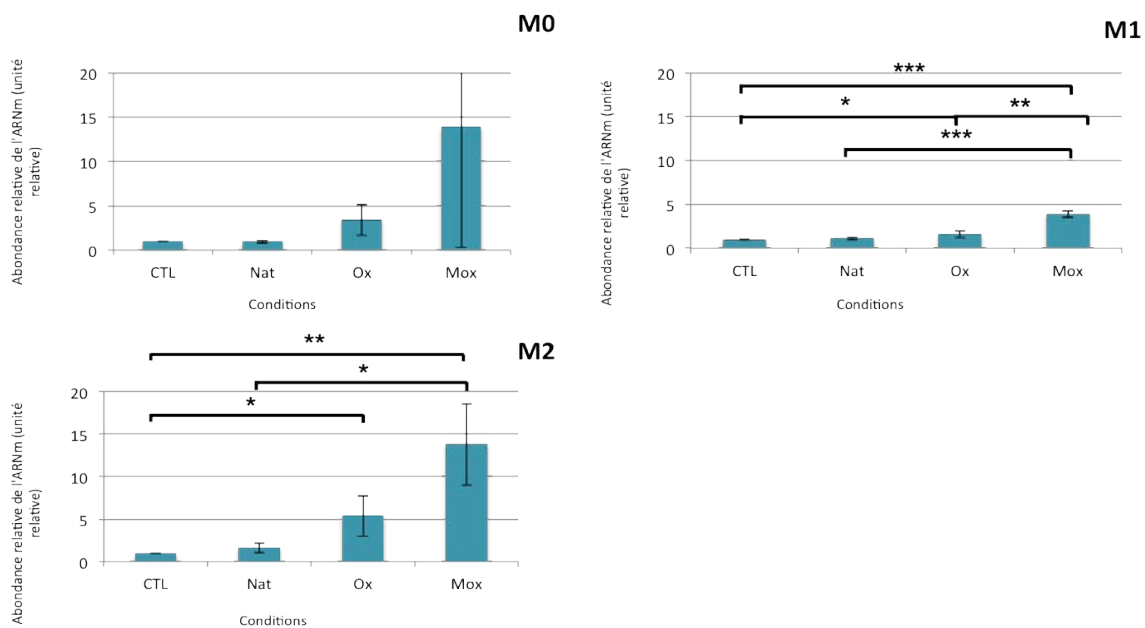


Figure 3.14. Expression du marqueur génique *CD36*, mesurée par qRT-PCR, pour des macrophages M0, M1 et M2, incubés ensuite pendant 12 ou 24 heures avec des LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs).

L'abondance en ARNm pour *CD36* a été mesurée via la technique de qRT-PCR.

Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm \text{SD}$). * significatif ($p < 0.05$) ; ** hautement significatif ($p < 0.01$) ; *** très hautement significatif ($p < 0.001$).

Grâce au mode 3D du microscope, nous pouvons observer que les cellules M0 sont capables de se différencier en cellules spumeuses lorsqu'elles sont stimulées avec les Mox-LDLs pendant 24 heures. En effet, lorsque les cellules sont chargées en lipides, nous observons la présence de « crêtes » correspondant aux LDLs internalisées. De plus, nous pouvons également ici constater que les cellules ayant internalisé les Mox-LDLs ont une morphologie étendue avec de longues extensions cytoplasmiques. Tandis que les cellules stimulées avec des Ox-LDLs ont une morphologie plus arrondie (Fig. 3.12a).

Nous remarquons également la présence de ces « crêtes » dans des cellules M1, qu'elles soient stimulées avec les Nat-LDLs, les Ox-LDLs ou les Mox-LDLs. Les cellules M1 deviennent donc peut-être spumeuses, quel que soit le type de LDLs, à cause de leur plus grande perméabilité ou de leur métabolisme oxydatif exacerbé (Fig. 3.12b).

Les macrophages M2 ont un comportement pratiquement similaire à celui des macrophages M0, comme observé avec les techniques de coloration avec l'Oil Red O et le Bodipy. En effet, les cellules M2, incubées en présence de Mox-LDLs, deviennent toutes spumeuses. Quelques cellules spumeuses chargées en Ox-LDLs sont également dénombrées. Cette technique permet aussi de mettre en évidence la morphologie plus étendue des macrophages M2 (Fig. 3.12c).

3.2.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur l'expression génique de macrophages polarisés ou non

Après l'étude de l'effet des LDLs sur la morphologie des cellules spumeuses M0 et polarisées, nous avons décidé d'étudier l'expression des gènes marqueurs M1 et M2 aux niveaux ARNm et protéique, ainsi que celle des récepteurs « scavenger » et des transporteurs aux LDLs au niveau ARNm, comme fait précédemment pour la partie « Polarisation des macrophages RAW 264.7 ».

3.2.2.1. Effets sur l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par qRT-PCR

Les cellules ont été polarisées pendant 18 heures, comme décrit précédemment, et ensuite incubées avec des LDLs natives ou oxydées (Ox-LDLs ou Mox-LDLs) pendant 12 et 24 heures.

Pour chaque temps, nous avons déterminé par qRT-PCR l'expression de gènes marqueurs M1 (*IL-6*, *TNF α* , *iNOS* et *Arg2*) et de gènes marqueurs M2 (*CD36*, *MRC1* et *Arg1*).

Les résultats obtenus par qRT-PCR, à 12 heures et 24 heures de stimulation avec les LDLs, ne sont malheureusement que partiellement utilisables en raison d'une trop grande variabilité entre les réplicats. Cette variabilité s'explique sans doute en partie par le stress subi par les cellules, causé par la combinaison de la polarisation et de la stimulation avec les LDLs.

Nous n'avons donc représenté les résultats que pour un gène marqueur M1, *IL-6*, et un gène marqueur M2, *Arg1*, pour les macrophages M0 et M2 (Fig. 3.13), et également pour *CD36* (pour les macrophages M0, M1 et M2) (Fig. 3.14).

Cependant, nous pouvons quand même constater que, dans l'ensemble, les LDLs natives n'ont pratiquement pas d'effets. Ces LDLs servent de contrôle par rapport aux stimulations avec les Ox-LDLs et les Mox-LDLs et nous pouvons constater qu'elles n'induisent pas de variation de l'expression ni d'*Arg1*, *IL-6* et *CD36* (Fig. 3.13 et 3.14), ni des autres gènes marqueurs (résultats non montrés).

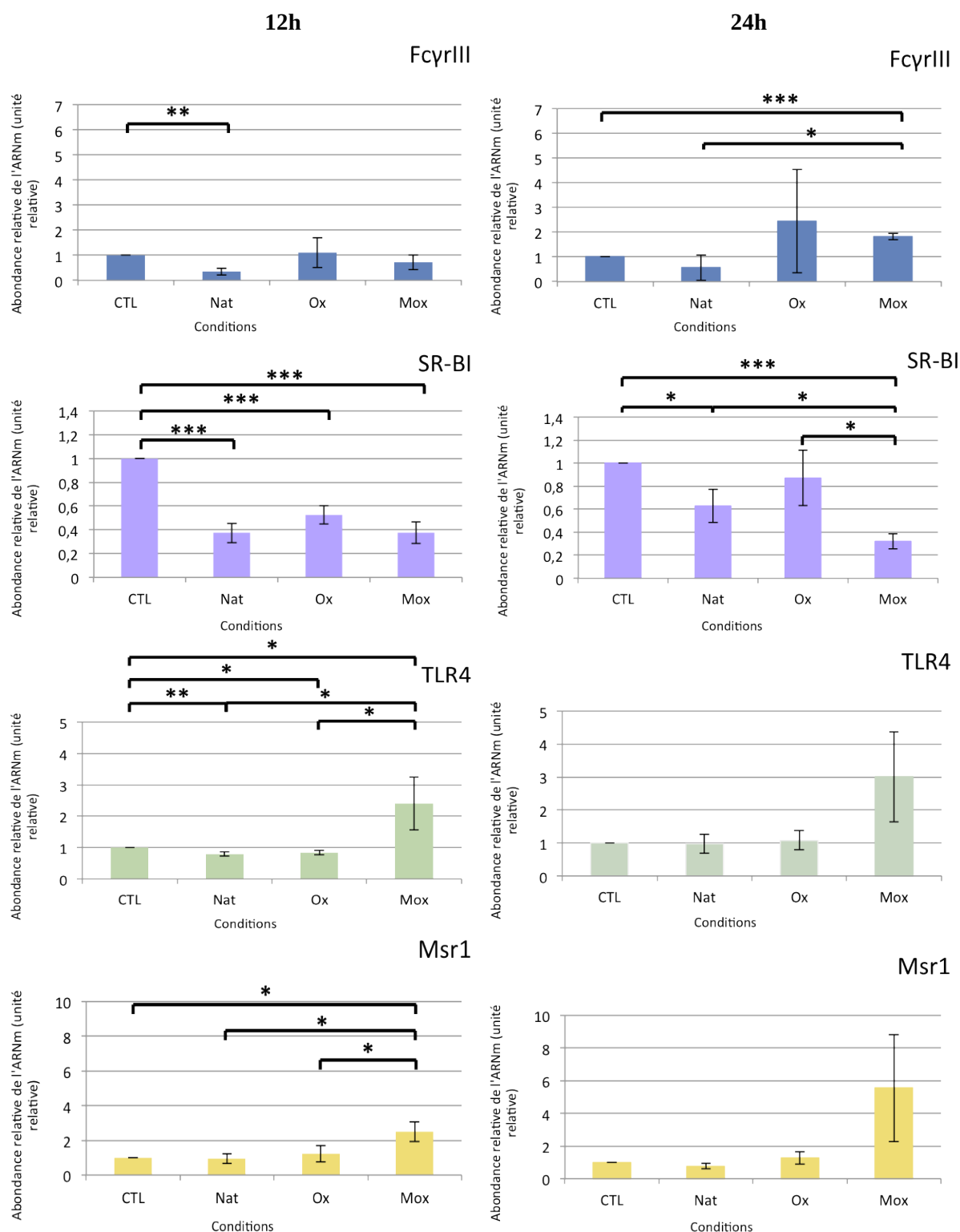


Figure 3.15. Expression de récepteurs « scavenger » et transporteurs aux LDLs, dans les cellules M0, après 18h d'incubation, suivies de 12h et 24 heures de stimulation avec des LDLs natives et oxydées, mesurée par qRT-PCR.

L'expression de récepteurs « scavenger » ou des transporteurs aux lipoprotéines *Msr1*, *FcγrIII*, *TLR4* et *SR-BI* a été étudiée par qRT-PCR. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * **significatif** ($p < 0.05$) ; ** **hautement significatif** ($p < 0.01$).

