



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets de l'isoprostane sur l'expression génique de cellules endothéliales en culture

Colette, Delphine

Award date:
2003

[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

**Effets de l'isoprostane sur l'expression génique
de cellules endothéliales en culture**

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

Delphine Colette

Juin 2003

I.1 L'endothélium, interface important entre sang et tissu

L'endothélium, bordant l'intérieur des vaisseaux sanguins, est constitué d'une monocouche de cellules pavimenteuses reposant sur une lame basale. La cohésion entre ces cellules est assurée par des complexes jonctionnels intercellulaires faisant intervenir un réseau de protéines membranaires, cytoplasmiques et du cytosquelette.

En dépit de leur structure simple, les cellules endothéliales constituent un tissu complexe possédant de nombreuses fonctions spécifiques adaptables en fonction des besoins.

On peut notamment citer leur rôle important dans le maintien de la perméabilité sélective, dans la régulation du tonus vasculaire, de la thrombo-résistance, de la différenciation et de la croissance cellulaire, des interactions leucocytes - tissus ainsi que dans la régulation des réponses immunes et inflammatoires (pour une revue, Demuth et al., 1995 et Luscher and Barton, 1997).

Pour mieux comprendre l'importance des cellules endothéliales au sein de l'interface sang / tissu, voici une courte description de leurs principales fonctions :

- Barrière à perméabilité sélective

L'endothélium, de par sa localisation en bordure des vaisseaux sanguins, est doté d'une perméabilité sélective grâce à laquelle il joue un rôle prépondérant dans les échanges entre plasma et tissus.

Cette perméabilité peut être modifiée notamment lors de stress pro-inflammatoires.

- Régulation des mécanismes de la coagulation

La cellule endothéliale est l'un des éléments essentiels dans la régulation du système hémostasique puisqu'elle peut développer à la fois des propriétés anti- et pro-thrombotiques. En effet, au repos, les fonctions anti-thrombotiques et anti-coagulantes prédominent, ce qui assure la fluidité du sang et la libre circulation des plaquettes; cependant, cet équilibre doit être prêt à basculer à tout moment afin d'assurer, par exemple, une cicatrisation en cas d'hémorragies lors de blessures vasculaires. Les principaux modes d'action des cellules endothéliales concernant la régulation de la coagulation ont été représentés schématiquement à la *figure I.1*.

Afin d'assurer un environnement anti-thrombotique, les cellules endothéliales peuvent intervenir à 3 niveaux différents :

1. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire

La cellule au repos libère de la prostacycline (PGI_2) qui constitue un puissant inhibiteur d'agrégation plaquettaire, ainsi que de l'oxyde nitrique (NO), en production basale, qui inhibe l'activation des plaquettes (*figure I.1*).

Certaines des molécules localisées en membrane des cellules endothéliales jouent également un rôle, telle l'héparane sulfate liant différentes molécules dont l'anti-thrombine III qui va lier et inhiber la thrombine (*figure I.2*). Enfin, on retrouve également en membrane, une enzyme nommée ecto-ADPase qui va décomposer l'ADP extracellulaire activant les plaquettes.

2. L'inhibition de la coagulation

Au repos, la cellule endothéliale exprime en surface la thrombomoduline qui constitue un récepteur de la thrombine. La capture de la thrombine par celle-ci permet d'activer la protéine C en la clivant. Cette protéine C va alors se dimériser avec la protéine S pour venir inactiver les facteurs V et VIII de la cascade de coagulation (*figures I.1 et I.2*).

3. L'activation de la fibrinolyse

La cellule endothéliale participe à la fibrinolyse en libérant les activateurs de plasminogène tissulaire (t-PA) ou de type urokinase (u-PA). Ceux-ci permettent la transformation du plasminogène en plasmine qui assure la dégradation du thrombus par attaque du réseau de fibrine (Demuth et al., 1995).

Par contre, une fois activées, les cellules endothéliales agiront à l'inverse sur les 3 niveaux suivants :

1. L'activation de l'agrégation plaquettaire

L'endothélium active l'agrégation plaquettaire en synthétisant le facteur d'activation des plaquettes (PAF), médiateur de la réponse inflammatoire. Le PAF est vasoconstricteur, il active les plaquettes et les leucocytes, il augmente l'adhérence des polynucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales et agit de façon combinée avec la PGI₂ pour augmenter la perméabilité vasculaire induite par l'IL-1.