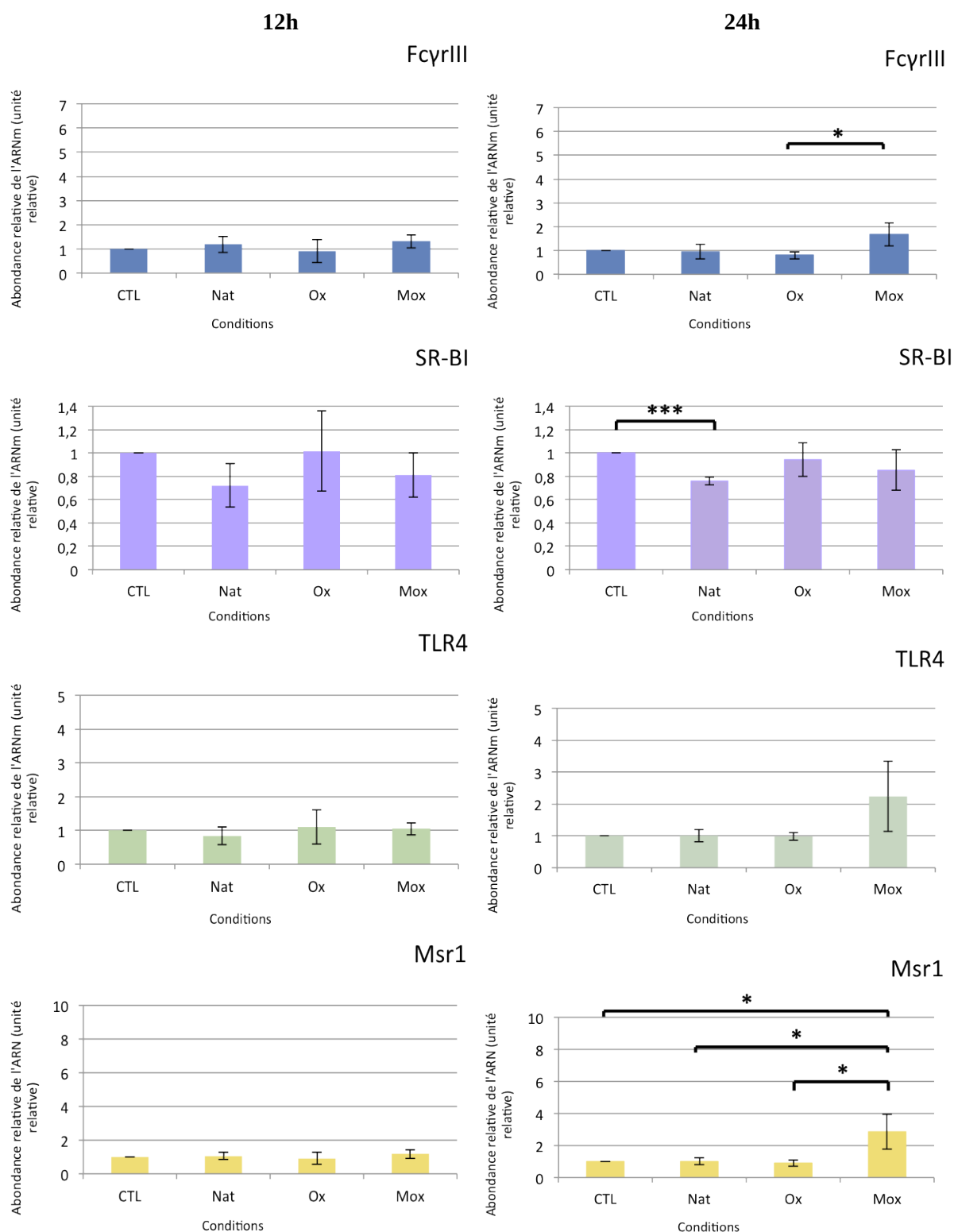


Figure 3.16. Expression de récepteurs « scavenger » et transporteurs aux LDLs après 18 heures de polarisation en cellules M1, suivies de 12 et 24 heures de stimulation, avec des LDLs natives ou oxydées, mesurée par qRT-PCR.

L'expression de récepteurs « scavenger » ou des transporteurs aux lipoprotéines *Msr1*, *FcγrIII*, *TLR4* et *SR-BI* a été étudiée par qRT-PCR. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * **significatif** ($p < 0.05$) ; ** **hautement significatif** ($p < 0.01$).

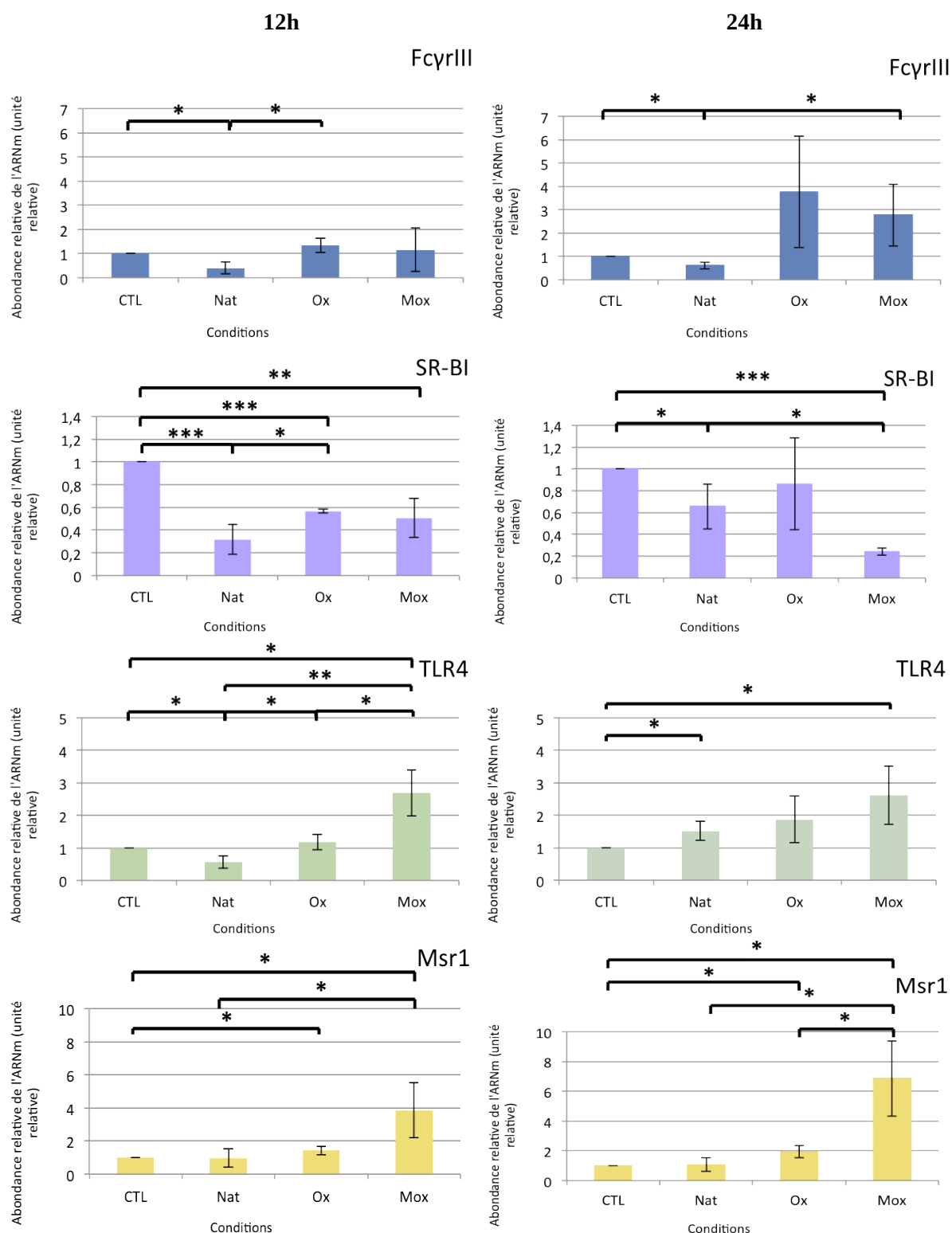


Figure 3.17. Expression de récepteurs « scavenger » et transporteurs aux LDLs après 18 heures de polarisation en cellules M2, suivies de 12h et 24 heures de stimulation, avec des LDLs natives ou oxydées, mesurée par qRT-PCR.

L'expression de récepteurs « scavenger » ou des transporteurs aux lipoprotéines *Msr1*, *FcγrIII*, *TLR4* et *SR-BI* a été étudiée par qRT-PCR. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * **significatif** ($p < 0.05$) ; ** **hautement significatif** ($p < 0.01$).

De plus, malgré les grands écarts-types, nous constatons que les Mox-LDLs semblent avoir le plus d'impact sur la polarisation des cellules. Les Mox-LDLs semblent renforcer la polarisation M2, comme le suggère la surexpression d'*Arg1* (Fig. 3.13) et de *CD36* (Fig. 3.14), mais favoriseraient aussi la polarisation M2 chez les cellules M0 et même M1. En effet, l'expression de l'*arginase-1* est augmentée dans les cellules M0 (« fold » d'induction : ~ 24) et M2 (« fold » d'induction : ~ 41) stimulées avec les Mox-LDLs pendant 24 heures (Fig. 3.13), par rapport à la condition 12 heures de stimulation. L'étude de l'expression de *CD36* a montré, quant à elle, moins de variabilité que pour les autres marqueurs. En effet, à la figure 3.14, nous pouvons observer que son expression est légèrement induite, de façon très significative, dans les cellules M0 et M2 stimulées avec les Mox-LDLs pendant 12 heures. Son expression est triplée lorsque ces macrophages sont stimulés de la même manière pendant 24 heures et ceci se révèle très significatif pour les cellules M2 (Fig. 3.14).

Les Ox-LDLs, quant à elles, ont moins d'effets, même si elles semblent favoriser l'expression de *CD36* pour les cellules M0 et M2.

Curieusement, les Mox-LDLs favorisent aussi la surexpression d'*IL-6*, plutôt caractéristique des cellules M1. En effet, l'*interleukine-6* est surexprimée dans les cellules M0 et M2 stimulées avec les Mox-LDLs (« fold » d'induction de ~ 9) (Fig. 3.13).

3.2.2.2. Effets sur l'expression de gènes codant pour les récepteurs « scavenger », les transporteurs aux lipoprotéines et la hème oxygénase, étudiée par qRT-PCR

La variabilité observée dans le cas de l'expression de gènes codant pour les récepteurs « scavenger », pour les transporteurs aux lipoprotéines ou pour la hème oxygénase, est moins prononcée que pour les gènes marqueurs M1 et M2.

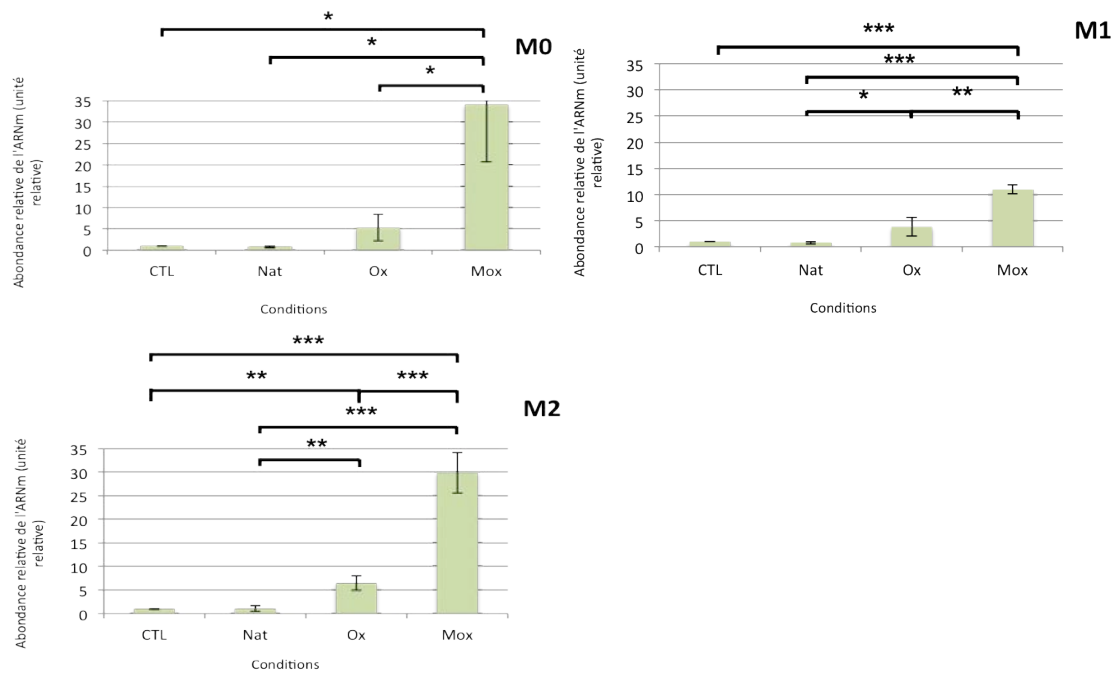
Le premier gène étudié est celui codant pour *FcγrIII*. Nous pouvons tout d'abord observer qu'il y a relativement peu d'effet sur son expression quel que soit le type de macrophage ou quel que soit le type de LDLs utilisé (Fig. 3.15, 3.16 et 3.17).

L'expression de *SR-BI* a également été étudiée. L'étude de *SR-BI* est en effet pertinente pour la suite du mémoire car il serait intéressant d'étudier l'impact des HDLs sur les cellules spumeuses polarisées (« 4.2. Perspectives »). Dans les macrophages M0 et M2, stimulés avec des LDLs natives ou oxydées, on observe plutôt une tendance à la diminution de l'expression de *SR-BI*. Par contre, les LDLs ont peu d'effets sur son expression dans les macrophages M1 (Fig. 3.15, 3.16 et 3.17).

Le changement d'expression de l'autre récepteur « scavenger » de classe B, *CD36*, en fonction de la polarisation et de la stimulation avec les LDLs, a été décrit dans le point précédent (Fig. 3.14).

En ce qui concerne l'expression de *TLR4* et *Msr1*, nous pouvons observer une tendance similaire à celle des gènes marqueurs M2. En effet, les Mox-LDLs renforcent l'expression de ces deux gènes dans les macrophages M2, de façon significative (Fig. 3.17). Les Mox-LDLs favoriseraient ainsi le phénotype M2 chez les M0 et même un peu chez les macrophages M1 (Fig. 3.15 et 3.16). Les LDLs natives et les Ox-LDLs ne semblent par contre pas induire de variation de leur expression (Fig. 3.15, 3.16 et 3.17).

12h de stimulation



24h de stimulation

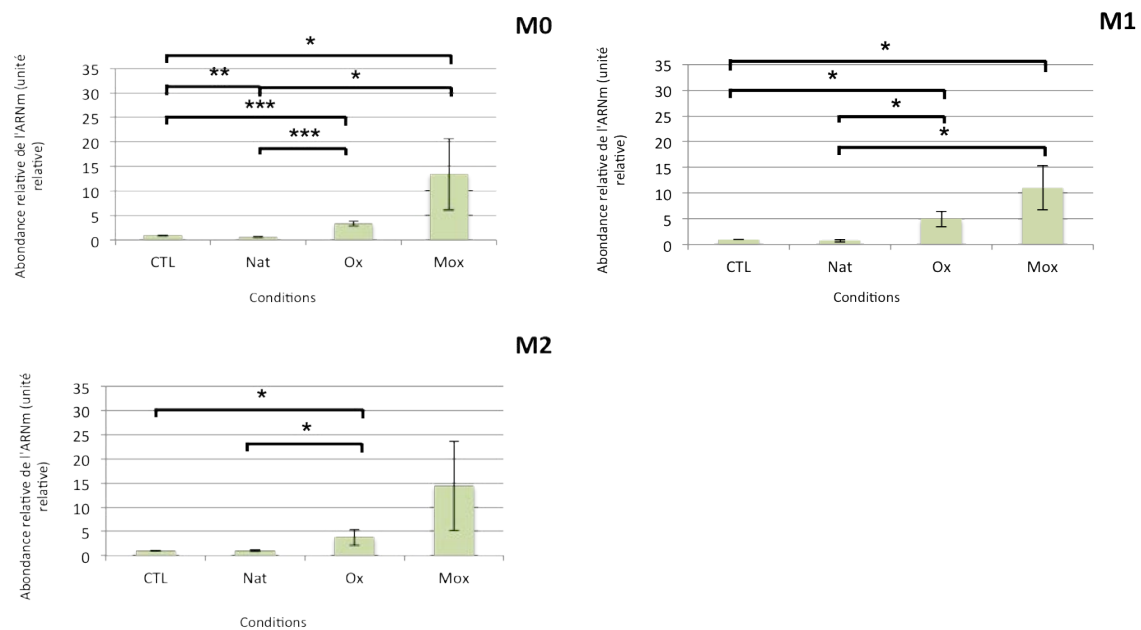


Figure 3.18. Expression de *HO-1*, dans les macrophages polarisés ou non, après 12 et 24 heures de stimulation avec des LDLs natives ou oxydées, mesurée par qRT-PCR.

L'abondance des ARNm *HO-1* a été déterminée par qRT-PCR. Le gène encodant l'actine a été utilisé en tant que « housekeeping gene ». Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles, fixées arbitrairement à 1 et sont exprimés comme moyenne de triplicats ($n=3 \pm SD$). * significatif ($p < 0.05$) ; ** hautement significatif ($p < 0.01$) ; *** très hautement significatif ($p < 0.001$).

L'étude de l'expression du gène *LOX-1* (récepteur « scavenger » de classe E) ainsi que des transporteurs aux lipoprotéines, *ABCG1* et *ABCG4*, n'est pas montrée en raison de la trop grande variabilité dans leur expression.

De même, le gène *ABCA1* n'a pas été étudié à cause de problèmes dans le design des amorces « reverse » et « forward » via le logiciel Primer Express 1.5.

Il est intéressant de noter que les variations d'expression de l'ensemble de ces gènes sont pratiquement non significatives lorsque les cellules ont été préalablement polarisées M1. Il est possible que l'effet du LPS, combiné à la stimulation avec des LDLs oxydées (12 heures ou 24 heures), induise un stress non négligeable et une perturbation dans les réponses cellulaires, entraînant ainsi une variabilité importante dans l'expression de ces gènes.

Enfin, nous nous sommes aussi intéressés à l'expression de la *hème oxygénase* (HMOX ou HO-1). Elle est hautement induite aussi bien dans les macrophages que dans les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses en réponse à un stress oxydatif. En plus de catalyser l'étape limitante de dégradation oxydative du groupement hème de l'hémoglobine, il a été démontré que cette enzyme possède des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Orozco et al., 2007).

Calay et al (2010) avaient déjà montré, sur des macrophages M0, que les Mox-LDLs induisaient la *HO-1*, de manière beaucoup plus marquée que les Ox-LDLs (Calay et al., 2010). Nous avons donc voulu vérifier ce qu'il en était pour les macrophages M1 et M2.

Ici aussi, les macrophages M0 et M2 semblent se comporter de la même manière. En effet, les Mox-LDLs induisent beaucoup plus la *HO-1* que les Ox-LDLs. La réponse est plus marquée à 12 heures qu'à 24 heures de stimulation (Fig. 3.18). Dans les cellules M1, l'expression d'*HO-1*, par contre, augmente moins que dans les cellules M0 et M2 (Fig. 3.18).

Les Nat-LDLs ne semblent pas avoir d'effet, quel que soit le temps de stimulation ou la polarisation préalable des cellules (Fig. 3.18).

Un test MTT a également été réalisé sur des cellules M0, M1 et M2, stimulées ou non avec les LDLs natives ou modifiées (résultats non montrés). De nouveau, une variabilité énorme est observée entre les réplicats, sans doute due à la combinaison polarisation/stimulation. Cependant, il en ressort que les Mox-LDLs semblent être cytotoxiques, puisque nous pouvons observer une plus grande mortalité dans ces conditions, que ce soit avec des cellules M0, M1 ou M2.

3.2.2.3. Effets sur l'expression de gènes marqueurs M1 et M2 étudiée par cytométrie de flux

a. Etude de l'expression d'un marqueur génique M2, MRC1

Les résultats obtenus sont à traiter avec précaution. En effet, les LDLs sont cytotoxiques et provoquent donc des dommages aux cellules. Cependant, nous pouvons malgré tout faire quelques constatations. Encore une fois, les cellules M0 et M2 ont des comportements assez comparables. Les Mox-LDLs semblent induire l'expression de MRC1 dans les cellules M0. Ceci est représenté par le léger déplacement de la fluorescence observé pour les cellules M0 stimulées avec les Mox-LDLs (Fig. 3.19 - profil jaune).

Le même phénomène est observé dans le cas des cellules M2. Néanmoins, nous constatons également que les Ox-LDLs semblent induire aussi l'expression de MRC1 dans les cellules M2 (Fig. 3.19 - profil vert).

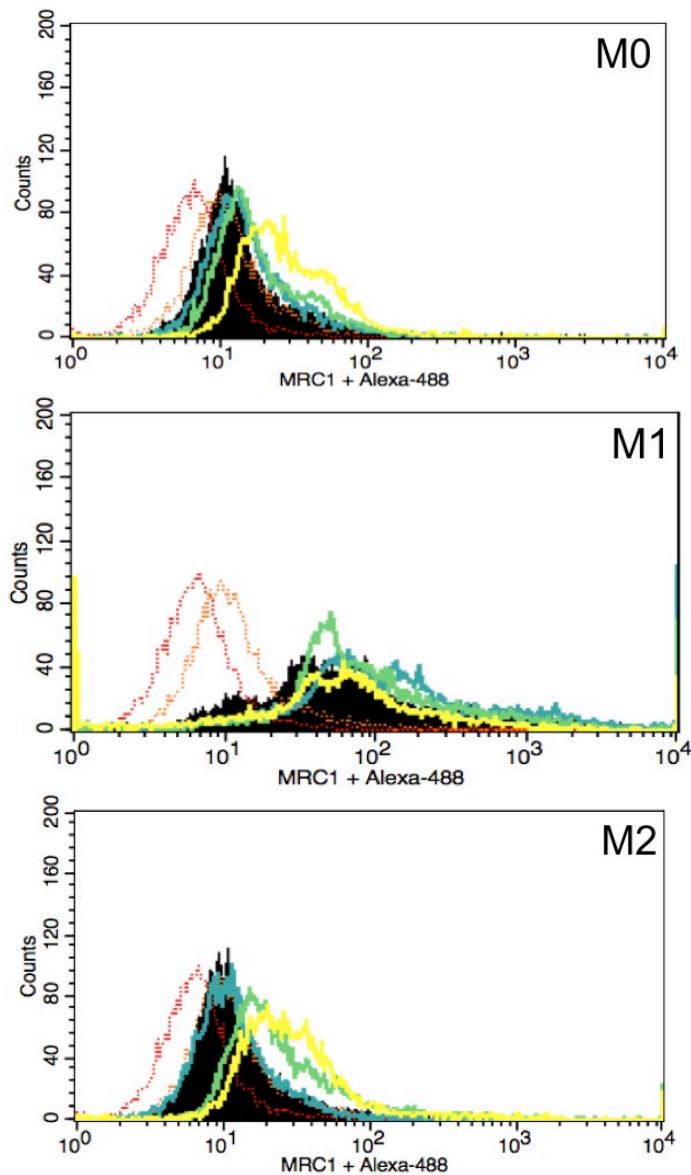


Figure 3.19. Expression de MRC1 dans des macrophages M0, M1 et M2 stimulés avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs), analysée par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-MRC1 (dilution : 50 x) a été testé sur des macrophages M0, M1 et M2. Cet anticorps est révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (dilution : 200 x). Les cellules sont lavées avec du dPBS + 0.01 % d'azide de sodium en présence de 1 % de sérum murin. Un anticorps anti-récepteurs Fc a été ajouté afin de réduire le bruit de fond dans les deux analyses.