La libération du thromboxane A₂ (TXA₂) favorise également l'agrégation plaquettaire en diminuant le taux d'AMP cyclique des cellules (Demuth et al., 1995) (*figure I.1*).

2. L'activation de la coagulation

La voie intrinsèque, faisant intervenir les facteurs XI, XII, IX,... et la voie extrinsèque ou tissulaire via le facteur VII de la cascade de la coagulation, activent le facteur X. Celui-ci va permettre la formation de thrombine afin de transformer le fibrinogène en fibrine qui est le constituant principal du caillot (Crossman et al., 1990) (*Figure I.3*).

La cellule endothéliale va exprimer le facteur tissulaire (TF). Il s'agit d'une protéine transmembranaire liant le facteur VII de la coagulation et l'activant. Celui-ci s'associe au calcium et active le facteur X qui déclenche la voie extrinsèque de la coagulation. L'endothélium peut également activer la coagulation en synthétisant et en libérant le facteur V de la coagulation (Demuth et al., 1995).

La cellule endothéliale libère enfin le facteur de von Willebrand, stocké dans les corps de Weibel-Palade. Ce dernier liera le facteur VIII et le stabilisera (*figure I.1*).

3. L'inhibition de la fibrinolyse

La cellule endothéliale est capable d'inhiber la fibrinolyse en synthétisant l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1).

- Régulation du tonus vasculaire

En temps normal, la cellule endothéliale doit maintenir un équilibre entre les substances à tendance vasodilatatrice et vasoconstrictrice.

Les deux principaux agents vasodilatateurs sont la prostacycline (PGI₂) et le NO, longtemps connu sous le nom de EDRF (endothelium derived relaxing factor).

La PGI₂, dérivée de l'acide arachidonique, est libérée par les cellules endothéliales suite à l'action de molécules stimulatrices telles que l'IL-1 et l'histamine. Elle agit directement sur les cellules musculaires lisses (CML) en augmentant leur taux d'AMP cyclique intracellulaire. Elle induit ainsi la relaxation des CML, tout en inhibant leur croissance.

En condition de repos, la production de NO est faible, car elle est induite par la NO synthase constitutive (cNOS) (*figure I.4 A*). Il permet le maintien des vaisseaux dans un état dilaté. Par contre, en conditions pro-inflammatoires, la NO synthase inductible (iNOS) est néo-synthétisée et contribue à produire du NO en grosses quantités de façon irrégulière, ce qui peut même induire une toxicité pour les cellules.

Les principaux agents vasoconstricteurs sont le thromboxane A₂ (TXA₂), l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (Luscher and Barton, 1997).

Le TXA₂ dérive aussi du métabolisme de l'acide arachidonique. Il a l'effet inverse de la PGI₂, car il diminue le taux d'AMP cyclique des CML et exerce sur celles-ci une action vasoconstrictrice.

L'endothéline-1, synthétisée par les cellules endothéliales, est un vasoconstricteur puissant, mais aussi un agent mitogène pour les CML et les cellules endothéliales elles-mêmes. Sa sécrétion est favorisée par l'angiotensine II qui dérive de l'angiotensinogène et est également un vasoconstricteur puissant. L'angiotensinogène est transformé en angiotensine I sous l'action de la rénine, pour être converti, au niveau de la surface endothéliale pulmonaire, en angiotensine II, par l'angiotensine convertant enzyme (ACE). La liaison de l'angiotensine II au récepteur à la surface de la cellule endothéliale, va donc induire la synthèse d'un précurseur de l'endothéline (la preproET). Une fois formée, l'endothéline va agir directement sur les CML vasculaires par l'intermédiaire de son récepteur de type A (ET_A) (Demuth et al., 1995) (*figure I.4 B*).

- L'endothélium en tant que tissu sécrétoire

A la fois source et cible de molécules à actions diverses, la cellule endothéliale participe par ce biais activement à la communication intercellulaire. En effet, elle libère des molécules vasoactives comme le PGI₂, l'ET-1,... des cytokines comme l'IL-8, l'IL-1, le TNF α et l'IL-6, des chémokines tel que le MCP-1 qui favorise le recrutement des leucocytes, divers facteurs de croissance comme les CSF (colony stimulating factor) qui contribuent à la différenciation des leucocytes, du FGF et du VEGF, facteurs pro-angiogènes, et enfin de protéines et des glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire.