(Noir : cellules contrôles non stimulées avec les LDLs ; Bleu: macrophages stimulés avec les Nat-LDLs; Vert: macrophages stimulés avec les Ox-LDLs; Jaune: macrophages stimulés avec les Mox-LDLs; Rouge : contrôle anticorps primaire (sans anticorps secondaire); Orange : contrôle anticorps secondaire (sans anticorps primaire)).

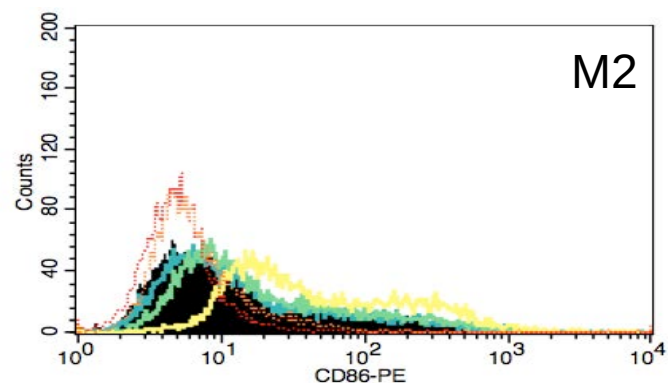
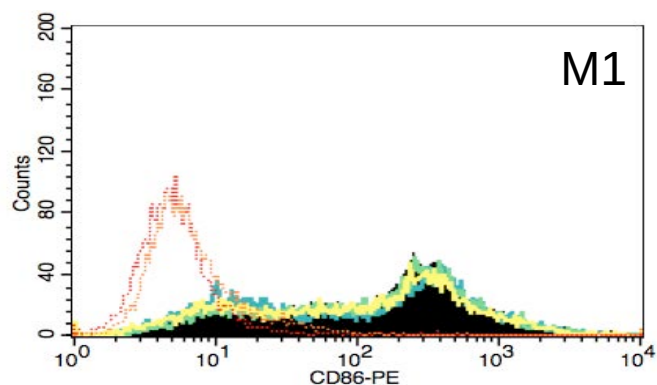
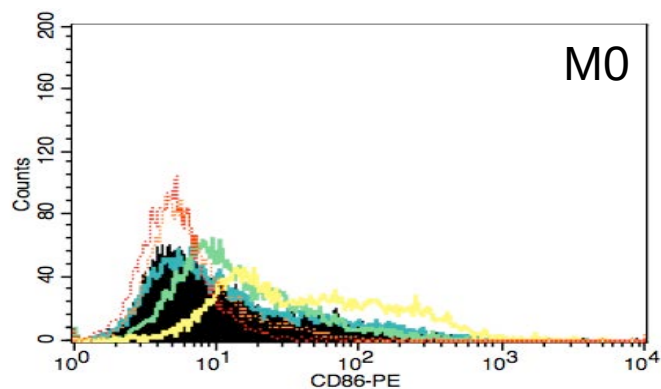


Figure 3.20. Expression de CD86 dans des macrophages M0, M1 et M2 stimulés avec les LDLs natives (Nat-LDLs) ou oxydées (Ox- et Mox-LDLs), analysée par cytométrie de flux.

L'anticorps anti-CD86 (dilution : 25 x) a été testé sur des macrophages M0, M1 et M2. Cet anticorps est couplé à la phycoérythrine (PE). Les cellules sont lavées avec du dPBS + 0.01 % d'azide de sodium + 1 % de sérum murin. Un anticorps anti-récepteurs Fc a été ajouté afin de réduire le bruit de fond dans les deux analyses. De plus, un anticorps IgG2a κ de souris (contrôle isotypique) couplé à la phycoérythrine est utilisé afin de vérifier la spécificité des marquages de l'anticorps monoclonal de même isotype.

(Noir : cellules contrôles non stimulées avec les LDLs ; Bleu : macrophages stimulés avec des Nat-LDLs ; Vert : macrophages stimulés avec des Ox-LDLs ; Jaune : macrophages stimulés avec des Mox-LDLs ; Rouge: cellules non marquées (sans anticorps primaire) ; Orange: contrôle isotype IgG2a κ).

Dans les cellules M1, nous notons de nouveau la présence de sous-populations, exprimant MRC1 à des niveaux différents. Les LDLs, qu'elles soient natives ou modifiées, semblent induire une légère augmentation de l'expression de MRC1 dans les cellules pro-inflammatoires (*Fig. 3.19*). Mais, il faut rester prudent, étant donné l'état endommagé de ces cellules provoqué à la fois par l'action du LPS et des LDLs.

b. Etude de l'expression d'un marqueur génique M1, CD86

A l'instar des résultats issus de l'étude de l'expression de MRC1, ces données sont à traiter avec précaution.

Tout d'abord, nous constatons une grande hétérogénéité dans l'expression, avec des cellules exprimant plus ou moins CD86 (*Fig. 3.20*).

Nous pouvons aussi remarquer que les Mox-LDLs induisent une légère expression de CD86 dans les cellules M0 et dans les cellules M2 (*Fig. 3.20*). Les Ox-LDLs aussi semblent induire l'expression de ce marqueur M1 dans des cellules M0, bien qu'en moindre mesure (*Fig. 3.20*).

Les LDLs natives ou oxydées ne semblent pas induire une différence de phénotype chez les macrophages M1.

Nous avons espéré confirmer les résultats obtenus en qRT-PCR pour le gène encodant l'IL-6, au niveau protéinique via un ELISA. Mais nous n'avons pas détecté d'IL-6 dans les surnageants. Cette expérience est donc à refaire.

Pour conclure le paragraphe 3.2., sur les effets des LDLs natives et oxydées sur les macrophages M0, M1 et M2, il faut tout d'abord souligner qu'il s'agit de données encore préliminaires et incomplètes. Nous pouvons cependant déjà dégager quelques conclusions. Les macrophages M0 et M2 ont des comportements proches, tandis que les macrophages M1 se démarquent plus nettement. Les LDLs natives ont généralement peu d'effet. Les Mox-LDLs semblent par contre avoir le plus d'effets : de manière paradoxale, s'ils renforcent ou favorisent le phénotype M2, en même temps, ils induisent aussi certaines caractéristiques des macrophages M1, induisant donc un phénotype intermédiaire.

Il serait toutefois nécessaire de compléter ces données avec l'étude de marqueurs M1 et M2 supplémentaires.

Il serait également intéressant de s'appuyer sur d'autres techniques étudiant l'expression génique au niveau protéique, étant donné le stress prolongé subi par les cellules.

La technique de cytométrie de flux (FACS) ne semble pas optimale dans le cas de cellules polarisées et stimulées. Nous avons rencontré des problèmes avec l'ELISA pour l'IL-6, mais cette expérience est à refaire. Nous pouvons également envisager d'autres techniques permettant d'étudier l'expression de marqueurs de polarisation au niveau protéique. Les techniques de Western Blot ou d'immunofluorescence, via l'étude d'Arg1 et d'iNOS par exemple, pourraient se révéler utiles pour déterminer les phénotypes des cellules traitées.

Nous pourrions aussi envisager des temps d'incubation plus courts avec les LDLs.

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4. Discussion générale, conclusion et perspectives

4.1. Discussion générale et conclusion

Le concept de polarisation des macrophages, bien que récent, commence à être relativement bien décrit dans le cas des cancers et de l'athérosclérose notamment. En fonction du stade de développement de la lésion athéroscléreuse et donc du microenvironnement cellulaire, les macrophages se polarisent soit vers un phénotype M1, soit vers un phénotype M2 ou peuvent même acquérir un phénotype intermédiaire. Les premières recherches étudiant les mécanismes moléculaires de la polarisation ont démontré que l'équilibre entre ces phénotypes, et donc entre les fonctions reliées à ces deux phénotypes, est maintenu ou rompu via des voies signalétiques d'activation ou de transrépression, agissant directement au niveau des gènes via l'intermédiaire de facteurs de transcription [(Lawrence and Natoli, 2011), (Takeuchi and Akira, 2011)].

Il existe de nombreuses publications décrivant le processus de polarisation des macrophages *in vivo* et *in vitro*. Les chercheurs travaillent généralement à partir de monocytes circulants ou de macrophages tissulaires, humains ou murins. Cependant, nous n'avons pas trouvé de données concernant la polarisation des macrophages de la lignée RAW 264.7. Cette lignée cellulaire, souvent utilisée dans le contexte de l'athérosclérose et déjà utilisée afin d'étudier la formation en culture des cellules spumeuses dans notre laboratoire, a été choisie pour ce mémoire (Calay et al., 2010).

4.1.1. Etablissement du protocole de polarisation M1/M2 sur des macrophages RAW 264.7

La première partie de ce travail a eu pour objectif d'étudier la capacité des macrophages RAW 264.7 à se polariser en macrophages M1 ou M2. Ce premier objectif a été rempli avec succès. En effet, les analyses par qRT-PCR nous ont permis de valider le protocole de polarisation M1 et M2 établi, en étudiant l'expression, au niveau ARNm, de marqueurs géniques M1 et M2 sélectionnés.

Les gènes M1 ou pro-inflammatoires étudiés sont l'*iNOS*, *IL-6* et *Arg2* tandis que les gènes M2 ou anti-inflammatoires sont *Arg1*, *MRC1* et *CD36*. Tout d'abord, le temps de polarisation a été choisi sur base des inductions observées pour ces différents gènes. Les milieux de polarisation M1 et M2 agiront ainsi pendant 18 heures sur les cellules, puisqu'il semble que l'expression des marqueurs géniques M1 diminue déjà au temps 24 heures de polarisation (Fig. 3.2 et 3.3).

De même, la validation du protocole de polarisation a été réalisée au niveau protéique. Les techniques de cytométrie de flux et d'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ont été utilisées dans ce but. Le marqueur M1 étudié est CD86, tandis que le marqueur M2 est MRC1. Ces marqueurs ont été choisis sur base de publications, donc celle d'Hirose et de son équipe (2011) qui ont travaillé sur des macrophages dérivés de monocytes humains (Hirose et al., 2011). La surexpression de chacun de ces deux marqueurs, dans les macrophages M1 ou dans les macrophages M2 respectivement, atteste de l'efficacité du protocole de polarisation (Fig. 3.4 et 3.5). Cependant, dans le cas des macrophages M1, le LPS (10 ng/ml) montre aussi une certaine cytotoxicité, ce qui a pour conséquence de fragiliser les cellules, quelle que soit la concentration testée. Les résultats obtenus par cytométrie de flux ne sont donc pas optimaux (Fig. 3.6). Afin de confirmer le phénotype M1 de ces macrophages, un ELISA ciblé sur l'IL-6 (marqueur M1) a été réalisé. L'augmentation de la production d'IL-6 très

hautement significative, confirme les données préalablement obtenues via la cytométrie de flux (*Fig. 3.7*).

Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature, malgré que le type cellulaire soit différent.

Bien que la plupart des études utilisent seulement la technique de qRT-PCR pour déterminer le phénotype, quelques études ont aussi confirmé leurs données au niveau protéique (pour les macrophages murins). C'est le cas de Lopez-Castejón (2010) et de Stout (2005) qui ont utilisé l'approche de l'ELISA, pour deux marqueurs M1, l'IL-6 et le TNF α [(Lopez-Castejon et al., 2010), (Stout et al., 2005)].

De la même manière, malgré qu'Hirose et son équipe (2011) ont travaillé sur des macrophages humains, nos résultats obtenus par cytométrie de flux sont conformes avec leur étude, puisque nous pouvons observer une surexpression de MRC1 dans les cellules M2 par rapport aux cellules M0 contrôles. Dans le cas de CD86, le même phénomène a été observé pour les cellules M1 par rapport aux cellules M0 (Hirose et al., 2011).

4.1.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur les macrophages polarisés (M1/M2) ou non (M0)

La deuxième partie du mémoire porte sur l'étude de l'effet des LDLs, natives ou oxydées, sur les macrophages RAW 264.7 polarisés ou non.

Dans le laboratoire URBC-Narilis, Damien Calay a montré que des macrophages RAW M0, en présence de LDLs modifiées, et plus particulièrement en présence de Mox-LDLs, se différencient en cellules spumeuses (Calay et al., 2010).

De plus, Khallou-Laschet a mis en évidence un changement de phénotype des macrophages, de M2 à M1, au sein des plaques athéroscléreuses à différents stades de développement (*Fig. 1.25*) (Khallou-Laschet et al., 2010). Il est donc pertinent de s'intéresser, *in vitro*, à ce phénomène sur des cellules polarisées.

L'intérêt d'avoir choisi les cellules de la lignée RAW 264.7 comme type cellulaire est ici justifié. En effet, ces cellules sont souvent utilisées dans des études portant sur le métabolisme, l'inflammation et la mort cellulaire. Elles ont, en outre, été sélectionnées puisque plusieurs études ont démontré qu'elles sont capables de reconnaître les LDLs natives et les LDLs modifiées et de se différencier en cellules spumeuses quand elles sont stimulées avec les LDLs oxydées [(Akiba et al., 2003), (Bea et al., 2003), (Calay et al., 2010), (Joseph et al., 2003)].

Les deux objectifs de cette seconde partie ont été de vérifier si des cellules RAW polarisées M1 ou M2 ont toujours la capacité de former des cellules spumeuses, après avoir été mises en présence de LDLs modifiées. De même, nous avons voulu savoir si les Ox-LDLs et/ou les Mox-LDLs influencent la polarisation de ces macrophages.

4.1.2.1. Analyse morphologique des cellules spumeuses contrôles et polarisées

Afin de déterminer si des macrophages polarisés sont encore capables d'internaliser des LDLs et de former des cellules spumeuses, nous avons utilisé les techniques de marquage des lipides que sont l'Oil Red O et le Bodipy 493/503.

Les données obtenues, à partir de l'Oil Red O, montrent déjà que les cellules M0 et M2 semblent se comporter d'une manière similaire. Tout d'abord, elles ne se différencient pas en cellules spumeuses en présence de **LDLs natives** (Fig. 3.9). En effet, comme expliqué précédemment, l'expression du récepteur aux LDLs natives (LDL-R) est régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol. La cellule n'est donc jamais surchargée en LDLs natives [(Gent and Braakman, 2004), (Jeon and Blacklow, 2005)], ce qu'on observe bien pour les cellules M0 et M2. Cependant, il semblerait que les cellules M1 internalisent ces LDLs natives : une explication possible pourrait être que ces cellules, grâce à leur état de polarisation, aient acquis un métabolisme oxydatif exacerbé (production de ROS et RNS) [(Mantovani et al., 2005), (Mantovani et al., 2007), (Murata et al., 2002), (Van Ginderachter et al., 2006)], capable alors d'oxyder les Nat-LDLs pendant l'incubation. Il a été, en effet, démontré que le LPS induit *Nox1* via le *TLR4* (Kim et al., 2010).

Par contre, lorsqu'elles ont été incubées pendant 24 heures avec les **Mox-LDLs**, les cellules M0 ou polarisées sont capables de se charger en lipides et de former des cellules spumeuses (Fig. 3.9). Nous pouvons également observer que très peu de macrophages spumeux sont formés en présence d'**Ox-LDLs**. Les Mox-LDLs semblent donc plus enclines à induire la formation de cellules spumeuses au contraire des Ox-LDLs. Ces deux constatations confirment les données obtenues par Damien Calay avec les macrophages RAW M0 (Calay et al., 2010). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les Mox-LDLs sont oxydées au niveau de la partie protéique seulement, sans peroxydation lipidique. Les Ox-LDLs, quant à elles, sont également oxydées au niveau de la partie protéique, mais avec beaucoup de peroxydes lipidiques présents. De la même manière que les cellules M0, les macrophages polarisés sont capables de discriminer les Ox-LDLs et les Mox-LDLs [(Boudjeltia K. Z., 2006), (Calay et al., 2010)].

Les mêmes observations ont été obtenues grâce au marquage des lipides avec la sonde Bodipy 493/503 (Fig. 3.10). Cette expérience est complémentaire à celle par marquage à l'Oil Red O : elle fournit une résolution des images nettement supérieure puisque celles-ci sont observées via le microscope confocal. De plus, la charge en lipides, de cellules ayant subi un traitement identique, a été quantifiée grâce au BD Pathway 855. Les résultats confirment les observations précédentes (Fig. 3.11).

De la même manière, des cellules M0 ou polarisées et stimulées ont été observées via la technique de microscopie holographique digitale (MHD). Aucune fixation ni coloration des cellules n'a été nécessaire. Les vésicules lipidiques sont représentées sur ces images par des « crêtes » (Fig. 3.12). Nous pouvons tirer les mêmes conclusions que pour les marquages à l'Oil Red O et au Bodipy, même si la quantification des lipides par cette approche n'est pas encore au point actuellement (projet Bioline).

4.1.2.2. Effets des LDLs natives et modifiées sur l'expression génique de macrophages polarisés ou non

Ensuite, l'expression génique de marqueurs M1 et M2 a été étudiée dans des cellules M0 ou polarisées, puis stimulées avec des LDLs natives ou modifiées. Cependant, la variabilité entre les réplicats s'est avérée fort importante. Malgré tout, plusieurs constatations ressortent de ces données préliminaires (Fig. 3.13 et 3.14).

Nous pouvons observer que, quel que soit le marqueur génique, M1 ou M2, étudié, les LDLs natives n'ont pas ou peu d'effet sur leur expression. De façon plus intéressante, il semblerait que les Mox-LDLs aient le plus d'impact sur la variation d'expression de plusieurs

marqueurs. En effet, elles semblent induire une augmentation de l'expression des marqueurs M2, ou maintenir cette expression, au niveau des cellules M0 et M2. Cependant, nous pouvons aussi observer une augmentation de l'expression de l'*IL-6* qui est un marqueur M1. Au vu de ces résultats, nous pensons que les cellules adopteraient un phénotype intermédiaire, même s'il semble plus anti-inflammatoire que pro-inflammatoire ($M2 > M1$).

De plus, nous avons étudié l'expression d'*HO-1* dans les macrophages. Cela nous a permis notamment de vérifier que les Mox-LDLs étaient correctement oxydées, en comparant nos données avec celles de Damien Calay (Calay et al., 2010). Nous avons pu observer une augmentation de l'expression d'*HO-1* dans les cellules M0, M1 et M2 stimulées avec les Ox-LDLs par rapport aux cellules non stimulées, ainsi que l'a constaté Hirose (Hirose et al., 2011). En plus de cette similarité de résultats, nous avons pu aussi ici remarquer que cette induction de l'expression de *HO-1* est plus importante lorsque les cellules sont stimulées avec les Mox-LDLs (Fig. 3.18). Sur base des deux temps testés, les M1 semblent répondre plus faiblement, mais il faudrait mesurer l'expression d'*HO-1* à des temps intermédiaires pour avoir des cinétiques d'expression plus détaillées et plus complètes.

Puisqu'il a été observé, grâce aux techniques de marquage à l'Oil Red O, au Bodipy ou via la technique de microscopie holographique digitale, que les cellules M0 ainsi que les cellules polarisées M1 et M2 sont capables de discriminer les Ox-LDLs des Mox-LDLs, nous avons trouvé intéressant d'étudier l'expression des récepteurs « scavenger » et de transporteurs aux lipoprotéines (Fig. 15, 16 et 17). Il semblerait que les Nat-LDLs et que les Ox-LDLs, une fois de plus, n'ont pas vraiment d'effet sur l'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs, que la cellule soit polarisée ou non.

Au contraire, les Mox-LDLs semblent à nouveau avoir un effet sur l'expression de ces gènes.

Les conclusions, tirées de ces différents résultats, sont également appuyées par ceux obtenus via la cytométrie de flux. L'expression de MRC1 est augmentée dans les cellules M0 et M2 (Fig. 3.19). Celle de CD86 semble l'être aussi, même si elle l'est plus faiblement (Fig. 3.20).

En conclusion, nous pouvons donc affirmer que les cellules polarisées sont capables de reconnaître différents types de LDLs oxydées.

En outre, il semblerait que les Mox-LDLs aient le plus d'impact sur les macrophages polarisés. Ces constatations sont aussi intéressantes, au regard d'une pertinence physiologique des Mox-LDLs supérieure par rapport à celle des Ox-LDLs.

Mantovani a, quant à lui, rapporté dans son article de 2009 que l'internalisation d'Ox-LDLs par les macrophages induirait un phénotype M2 (voir point « 1.2.2.4. LDLs et polarisation des macrophages ») (Mantovani et al., 2009). Nous n'avons pas pu confirmer cette observation pour les macrophages RAW 264.7. Il faut dire que les conditions expérimentales sont très peu détaillées par Mantovani et al (2009). En outre, il faudrait aussi tester les effets des LDLs natives ou modifiées sur l'expression des marqueurs M1 et M2 en cellules RAW non polarisées, afin de clarifier la question sur les cellules RAW.

Les cellules polarisées, après stimulation avec les LDLs et différenciation en cellules spumeuses, semblent encore capables de modifier leur phénotype en présence de ce deuxième stimulus.

Le phénotype des cellules stimulées avec les Mox-LDLs n'est pas totalement anti-inflammatoire. En effet, des marqueurs M2 et M1 sont exprimés. Nous pouvons supposer que ces cellules présentent un phénotype intermédiaire $M2 > M1$.

Cependant, il s'agit de prendre des précautions en analysant ces résultats. En effet, après 18 heures de polarisation, les cellules sont mises au repos pendant une heure. Ensuite, elles sont stimulées pendant 24 heures avec les LDLs, sans ajout de milieu de polarisation.

Il serait peut-être judicieux, à l'avenir, de tester différents modèles de polarisation/stimulation afin d'étudier l'interférence des LDLs sur la polarisation. La combinaison polarisation/stimulation avec les LDLs simultanée (24 heures) a été testée et les résultats préliminaires (données non montrées) montrent que les Mox-LDLs semblent à nouveau avoir le plus d'effet sur l'expression des marqueurs M1 et M2, principalement dans les cellules M2. Ces données, qui demandent confirmation, pourraient mener à penser que le phénotype des cellules M0, M2 et M1 est réorienté vers un phénotype anti-inflammatoire, lorsqu'elles sont stimulées avec les Mox-LDLs.

4.2. Perspectives

Il existe beaucoup de différences entre le modèle humain et murin, en ce qui concerne la polarisation des macrophages. L'étude de ce phénomène est d'autant plus complexe que les macrophages sont des cellules hétérogènes et plastiques. La lignée des macrophages murins RAW 264.7 a été choisie pour ce mémoire. Ce choix se révèle être pertinent sachant que nous travaillerons plus tard sur un modèle murin *in vivo*.

A l'avenir, il serait utile de tester d'autres marqueurs géniques M1 et M2 au niveau protéique. En effet, seule l'expression de MRC1 (M2), CD86 et IL-6 (M1) a été étudiée. La variation d'expression de l'arginase-1 ou de l'iNOS pourrait par exemple être étudiée via la technique de Western Blot. Ces résultats appuieraient ainsi ceux déjà obtenus. De plus, le phénotype des cellules polarisées et stimulées n'est pas encore clairement établi, surtout au niveau protéique.