- L'endothélium en tant que tissu activable.

Des **molécules vasoactives** comme l'ATP, la bradykinine, l'histamine,... induisent une activation très rapide sans induire la transcription ou la traduction de protéines particulières. En général, cela passe par une augmentation de la concentration en calcium et des activations enzymatiques.

Les **cytokines** peuvent avoir des effets rapides ou plus lents, avec activation de facteurs de transcription tels que AP-1, NF κ B,... La plupart de ces facteurs de transcription font intervenir des mécanismes de régulation impliquant des phénomènes de phosphorylation. C'est notamment le cas d'AP-1, facteur de transcription intervenant dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, mais également dans les processus pro-inflammatoires. Il se présente sous forme d'un homo ou d'un hétérodimère de protéines appartenant à une vaste famille : comprenant entre autres, les protéines Fos et Jun (pour une revue, voir Karin *et al.*, 1997). Hormis les dimères Fos/Fos, toutes sortes de combinaisons sont possibles, ce qui lui confère un large éventail de caractéristiques notamment en ce qui concerne sa stabilité, sa liaison à l'ADN et les gènes induits. Son mode d'action a été résumé à la *figure I.5* et fait notamment intervenir des voies de transduction du signal telles que celle de la PKC et celle des MAPK.

En ce qui concerne NF κ B, son mode d'activation fait également intervenir des mécanismes de phosphorylation (pour une revue, voir Ghosh and Karin, 2002).

Des **stress divers** peuvent également activer l'endothélium. Ceux-ci peuvent être des stress oxydants, hypoxiques ou mécaniques induisant des forces de cisaillement au niveau des cellules endothéliales. Dans ce dernier cas, la réponse sera fonction du type de stress, de la durée et de son intensité.

Toutes ces fonctions interagissent les unes avec les autres afin d'assurer le maintien d'un équilibre global et nécessitent donc une régulation fine. Comme nous venons de le voir, s'il y a une activation soutenue de l'endothélium, cela va entraîner des perturbations fondamentales des propriétés de celui-ci menant à un dysfonctionnement endothélial (*figure 1.6*). Si ces phénomènes persistent, des processus pathologiques chroniques vont se mettre en place tels que l'athérosclérose qui est une maladie cardiovasculaire touchant principalement les artères et qui fait l'objet du chapitre suivant.

I.2. L'athérosclérose

Dans le chapitre précédent, nous avons souligné l'importance du dysfonctionnement endothélial dans le développement de l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une pathologie qui engendre un désordre au niveau des grandes et moyennes artères musculaires, comme les artères coronaires ou carotides, ainsi qu'au niveau des artères élastiques comme l'aorte ou l'artère iliaque (Collins, 1993). L'athérosclérose est due à la formation d'une plaque d'athérome provenant de l'accumulation de cholestérol dans la paroi interne de l'artère. Cette accumulation va provoquer un épaissement de l'intima et une réduction de la média suite à la migration et à la prolifération des cellules musculaires lisses. L'ensemble de ces phénomènes provoque un rétrécissement de la lumière de l'artère, compromettant ainsi le flux du sang et affectant l'apport d'oxygène dans la région concernée (Ross, 1995).

Les maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose est l'une des causes majeures, sont la première cause de mortalité aux Etats-Unis et en Europe. L'athérosclérose reste l'une des causes principales des infarctus du myocarde et cérébraux (Ross, 1986). Elle peut être considérée comme une maladie inflammatoire chronique qui progresse lentement avant la manifestation de symptômes cliniques (Busse and Fleming, 1996).

Le point de départ de cette affection est dans un premier temps une « réponse à une blessure » vasculaire (Busse and Fleming, 1996).

I.2.1 Rappel de la structure générale de l'artère normale

Les artères, qui transportent le sang venant du cœur, répondent toutes à un modèle commun d'organisation (*figure I.7*).

En effet, leur paroi est constituée de trois couches distinctes qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la média et l'adventice (*figure I.8*).