Par ailleurs, nous pourrions aussi essayer de trouver un substitut au LPS, un des stimuli menant à une polarisation M1. En effet, le LPS est cytotoxique et fragilise les cellules. Le phénotype des macrophages M1 est donc plus difficile à étudier par exemple via la technique de cytométrie de flux. De plus en plus dans la littérature, on trouve des données sur le phénotype de macrophages M1 polarisés avec du GM-CSF. Selon Brocheriou, le GM-CSF et le M-CSF (stimulus de polarisation M2) sont des « facteurs mitogéniques principaux pour la lignée des macrophages avec une capacité d'activer et d'induire la différenciation des macrophages ». Ils sont produits par les cellules en conséquence d'un traumatisme. Cette molécule sera donc d'autant plus physiologique.

Puisque les macrophages M1 seront polarisés avec du GM-CSF, nous pourrions faire de même avec les macrophages M2 et le M-CSF. Nous pourrions alors au final comparer les profils d'expression génique des macrophages M1/M2 polarisés avec le mélange LPS/IFN γ et le mélange IL-4/IL-13 respectivement et des macrophages M1/M2 polarisés avec du GM-CSF et M-CSF respectivement. Il semblerait que les cellules M1 polarisées via le GM-CSF aient une morphologie arrondie, au contraire des cellules M2 polarisées avec le M-CSF dont la morphologie est plus étendue. Cette observation est similaire à la morphologie des cellules polarisées M2 dans ce travail [(Brocheriou et al., 2011), (Gordon and Taylor, 2005), (Mosser and Edwards, 2008)].

Depuis quelques années, on ne considère plus l'existence d'une séparation nette entre les phénotypes M1 et M2. Mais plutôt la présence d'un continuum entre ces phénotypes que les macrophages acquièrent en fonction du microenvironnement cellulaire dans lequel ils se

trouvent [(Brocheriou et al., 2011), (Mantovani et al., 2004)]. Au vu de nos résultats, il semble que les macrophages obtenus, par polarisation puis stimulation avec les Mox-LDLs, présentent un phénotype dit intermédiaire. Nous pourrions poursuivre cette étude en déterminant précisément quel est ce phénotype intermédiaire et quelles fonctions il apporte aux macrophages. Nous pourrions faire de même avec les macrophages stimulés avec les Ox-LDLs puisqu'il semble qu'elles aient un léger effet malgré tout sur le phénotype. De même, nous pourrions également jouer sur les temps de polarisation et de stimulation, ainsi que sur la manière dont les cellules sont traitées, pour avoir une vision plus complète des cinétiques d'expression des différents marqueurs.

Enfin, il faudrait également étudier l'effet des LDLs natives ou oxydées sur la polarisation et ensuite étudier le comportement d'une cellule M0 spumeuse, en réponse à des stimuli de polarisation.

Après avoir récolté toutes ces données, nous pensons qu'il serait relevant de s'intéresser à l'effet des HDLs (« high density lipoproteins ») sur les cellules spumeuses polarisées. En effet, Damien Calay a montré que des cellules spumeuses M0, en présence de HDLs, se déchargent d'une partie de leur contenu lipidique (données non publiées). Ce phénomène est probablement dû au transport reverse du cholestérol (van der Velde, 2010). De façon intéressante, la libération d'une partie des lipides internalisés ne semble n'avoir lieu que lorsque ceux-ci proviennent de Mox-LDLs, au contraire de macrophages chargés avec des Ox-LDLs. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de peroxydes lipidiques au niveau des Mox-LDLs. De plus, Damien Calay a également montré que des HDLs oxydées à la myéloperoxydase (Mox-HDLs) perdent leur capacité de décharger les macrophages de leurs lipides (données non publiées). Cet aspect pourra donc aussi être étudié sur des macrophages polarisés M1 et M2, après avoir été confirmé sur les macrophages M0.

L'implication des miRNAs dans la polarisation des macrophages est également un aspect à ne pas négliger. Ces courts ARNs non-codants (22 nucléotides environ) sont impliqués dans la traduction ou dans la dégradation d'ARNm cibles (Martinez-Nunez et al., 2011). Nous pourrions nous pencher sur l'analyse des miRNAs sous- ou surexprimés dans les macrophages RAW polarisés et sélectionner ceux qui semblent centraux dans le processus de polarisation.

Martinez-Nunez et son équipe ont montré que le microRNA-155 (miR-155) cible IL13R α 1, avec comme conséquence de diminuer la production de cette protéine, et ainsi de réduire l'activation de STAT6. Martinez-Nunez a donc émis l'hypothèse que miR-155 est « impliqué dans la régulation de l'équilibre M1/M2 » des macrophages (Martinez-Nunez et al., 2011). Ces résultats ont été obtenus sur des macrophages humains. Nous pourrions aussi étudier les miRNAs sélectionnés, dans un contexte étudiant l'effet des LDLs sur la polarisation des macrophages RAW. Il serait ainsi intéressant de montrer que l'expression de certains miRNAs peut ou non être régulée par l'incubation de cellules polarisées ou non, avec des LDLs oxydées. Les données récoltées pourraient peut-être permettre de montrer que ces miRNAs sont impliqués ou non dans le processus de formation ou de progression des lésions athéroscléreuses.

Dans un autre ordre d'idées, nous pourrions nous pencher sur l'étude d'IRF5 (« Interferon regulatory factor-5 ») et sur son expression dans les macrophages RAW pro-inflammatoires (M1). IRF5 est un facteur de transcription, hautement exprimé dans les macrophages M1 et qui régule directement la sécrétion de médiateurs inflammatoires spécifiques tels que IL-12 (« interleukine-12 »), IL-23, IL-1 et TNF α (« tumor necrosis factor- α »), impliqués dans l'activation de la réponse immune Th1/Th17 (Krausgruber et al., 2011). Ce facteur de

transcription a deux modes d'action : soit il se lie directement à l'ADN ou bien il interagit indirectement avec celui-ci via des protéines, telles que RelA, agissant directement sur l'expression de gènes d'intérêt (codant, par exemple, pour des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou codant pour des suppresseurs de tumeurs).

L'activation de l'expression d'IRF5 semble modifier le phénotype des macrophages M2 en un phénotype pro-inflammatoire (M1). Cependant, si l'expression d'IRF5 est éteinte, via un siRNA siIRF5, le phénotype passe de M1 à M2 (Krausgruber et al., 2011).

Il pourrait être pertinent de suivre l'expression relative d'IRF5 dans des macrophages M0, M1 et M2 RAW 264.7 par qRT-PCR. Nous pourrions aussi tenter d'éteindre son expression dans ces macrophages, par une transfection de siRNA et ainsi observer tout changement de phénotype dans ces trois types de macrophages.

Enfin, étant donné l'importance de l'apoptose des macrophages au sein des lésions athéroscléreuses, que ce soit en terme de formation ou de progression de la lésion [(Akishima et al., 2005), (Tabas et al., 2009)], nous pourrions aussi nous pencher sur la question de la susceptibilité des macrophages M1 et M2, spumeux ou non, à l'apoptose. Elle sera comparée entre les deux types de macrophages.

Les résultats obtenus permettront probablement en plus de vérifier le caractère plus physiologique des Mox-LDLs, utilisées comme alternative aux Ox-LDLs. Ces résultats permettraient aussi de déterminer si les Mox-LDLs exercent des effets modulateurs sur certaines fonctions des macrophages, différents de ceux exercés par les Ox-LDLs (Ziouzenkova et al., 1998).

Enfin, nous pourrions essayer de comprendre dans quelles conditions les cellules spumeuses meurent par apoptose ou par nécrose. En effet, dans ce dernier cas, la libération de médiateurs inflammatoires induit l'extension de la plaque athéroscléreuse *in vivo*, avec un recrutement de nouvelles cellules inflammatoires [(Glass and Witztum, 2001), (Sanz and Fayad, 2008)].

Toutes ces données pourront ensuite être confirmées sur des monocytes sanguins humains différenciés à l'aide de M-CSF.

Lorsque l'ensemble des données *in vitro* auront été rassemblées, nous pensons qu'il serait intéressant d'étudier ce phénomène de polarisation, dans le cadre de l'athérosclérose, *in vivo*. Cette étude pourra porter sur des souris Apobec^{-/-} transgéniques apo-B100 humaine. Nous avons décidé de choisir ce modèle peu utilisé pour des raisons évidentes. En effet, le modèle type utilisé de nos jours est le modèle murin ApoE^{-/-} (Plump et al., 1992). Ce modèle a déjà été utilisé pour l'étude de la polarisation des macrophages (Khallou-Laschet et al., 2010). Mais la pertinence de ce modèle n'est que partielle par rapport à l'athérosclérose humaine: lorsque le gène ApoE est invalidé, on observe bien le développement de lésions athéroscléreuses. Cependant, on n'observe pas une augmentation des LDLs dans le sang, mais bien des VLDLs. De plus, ces souris présentent le désavantage d'avoir une santé plus fragile et précaire [(Kwan et al., 2007), (Lagrost et al., 2007)].

Au contraire, les souris Apobec^{-/-} transgéniques apo-B100 humaine se rapprochent le mieux de la pathologie humaine. En effet, le gène de l'apoB code pour deux protéines, l'apo-B100 et l'apo-B48. La protéine apo-B100 est nécessaire pour la synthèse hépatique des VLDLs, métabolisées en LDLs et IDLs. Tandis que l'apo-B48 est nécessaire pour l'absorption de graisses au niveau de l'intestin grêle et joue un rôle dans la formation des chylomicrons. Il semblerait que l'apo-B100 puisse la remplacer dans ses fonctions [(Chan et al., 1997), (Smith et al., 2011), (Teng et al., 1999)].

Ces deux protéines sont traduites à partir du même ARN messager (apoB), modifié au niveau d'un unique nucléotide par une enzyme spécialisée, l'Apobec-1 (« apoB editing compound 1 »). Cette modification post-transcriptionnelle consiste en une conversion d'un C par un U au niveau du codon CAA qui devient alors un codon stop UAA. La protéine produite n'est donc pas l'apo-B100 mais une protéine tronquée, l'apo-B48 (pour 48 % de l'ARNm traduit) [(Blanc and Davidson, 2010), (Chan et al., 1997), (Smith et al., 2011) (Teng et al., 1999)].

L'enzyme Apobec est exprimée dans l'intestin chez l'homme, tandis que chez la souris elle est aussi exprimée au niveau du foie. C'est l'une des raisons pour laquelle la concentration en LDLs dans le sang est très faible chez ces derniers [(Chan et al., 1997), (Giannoni et al., 1994), (Greeve et al., 1993), (Nakamuta et al., 1996)].

Les résultats de Farese (1996) nous montrent que le développement des souris Apobec-1^{-/-} est normal, qu'elles soient nourries avec un régime standard ou riche (Farese et al., 1996), (Morrison et al., 1996).

En délétant le gène de l'Apobec, la concentration en apo-B100 dans le sang de ces souris augmente donc [(Giannoni et al., 1994), (Hirano et al., 1996), (Morrison et al., 1996)].

En plus de cette construction, le gène de l'apo-B100 humaine a été intégré dans le génome de ces souris via croisement de souris Apobec-1^{-/-} avec des souris transgéniques apoB humaine (TgB) (Nakamuta et al., 1996).

Ainsi, l'absence d'« editing » de l'ARNm de l'apoB est associé à une augmentation de la concentration en cholestérol, triglycérides et LDLs dans le sang [(Chan et al., 1997), (Nakamuta et al., 1996)].

Ces souris sont accessibles facilement puisqu'elles sont disponibles grâce à une collaboration avec les Dr. K. Zouaoui Boudjeltia et Luc Vanhamme (ULB).

A partir de ce modèle murin, nous pourrions par exemple réaliser des coupes histologiques des lésions athéroscléreuses, en étudiant l'expression de l'arginase-1 et l'arginase-2 comme Khallou-Laschet l'a déjà fait sur des souris ApoE^{-/-} (Khallou-Laschet et al., 2010). Nous pourrions aussi compléter ces données en étudiant l'expression de MRC1 et iNOS par immunohistochimie. De plus, nous pourrions nous intéresser à une classe de macrophages encore peu documentés, qui représenterait 30 % des macrophages dans les lésions athéromateuses avancées murines : les Mox. Cette étude nous permettra aussi de suivre notamment l'expression d'HO-1 puisque leur présence est liée à une expression plus élevée de gènes tels que la *hème oxygénase* [(Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011), (Kadl et al., 2010)].

Il subsiste, encore à ce jour, de nombreuses questions sans réponses concernant la polarisation des macrophages et l'impact des LDLs sur cette polarisation, en particulier *in vivo*.

Ce mémoire a permis de mettre en évidence que les macrophages RAW 264.7 peuvent être polarisés. Il a également permis de démontrer que ces cellules, alors polarisées M1 ou M2, étaient toujours capables de former des cellules spumeuses, tout en conservant leur capacité de discriminer les Ox-LDLs et les Mox-LDLs.

De plus, ces LDLs modifiées, et plus particulièrement les Mox-LDLs, semblent interférer avec le phénotype des macrophages. Les travaux présentés dans ce mémoire confirment, avec les données de Calay et al (2010), qu'on ne peut plus se limiter à étudier les effets de LDLs oxydées avec du CuSO₄, mais qu'il faut également poursuivre les travaux avec des formes oxydées de LDLs plus pertinentes, telles que les Mox-LDLs, moins bien caractérisées, mais dont l'impact sur les macrophages semble particulièrement important, en tous cas *in vitro*. Il s'agit donc d'une voie qu'il sera nécessaire de poursuivre plus à fond à l'avenir, tant par des approches *in vitro* que par des approches *in vivo*, afin d'affiner encore notre compréhension

du rôle et des mécanismes de la polarisation des macrophages dans les lésions athéroscléreuses.

REFERENCES

6. Références

6.1. Bibliographie

- Adachi, H., and Tsujimoto, M. (2006). Endothelial scavenger receptors. *Prog Lipid Res* 45, 379-404.
- Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.
- Akiba, S., Yoneda, Y., Ohno, S., Nemoto, M., and Sato, T. (2003). Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. *J Lipid Res* 44, 1676-1685.
- Akishima, Y., Akasaka, Y., Ishikawa, Y., Lijun, Z., Kiguchi, H., Ito, K., Itabe, H., and Ishii, T. (2005). Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development. *Mod Pathol* 18, 365-373.
- Aukrust, P., Halvorsen, B., Yndestad, A., Ueland, T., Oie, E., Otterdal, K., Gullestad, L., and Damas, J. K. (2008). Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1909-1919.
- Barbul, A. (2008). Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *J Nutr* 138, 2021S-2024S.
- Bea, F., Hudson, F. N., Chait, A., Kavanagh, T. J., and Rosenfeld, M. E. (2003). Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. *Circ Res* 92, 386-393.
- Beffert, U., Stolt, P. C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J Lipid Res* 45, 403-409.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J. L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181, 3733-3739.
- Berneis, K. K., and Krauss, R. M. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 43, 1363-1379.
- Bjorkbacka, H., Kunjathoor, V. V., Moore, K. J., Koehn, S., Ordija, C. M., Lee, M. A., Means, T., Halmen, K., Luster, A. D., Golenbock, D. T., and Freeman, M. W. (2004). Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10, 416-421.
- Blanc, V., and Davidson, N. O. (2010). APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 594-602.
- Boskovic, J., Arnold, J. N., Stilion, R., Gordon, S., Sim, R. B., Rivera-Calzada, A., Wienke, D., Isacke, C. M., Martinez-Pomares, L., and Llorca, O. (2006). Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor. *J Biol Chem* 281, 8780-8787.

- Boudjeltia K. Z., L. I., Van Antwerpen P., Kisoka R. L., Babar S., Moguilevsky N., Delree P., Ducobu J., Remacle C., Vanhaeverbeek M., and Brohee D. (2006). Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL. *Biochem Cell Biol* 84, 805–812.
- Bouhrel, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., *et al.* (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6, 137-143.
- Brocheriou, I., Maouche, S., Durand, H., Braunersreuther, V., Le Naour, G., Gratchev, A., Koskas, F., Mach, F., Kzhyshkowska, J., and Ninio, E. (2011). Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 214, 316-324.
- Calay, D., Rousseau, A., Mattart, L., Nuyens, V., Delporte, C., Van Antwerpen, P., Moguilevsky, N., Arnould, T., Boudjeltia, K. Z., and Raes, M. (2010). Copper and myeloperoxidase-modified LDLs activate Nrf2 through different pathways of ROS production in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 13, 1491-1502.
- Carr, A. C., McCall, M. R., and Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1716-1723.
- Cavelier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* 1761, 655-666.
- Cha, S. B., Rayamajhi, N., Lee, W. J., Shin, M. K., Jung, M. H., Shin, S. W., Kim, J. W., and Yoo, H. S. (2011). Generation and envelope protein analysis of internalization defective *Brucella abortus* mutants in professional phagocytes, RAW 264.7. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
- Chan, L., Chang, B. H., Nakamuta, M., Li, W. H., and Smith, L. C. (1997). Apobec-1 and apolipoprotein B mRNA editing. *Biochim Biophys Acta* 1345, 11-26.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Baron, M., Bouhrel, M. A., Vanhoutte, J., Copin, C., Sebti, Y., Derudas, B., Mayi, T., Bories, G., Tailleux, A., *et al.* (2011). Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRAalpha pathways. *Circ Res* 108, 985-995.
- Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2011). Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. *Curr Opin Lipidol* 22, 365-372.
- Chow, A., Brown, B. D., and Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* 11, 788-798.
- Daugherty, A., Dunn, J. L., Rateri, D. L., and Heinecke, J. W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94, 437-444.
- Davignon, J., Cohn, J. S., Mabile, L., and Bernier, L. (1999). Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 286, 115-143.

- Elhelu, M. A. (1983). The role of macrophages in immunology. *J Natl Med Assoc* 75, 314-317.
- Farese, R. V., Jr., Veniant, M. M., Cham, C. M., Flynn, L. M., Pierotti, V., Loring, J. F., Traber, M., Ruland, S., Stokowski, R. S., Huszar, D., and Young, S. G. (1996). Phenotypic analysis of mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apolipoprotein B100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6393-6398.
- Feig, J. E., Parathath, S., Rong, J. X., Mick, S. L., Vengrenyuk, Y., Grauer, L., Young, S. G., and Fisher, E. A. (2011). Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* 123, 989-998.
- Fidge, N. H. (1999). High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* 40, 187-201.
- Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A., and Cook, A. D. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 178, 5245-5252.
- Fredenrich, A., and Bayer, P. (2003). Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab* 29, 201-205.
- Gent, J., and Braakman, I. (2004). Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci* 61, 2461-2470.
- Getz, G. S., and Reardon, C. A. (2006). Arginine/arginase NO NO NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 237-239.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M. E., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25, 57-70.
- Ghosh, S., Zhao, B., Bie, J., and Song, J. (2010). Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 52, 1-10.
- Giannoni, F., Bonen, D. K., Funahashi, T., Hadjiagapiou, C., Burant, C. F., and Davidson, N. O. (1994). Complementation of apolipoprotein B mRNA editing by human liver accompanied by secretion of apolipoprotein B48. *J Biol Chem* 269, 5932-5936.
- Glass, C. K., and Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503-516.
- Goerdts, S., and Orfanos, C. E. (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10, 137-142.
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1973). Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2804-2808.
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 431-438.

- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1, S9-17.
- Gordon, S., and Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Gotoh, T., and Mori, M. (1999). Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 144, 427-434.
- Greaves, D. R., and Gordon, S. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 50 Suppl, S282-286.
- Greeve, J., Altkemper, I., Dieterich, J. H., Greten, H., and Windler, E. (1993). Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 34, 1367-1383.
- Groeneweg, M., Kanters, E., Vergouwe, M. N., Duerink, H., Kraal, G., Hofker, M. H., and de Winther, M. P. (2006). Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine macrophages is enhanced by prior exposure to oxLDL. *J Lipid Res* 47, 2259-2267.
- Harris, N., Super, M., Rits, M., Chang, G., and Ezekowitz, R. A. (1992). Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood* 80, 2363-2373.
- Hazen, S. L., and Heinecke, J. W. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99, 2075-2081.
- Herrero, L., Shapiro, H., Nayer, A., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2010). Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 240-245.
- Herz, J. (2001). Deconstructing the LDL receptor--a rhapsody in pieces. *Nat Struct Biol* 8, 476-478.
- Hirano, K., Young, S. G., Farese, R. V., Jr., Ng, J., Sande, E., Warburton, C., Powell-Braxton, L. M., and Davidson, N. O. (1996). Targeted disruption of the mouse apobec-1 gene abolishes apolipoprotein B mRNA editing and eliminates apolipoprotein B48. *J Biol Chem* 271, 9887-9890.

- Hirose, K., Iwabuchi, K., Shimada, K., Kiyanagi, T., Iwahara, C., Nakayama, H., and Daida, H. (2011). Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. *Lipids Health Dis* 10, 1.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 125-138.
- Innerarity, T. L., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Krauss, R. M., Vega, G. L., Grundy, S. M., Friedl, W., Davignon, J., and McCarthy, B. J. (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 31, 1337-1349.
- Jeon, H., and Blacklow, S. C. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74, 535-562.
- Johnson, J. L., and Newby, A. C. (2009). Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 20, 370-378.
- Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213-219.
- Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., Elliott, M. R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., *et al.* (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 107, 737-746.
- Kariv, I., Truneh, A., and Sweet, R. W. (1996). Analysis of the site of interaction of CD28 with its counter-receptors CD80 and CD86 and correlation with function. *J Immunol* 157, 29-38.
- Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A. T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., and Caligiuri, G. (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 5, e8852.
- Khera, A. V., and Rader, D. J. (2010). Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* 12, 73-81.
- Kim, J. S., Yeo, S., Shin, D. G., Bae, Y. S., Lee, J. J., Chin, B. R., Lee, C. H., and Baek, S. H. (2010). Glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin pathway is involved in toll-like receptor 4-mediated NADPH oxidase 1 expression in macrophages. *FEBS J* 277, 2830-2837.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I. A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12, 231-238.
- Kwan, B. C., Kronenberg, F., Beddhu, S., and Cheung, A. K. (2007). Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol : JASN* 18, 1246-1261.
- Lagrost, L., Masson, D., and Chapman, J. (2007). Lipoprotéines et métabolisme lipidique. *Société Française d'Athérosclérose*, 1-4.