L'intima est recouverte d'une assise de cellules endothéliales qui reposent sur une lame basale, sous laquelle se trouve une couche de tissu conjonctif, la sub-endothéliale.

L'intima est la couche la plus externe et la plus fine, séparant le sang des tissus périphériques. C'est à ce niveau que se développent les lésions typiques de l'athérosclérose.

La média est une couche intermédiaire, plus épaisse, constituée principalement de cellules musculaires lisses renforcées par des couches organisées de fibres élastiques. La quantité de ces fibres élastiques varie d'un type d'artère à l'autre. La média est séparée de l'intima par une limitante élastique interne, du moins dans les artères musculaires de gros calibre.

L'adventice est composée, en grande partie, de collagène de type I, de fibroblastes et de quelques fibres élastiques. Les artères, ayant une paroi épaisse, possèdent de petits vaisseaux sanguins, les vasa vasorum, envoyant des ramifications dans la média pour lui fournir le sang.

I.2.2 Initiation de la lésion athérosclérotique

La lésion athérosclérotique est l'aboutissement d'une succession d'événements. Trois stades majeurs de l'évolution de la maladie sont reconnus (*figures I.9 et I.10*) :

- **La strie lipidique** : Il s'agit d'une lésion précoce et réversible. Ce genre de lésion est assez courant. Il n'est pas rare de la retrouver au niveau d'artères de jeunes enfants. Elle se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui permet l'entrée de LDL (low density lipoprotein) dans l'intima, ainsi que le recrutement de monocytes et de lymphocytes T au niveau de la sub-endothéliale. Les monocytes, différenciés en macrophages, se chargent progressivement en esters de cholestérol pour devenir des cellules spumeuses (*figures I.9 C et 10*). Certaines stries lipidiques évoluent en plaque athéromateuse, alors que d'autres disparaissent ou se stabilisent.
- **La lésion fibro-lipidique** : Pendant que les monocytes continuent leur migration et se différencient en macrophages puis en cellules spumeuses, les cellules musculaires lisses sont recrutées à partir de la média. Certaines deviennent, à leur tour, des cellules spumeuses en se chargeant également de gouttelettes lipidiques et d'autres produisent une matrice extra-cellulaire (MEC) abondante, contenant du collagène, des protéoglycanes et des fibres élastiques. Ces différents processus cellulaires vont provoquer un soulèvement progressif de l'endothélium réduisant la lumière du vaisseau sanguin (*figure I.9 D*).
- **La plaque athéromateuse** : A ce stade avancé de la lésion, l'entrée de monocytes et le recrutement de cellules musculaires lisses continuent. L'intima est gorgée de cellules spumeuses et possède une MEC abondante constituant une chape fibreuse. À la base de la lésion, un cœur nécrotique se forme, constitué d'un amas de cellules mortes, d'une accumulation de lipides extra-cellulaires et de cristaux de cholestérol. La lésion est coiffée d'une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses aplaties. Celle-ci peut soit stabiliser la lésion, soit se calcifier, ce qui rend la lésion particulièrement instable. Les lésions de grande taille peuvent même subir une néo-vascularisation à partir des vasa vasorum. Ces plaques athéromateuses réduisent progressivement la lumière artérielle (*figure I.9 E*). Signalons cependant que les lésions avancées peuvent être extrêmement hétérogènes, complexes et très variables d'un patient à l'autre.

Les cellules spumeuses sécrètent des substances pro-inflammatoires qui fragilisent le revêtement en digérant la matrice et en endommageant les CML. Lorsque la plaque fragilisée se rompt, le facteur tissulaire entre en contact avec le sang et favorise ainsi la coagulation menant à la formation d'un caillot ou d'un thrombus. Si le caillot est de taille importante, il peut interrompre la circulation du sang vers le cœur, au niveau des artères coronaires par exemple, et provoquer un infarctus (*figure I.11*) (Libby, 2002).

I.2.3 Les acteurs cellulaires impliqués dans la lésion

Il semble que le développement des athéromes soit initié par un dysfonctionnement endothélial, pouvant être dû à une blessure. Ceci a pour conséquence d'activer différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les monocytes, les lymphocytes T, les plaquettes, et les cellules musculaires lisses au niveau de la paroi vasculaire. Les interactions entre ces

différentes cellules étant modifiées, cela peut engendrer le développement d'une lésion athérosclérotique (Ross, 1995).

- Les cellules endothéliales

La cellule endothéliale ne sera pas reprise ici vu qu'elle a déjà été décrite au chapitre I.1

- Les cellules musculaires lisses

Pour rappel, les cellules musculaires lisses (CML) sont localisées dans la média et constituent la majeure partie de la paroi d'une artère normale. Les CML sont responsables du maintien du tonus vasculaire. En effet, elles peuvent répondre à des agents vaso-constricteurs comme le thromboxane A₂ (TXA₂), l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine-II ou bien à des agents vaso-dilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) ou la prostacycline (PGI₂) (*figure I.4*). Une régulation très fine assure un équilibre entre ces deux tendances. En conditions pro-athérogènes, cet équilibre est déplacé vers une action vasoconstrictrice (Ross, 1995).

Au cours de l'évolution de la maladie, des CML migrent au niveau de l'intima, provoquant ainsi un épaississement de celle-ci. Elles constituent alors la chape fibreuse qui stabilise la lésion (*figure I.9 D*).

Les CML ont également une sensibilité différente face aux agents chémoattractants qui induisent la migration des CML vers l'intima. En effet, elles peuvent passer d'un « phénotype contractile », dans la média, à un « phénotype synthétique », dans l'intima. A ce moment, les filaments contractiles des CML diminuent au profit du réticulum endoplasmique (RE) et du Golgi, favorisant ainsi la synthèse d'une abondante MEC mais aussi la sécrétion de nombreuses cytokines et facteurs de croissance (Massy et al., 1996). Elles possèdent des récepteurs "scavengers" aux LDL modifiées leur permettant de se transformer en cellules spumeuses (Tedgui and Mallat, 2001).

- Les macrophages dérivés de monocytes

L'entrée des monocytes dans l'intima est considérée comme un élément clé dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

Très tôt dans l'athérogenèse, les monocytes adhèrent à l'endothélium et pénètrent dans l'intima, sous l'effet de facteurs chimiotactiques comme le MCP-1 (monocyte chemotactic protéine-1) et de l'induction de molécules d'adhérence spécifiques à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes recrutés (Tedgui and Mallat, 2001) (*figure I.10*).

Le processus d'adhérence en lui-même fait intervenir des événements multiples. Lors d'une première étape, des E- et P-sélectines sont exprimées par les cellules endothéliales stimulées. Celles-ci permettent aux monocytes de ralentir leur course tout au long de la surface endothéliale. Ensuite, l'adhérence est renforcée afin d'immobiliser les monocytes. Ce processus implique cette fois des intégrines en surface du monocyte reconnaissant leurs récepteurs spécifiques sur les cellules endothéliales (ex: les ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et les VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)) (Busse and Fleming, 1996). La diapédèse peut alors commencer.

Une fois dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages, qui deviendront des cellules spumeuses en internalisant des LDL oxydées, grâce à leurs récepteurs dits "scavengers" (Massy et al., 1996).

Au niveau de la lésion, les macrophages peuvent léser les cellules voisines en produisant des substances toxiques telles que l'anion superoxyde et des hydrolases, ainsi qu'en oxydant des

lipides. Ils peuvent aussi sécréter le PDGF (platelet derived growth factor) qui active les fibroblastes et induit la prolifération des cellules musculaires lisses (Ross, 1986).

- Les plaquettes

Suite à une blessure endothéliale par exemple, l'interaction des plaquettes avec la sub-endothéliale induit la libération de molécules régulatrices telles que le PDGF. Le PDGF va provoquer la migration et la prolifération des CML au niveau de l'intima. D'autres constituants plaquettaires comme le facteur plaquettaire 4 (PF4), la β -thromboglobuline et des éicosanoïdes peuvent être également produits. Parmi ces molécules le PDGF, le PF4, le 12-HETE (dérivé de la 12 lipoxigénase), la β -thromboglobuline sont chimiotactiques pour les monocytes (Ross, 1986 et Ross, 1995).

I.2.4 Les facteurs de risque

La plupart des facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires augmentent la probabilité d'avoir un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral.