- Lau, D., and Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 111, 16-26.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11, 750-761.
- Li, H., Meininger, C. J., Hawker, J. R., Jr., Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M., Jr., and Wu, G. (2001). Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E75-82.
- Li, Z., Mintzer, E., and Bittman, R. (2006). First synthesis of free cholesterol-BODIPY conjugates. *J Org Chem* 71, 1718-1721.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z., and Folco, E. (2010). Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74, 213-220.
- Lieu, H. D., Withycombe, S. K., Walker, Q., Rong, J. X., Walzem, R. L., Wong, J. S., Hamilton, R. L., Fisher, E. A., and Young, S. G. (2003). Eliminating atherogenesis in mice by switching off hepatic lipoprotein secretion. *Circulation* 107, 1315-1321.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lopes-Virella, M. F., Binzafar, N., Rackley, S., Takei, A., La Via, M., and Virella, G. (1997). The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the Fc gamma RI receptor. *Atherosclerosis* 135, 161-170.
- Lopez, D., and McLean, M. P. (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology* 140, 5669-5681.
- Lopez-Castejon, G., Baroja-Mazo, A., and Pelegrin, P. (2010). Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cell Mol Life Sci*.
- Lorkowski, S., and Cullen, P. (2002). ABCG subfamily of human ATP-binding cassette proteins. *Pure Appl Chem* 74, 2057-2081.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Mackaness, G. B. (1977). Cellular immunity and the parasite. *Adv Exp Med Biol* 93, 65-73.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451, 914-918.
- Malle, E., Furtmuller, P. G., Sattler, W., and Obinger, C. (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol* 152, 838-854.
- Mansbach, C. M., and Siddiqi, S. A. (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol* 72, 315-333.

- Mantovani, A., Garlanda, C., and Locati, M. (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1419-1423.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37, 14-16.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Marathe, C., Bradley, M. N., Hong, C., Lopez, F., Ruiz de Galarreta, C. M., Tontonoz, P., and Castriello, A. (2006). The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *J Biol Chem* 281, 32197-32206.
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177, 7303-7311.
- Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27, 451-483.
- Martinez-Nunez, R. T., Louafi, F., and Sanchez-Elsner, T. (2011). The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL13Ralpha1). *J Biol Chem* 286, 1786-1794.
- Martinez-Pomares, L., Linehan, S. A., Taylor, P. R., and Gordon, S. (2001). Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology* 204, 527-535.
- Mathew, S. J., Haubert, D., Kronke, M., and Leptin, M. (2009). Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci* 122, 1939-1946.
- Mege, J.-L. (2010). La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes? *Médecine/Science* 1, 83-88.
- Mege, J. L., Mehraj, V., and Capo, C. (2011). Macrophage polarization and bacterial infections. *Curr Opin Infect Dis* 24, 230-234.
- Mehta, J. L., Chen, J., Hermonat, P. L., Romeo, F., and Novelli, G. (2006). Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 69, 36-45.
- Michelsen, K. S., Wong, M. H., Shah, P. K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T. M., Akira, S., Rajavashisth, T. B., and Arditi, M. (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10679-10684.
- Miller, Y. I., Choi, S. H., Fang, L., and Harkewicz, R. (2009). Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc Med* 19, 227-232.

- Miller, Y. I., Choi, S. H., Fang, L., and Tsimikas, S. (2010). Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem* 51, 229-251.
- Miller, Y. I., Viriyakosol, S., Worrall, D. S., Boullier, A., Butler, S., and Witztum, J. L. (2005). Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1213-1219.
- Moguilevsky, N., Zouaoui Boudjeltia, K., Babar, S., Delree, P., Legssyer, I., Carpentier, Y., Vanhaeverbeek, M., and Ducobu, J. (2004). Monoclonal antibodies against LDL progressively oxidized by myeloperoxidase react with ApoB-100 protein moiety and human atherosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1223-1228.
- Moore, K. J., and Freeman, M. W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1702-1711.
- Moore, K. J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355.
- Morrison, J. R., Paszty, C., Stevens, M. E., Hughes, S. D., Forte, T., Scott, J., and Rubin, E. M. (1996). Apolipoprotein B RNA editing enzyme-deficient mice are viable despite alterations in lipoprotein metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7154-7159.
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212.
- Mosser, D. M., and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Murata, Y., Shimamura, T., and Hamuro, J. (2002). The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 14, 201-212.
- Murphy, J. E., Tacon, D., Tedbury, P. R., Hadden, J. M., Knowling, S., Sawamura, T., Peckham, M., Phillips, S. E., Walker, J. H., and Ponnambalam, S. (2006). LOX-1 scavenger receptor mediates calcium-dependent recognition of phosphatidylserine and apoptotic cells. *Biochem J* 393, 107-115.
- Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H., and Ponnambalam, S. (2005). Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182, 1-15.
- Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 89, 557-563.
- Nakamuta, M., Chang, B. H., Zsigmond, E., Kobayashi, K., Lei, H., Ishida, B. Y., Oka, K., Li, E., and Chan, L. (1996). Complete phenotypic characterization of apobec-1 knockout mice with a wild-type genetic background and a human apolipoprotein B transgenic background, and restoration of apolipoprotein B mRNA editing by somatic gene transfer of Apobec-1. *J Biol Chem* 271, 25981-25988.

- Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 111, 769-778.
- Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J., Shih, D. M., Van Lenten, B. J., Frank, J. S., Demer, L. L., *et al.* (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 831-842.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K. L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C. W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., *et al.* (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468, 1119-1123.
- Orozco, L. D., Kapturczak, M. H., Barajas, B., Wang, X., Weinstein, M. M., Wong, J., Deshane, J., Bolisetty, S., Shaposhnik, Z., Shih, D. M., *et al.* (2007). Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res* 100, 1703-1711.
- Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1 β in mouse macrophage. *J Immunol* 180, 7147-7157.
- Pello, O. M., Silvestre, C., De Pizzol, M., and Andres, V. (2011). A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 216, 1172-1176.
- Pepine, C. J. (2001). Why vascular biology matters. *Am J Cardiol* 88, 5K-9K.
- Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., El Kasmi, K. C., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2009). Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5, e1000371.
- Pluddemann, A., Neyen, C., and Gordon, S. (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43, 207-217.
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., and Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Podojil, J. R., and Sanders, V. M. (2005). CD86 and β 2-adrenergic receptor stimulation regulate B-cell activity cooperatively. *Trends Immunol* 26, 180-185.
- Podrez, E. A., Hoppe, G., O'Neil, J., and Hoff, H. F. (2003). Phospholipids in oxidized LDL not adducted to apoB are recognized by the CD36 scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 34, 356-364.
- Podrez, E. A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P. J., Shan, L., Febbraio, M., Hajjar, D. P., *et al.* (2002a). A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 277, 38517-38523.

- Podrez, E. A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P. J., Shan, L., Gugiu, B., Fox, P. L., *et al.* (2002b). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 277, 38503-38516.
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A. C., Leone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D., and Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 142, 481-489.
- Rader, D. J., and Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904-913.
- Rigotti, A., Acton, S. L., and Krieger, M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270, 16221-16224.
- Sansom, D. M., Manzotti, C. N., and Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol* 24, 314-319.
- Sanz, J., and Fayad, Z. A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451, 953-957.
- Schindhelm, R. K., van der Zwan, L. P., Teerlink, T., and Scheffer, P. G. (2009). Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem* 55, 1462-1470.
- Schuett, H., Luchtefeld, M., Grothusen, C., Grote, K., and Schieffer, B. (2009). How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 102, 215-222.
- Shimokawa, H., and Tsutsui, M. (2010). Nitric oxide synthases in the pathogenesis of cardiovascular disease: lessons from genetically modified mice. *Pflugers Arch* 459, 959-967.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., Rimoldi, M., Biswas, S. K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18, 349-355.
- Smith, H. C., Bennett, R. P., Kizilyer, A., McDougall, W. M., and Prohaska, K. M. (2011). Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol*.
- Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 50 Suppl, S376-381.
- Stephen, S. L., Freestone, K., Dunn, S., Twigg, M. W., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H., Wheatcroft, S. B., and Ponnambalam, S. (2010). Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int J Hypertens* 2010, 646929.
- Stocker, R., and Keaney, J. F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84, 1381-1478.
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175, 342-349.

- Tabas, I., Seimon, T., Timmins, J., Li, G., and Lim, W. (2009). Macrophage apoptosis in advanced atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1173 Suppl 1, E40-45.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2011). Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur J Immunol* 41, 2490-2493.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 901-944.
- Teng, B. B., Ochsner, S., Zhang, Q., Soman, K. V., Lau, P. P., and Chan, L. (1999). Mutational analysis of apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC1). structure-function relationships of RNA editing and dimerization. *J Lipid Res* 40, 623-635.
- Teupser, D., Burkhardt, R., Wilfert, W., Haffner, I., Nebendahl, K., and Thiery, J. (2006). Identification of macrophage arginase I as a new candidate gene of atherosclerosis resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 365-371.
- Thorp, E., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 86, 1089-1095.
- van der Poll, T., Keogh, C. V., Guirao, X., Buurman, W. A., Kopf, M., and Lowry, S. F. (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 176, 439-444.
- van der Velde, A. E. (2010). Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J Gastroenterol* 16, 5908-5915.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., and De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211, 487-501.
- van Tits, L. J., Stienstra, R., van Lent, P. L., Netea, M. G., Joosten, L. A., and Stalenhoef, A. F. (2011). Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 214, 345-349.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- Webb, P. (2009). Alternative macrophage activation and the regulation of metabolism. *F1000 biology reports* 1, 2.
- Weber, C., and Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17, 1410-1422.
- Wolfs, I. M., Donners, M. M., and de Winther, M. P. (2011). Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb Haemost* 106.
- Woollard, K. J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7, 77-86.

Yoshida, H., and Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 411, 1875-1882.

Yoshikawa, M., Yabuuchi, H., Kuroiwa, A., Ikegami, Y., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Matsuda, Y., Yoshida, H., and Ishikawa, T. (2002). Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter Abcg4. *Gene* 293, 67-75.

Yvan-Charvet, L., Wang, N., and Tall, A. R. (2010). Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 139-143.

Ziouzenkova, O., Sevanian, A., Abuja, P. M., Ramos, P., and Esterbauer, H. (1998). Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. *Free Radic Biol Med* 24, 607-623.

Calay, D. (2011). Etude comparative des LDLs oxydées avec du sulfate de cuivre ou de la myéloperoxydase sur des macrophages et des cellules endothéliales en culture – Importance de la voie de signalisation Nrf2. (Thèse)

Caesens-Koenig, L. (2010). Caractérisation de la réponse des cellules endothéliales humaines EAhy926 aux LDLs natives et modifiées : importance du facteur de transcription Nrf2 en conditions statiques et dynamiques. (Mémoire)

6.2. Webographie

CliffsNotes.com, *Phagocytosis* :
http://www.cliffsnotes.com/study_guide/topicArticleId-8524,articleId-8471.html, visité le 15 octobre 2011.

CytoScan™ LDH Cytotoxicity assay
<http://www.gbiosciences.com/CytoscanLDHCytotoxicityAssayKit.aspx>, visité le 13 octobre 2011.

De Bandt, J-P., Moinard, C., and Cynober, L. (2006). Polyamine functions and metabolism. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 21, 333-341.

Deshpande, A. (2010). Phagocytosis process :
<http://www.buzzle.com/articles/phagocytosis-process.html>, visité le 1^{er} septembre 2011.

Hsueh, R., and Roach, T. (2008). Passage procedure for RAW 264.7 cells:
http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PP00000159.pdf?pid=PP00000159, visité le 10 mars 2011.

Imbert-Marcille, B.-M., and Robillard, N. (1999). Flow cytometry and clinical virology. John Libbey Eurotext:
http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/vir/e-docs/00/03/F8/A6/article.md

MCLAB : Colorimetric cell proliferation assay kit (MTT assay).
<http://www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=116>, visité le 13 octobre 2011.

Ovizio's Quantitative Imaging Devices :
<http://www.ovizio.com/>, visité le 28 septembre 2011.

quantitative real-time PCR.
http://thymocyte.blogspot.com/2010_02_01_archive.html, visité le 13 octobre 2011.

Toussait, J.-F, Jacob, M.-P., Lagrost, L. and Chapman, J. (2003). L'athérosclérose. Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. Masson *1*, 1-742.