Certains d'entre eux sont dits « constitutifs », comme le sexe, l'âge et les antécédents familiaux (Libby, 2002). En effet, la pathologie est fonction du sexe : une femme, avant la ménopause, est moins exposée aux risques que les hommes, car leurs oestrogènes modulent entre autre l'activité de la NO synthase. Après la ménopause, la diminution du taux d'oestrogènes induit une augmentation du taux d'endothéline-1 circulante (Luscher and Barton, 1997) et augmenterait ainsi le risque d'athérosclérose. La pathologie est également fonction de l'âge vu que le nombre d'années augmente les risques encourus. En ce qui concerne les antécédents familiaux, des mutations peuvent affecter le métabolisme des lipides donnant lieu à l'apparition de lésions précoces favorisant l'athérosclérose. C'est le cas de l'hypercholestérolémie familiale qui est due à différents types de mutations au niveau des récepteurs aux LDL natives.

Il existe également des facteurs majeurs liés ou non à des facteurs génétiques dont voici quelques exemples :

- Le diabète :

On sait depuis longtemps que des taux élevés en glucose, chez des patients diabétiques, peuvent causer un dysfonctionnement endothélial. En effet, des concentrations élevées en glucose augmentent l'expression de la NO synthase et la production d'anions superoxydes *in vitro* (Luscher and Barton, 1997). De plus, l'hyperglycémie altère les lipoprotéines.

- L'hypertension :

Situé à l'interface sang / tissu, l'endothélium est soumis à une double contrainte. En effet, il doit trouver un équilibre entre les forces de cisaillement et la tension pariétale. Cet équilibre est rompu en cas d'hypertension vasculaire. L'hypertension est associée à une augmentation de l'adhérence des monocytes et lymphocytes T (Busse and Fleming, 1996).

- Le tabagisme :

À long terme, le tabac constitue un facteur de risque reconnu pour les artères coronaires et les maladies vasculaires (Busse and Fleming, 1996).

- L'hyperhomocystéinémie :

L'homocystéine est un acide aminé possédant un groupement thiol mais ne participant pas à la synthèse protéique. La formation de l'homocystéine fait intervenir les voies métaboliques suivantes (*figure I.12*) : l'homocystéine résulte de la déméthylation de la méthionine. Par méthylation, elle peut reformer la méthionine. Par transsulfuration, elle donnera la cystathionine. L'hyperhomocystéinémie survient principalement lors d'une carence en vitamine B6, B12 ou en acide folique, associés à ces voies métaboliques (*figure I.12*).

Des études épidémiologiques permettent de penser que l'homocystéine agit sur l'endothélium à plusieurs niveaux. Son autooxydation engendre des dérivés actifs de l'oxygène, tel que le H₂O₂ provoquant des effets cytotoxiques sur les cellules. Elle perturbe également la vasotonicité en inactivant le NO produit par les cellules endothéliales et affecte la coagulation et l'agrégation des plaquettes, tout en perturbant la fibrinolyse (*figure I.13*).

- L'hyperlipidémie :

L'hyperlipidémie est définie comme une augmentation dans le sang d'un ou de plusieurs des composants suivants : cholestérol, cholestéryl esters, phospholipides ou triglycérides. Ceux-ci constituent la majorité des lipides plasmatiques et sont transportés par des complexes de lipides et de protéines spécialisés, appelés lipoprotéines (Talbert, 1997).

La sédentarité, l'obésité et le stress sont considérés comme des facteurs mineurs.

I.2.5 Les lipoprotéines

I.2.5.1 Structure et composition

Les lipides plasmatiques sont transportés dans le plasma sous forme de lipoprotéines qui constituent des complexes macromoléculaires solubles (Woolf, 1998). Ces complexes sont des particules souvent sphériques, possédant à leur surface, des protéines appelées apoprotéines (Apo) qui vont assurer la structure et le transport des lipoprotéines. Elles servent également de ligands spécifiques pour des récepteurs cellulaires ou de cofacteurs enzymatiques. Le coeur du complexe contient des phospholipides, des triacylglycérides et du cholestérol estérifié ou non (*figure I.14*).

On classe généralement les lipoprotéines plasmatiques en 5 catégories en fonction de leur densité, de leur composition chimique, de leur mobilité électrophorétique et des apolipoprotéines associées (*tableau I.1*):

- les chylomicrons
- les VLDL (very low density lipoprotein)
- les LDL (low density lipoprotein)
- les HDL (high density lipoprotein)
- les lipoprotéines (a)

I.2.5.2 Le métabolisme des lipides

Les chylomicrons sont formés au pôle basal de l'entérocyte, à partir des lipides issus de l'alimentation, solubilisés par les sels biliaires et absorbés au niveau de l'intestin grêle. Ces

grosses molécules, riches en Apo B48, en triglycérides, mais contenant aussi un peu de cholestérol estérifié, sont exocytées au pôle basal de l'entérocyte pour rejoindre la circulation sanguine. Au cours de ce transport, les chylomicrons vont subir des modifications dont l'acquisition de l'apolipoprotéine C (Apo C) qui active la *lipoprotéine lipase* (LPL) produite par l'endothélium vasculaire. Cette LPL va dégrader les triglycérides et permet l'acquisition d'une autre apolipoprotéine, l'Apo E. Les chylomicrons résiduels ("remnants"), résultant de ces modifications, sont captés par le foie via un récepteur à l'Apo E.

Présentons maintenant la voie endogène du métabolisme des lipides.

Le foie va produire des VLDL qui vont être sécrétées dans le sang. Ces molécules ressemblent aux chylomicrons bien que plus petites, moins riches en triglycérides et plus riches en cholestérol. La composante protéique est, quant à elle, constituée d'Apo B100, E et C. L'Apo C va activer la LPL ainsi que la lipase hépatique menant à la formation de VLDL résiduelles aussi appelées IDL (intermediate density lipoprotein), enrichies en cholestérol.

Une partie de ces IDL va être recyclée par les cellules du foie via le récepteur à Apo E et le reste continue le processus de maturation en LDL via un échange de cholestérol médié par la "cholesterol-ester transfer protein" (CEPT) des HDL. Les LDL sont riches en esters de cholestérol et possèdent comme les VLDL, l'apolipoprotéine Apo-100 leur permettant d'être réabsorbées par le foie via le récepteur aux LDL natives. Les LDL redistribuent également le cholestérol dans les tissus périphériques.

Les HDL, produites par l'intestin et le foie, sont riches en protéines telles que l'Apo AI, Apo AII, Apo E,... Les HDL sont de véritables « pompes » à cholestérol. En effet, elles extraient celui-ci des membranes cellulaires, à partir des tissus périphériques, et l'estérifient grâce à la *lysocithine cholestéryl acyl transférase* (LCAT) qui est une enzyme activée par l'Apo AI. Les HDL assurent également le transport inverse du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie, en cédant les esters de cholestérol aux LDL. Celles-ci seront captées par le foie, où le cholestérol pourra être dégradé en sels biliaires (*figures I.15*).

La lipoprotéine (a) (Lp(a)) est une lipoprotéine ressemblant aux LDL sur laquelle est attachée une glycoprotéine Apo (a). Elle semble augmenter l'accumulation du cholestérol dans les vaisseaux sanguins lésés, supprimer la formation de plasminogène au niveau des surfaces cellulaires et induire la prolifération des cellules musculaires lisses. Elle reste moins bien connue que les autres lipoprotéines.

1.2.5.3 Les lipoprotéines impliquées dans l'athérosclérose

On peut classer les lipoprotéines en 2 groupes appelés dans la vie courante le bon et le mauvais cholestérol :

a) Les lipoprotéines anti-athérogènes : les HDL ou « bon cholestérol »

Des données épidémiologiques ont démontré qu'une concentration élevée en HDL diminuait le risque de maladies cardiovasculaires (pour une revue, Nofer et al., 2002). Les HDL semblent, en effet, avoir une action protectrice contre l'athérosclérose. Non seulement, elles assurent le transport inverse du cholestérol mais aussi un grand nombre d'activités potentiellement anti-athérogènes notamment en (*figure I.16*) :

- favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses qui stabilisent la chape fibreuse.

- ayant des effets bénéfiques sur les cellules endothéliales en induisant la production de PGI₂ vasorelaxante, en favorisant leur migration et leur prolifération et en les protégeant de certaines activations.
- protégeant les LDL contre l'oxydation grâce à une production d'enzymes anti-oxydantes telles que la paraoxanase (PON) et la PAF-acétyl hydrolase (PAF-AH). La PON catalyse la dégradation des LDL oxydées et la PAF-AH élimine les acides gras oxydés.
- inhibant l'activation plaquettaire.
- favorisant le processus anti-thrombotique.

b) Les lipoprotéines pro-athérogènes : les LDL ou « mauvais cholestérol »

Des données épidémiologiques rapportent que la concentration plasmatique en LDL est en corrélation directe avec une augmentation du risque de développer une maladie cardiovasculaire. Des données cliniques démontrent également que des médicaments, comme les statines, ont un effet bénéfique en diminuant la concentration des LDL dans le sang. Les statines interfèrent directement avec la voie de biosynthèse du cholestérol, en inhibant la HMG-CoA réductase (hydroxyméthyl glutaryl-CoA reductase).

Les LDL portent une apoprotéine nommée Apo B100. Celle-ci leur permet d'effectuer la redistribution des graisses dans l'ensemble de l'organisme, car elle est spécifiquement reconnue par un récepteur nommé récepteur Apo B100/ApoE qui n'est autre que le récepteur aux LDL natives présent au niveau du foie et des tissus périphériques.

L'hypercholestérolémie familiale est due à des mutations, à différents niveaux de ces récepteurs aux LDL natives (*figures I.17*). L'Apo B100 ne sera plus reconnue par le récepteur.

Si les LDL subissent une modification telle qu'une acétylation, une glycanation ou une oxydation, elles ne seront plus reconnues par les récepteurs aux LDL natives, mais bien par des récepteurs dits "scavengers". Ces récepteurs sont exprimés, par exemple, par les macrophages (*figure I.18*).

Lorsque les LDL plasmatiques sont en excès et qu'en plus il y a une blessure endothéliale, elles s'engouffrent dans l'intima. N'étant plus protégées par les antioxydants plasmatiques, elles s'oxydent, ce qui va jouer un rôle essentiel dans les étapes précoces de l'athérogenèse.

1.2.5.4 Les LDL oxydées

In vitro, l'oxydation des LDL peut être provoquée, entre autres, par une incubation de cellules en culture avec un ion métallique lourd (*figure I.19*). *In vivo*, l'oxydation induite par les cellules endothéliales ou par les macrophages dépend des lipoperoxydes générés intracellulairement et transférés aux LDL. Les lipoxygénases cellulaires, et en particulier la 15-lipoxygénase, semblent être impliquées dans ce mécanisme. De plus, des espèces réactives en oxygène, comme l'anion superoxyde, peuvent être produites dans la média menant à l'initiation de la peroxydation lipidique dans les LDL (Witzum and Steinger, 1991 et Salvayare, 2002). Or, comme nous l'avons déjà dit, les LDL ne sont plus protégées par les antioxydants plasmatiques dans la média.

L'oxydation des LDL natives va former, dans un premier temps, des mm-LDL (minimally modified LDL), dans lesquelles seuls les lipides sont altérés. Elles sont néanmoins bioactives et toujours reconnues par le récepteur Apo B100.

Ces mm-LDL continuent à être oxydées pour former des ox-LDL (LDL oxydées) qui sont altérées au niveau des lipides et de l'Apo B100. Ces ox-LDL sont toxiques et favorisent la production de cellules spumeuses, car elles sont reconnues par les récepteurs "scavengers" des macrophages.

Une analyse en spectrométrie de masse a permis de préciser la nature des phospholipides et des acides gras trouvés au sein des ox-LDL. En effet, il semble qu'un certain nombre d'entre eux soient bioactifs, avec des effets sur les monocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et sur l'agrégation des plaquettes (*tableau I.2*) (Subbanagounder et al., 2000).

Parmi les lipides oxydés, on retrouve d'ailleurs les isoprostanes qui sont issus de l'autooxydation d'acides gras polyinsaturés.

Le chapitre suivant sera consacré à cette molécule et tentera de déterminer le rôle des isoprostanes dans les dysfonctionnements provoqués au niveau de la cellule endothéliale et ce, dans le cadre de l'athérosclérose.

1.3 Les Isoprostanes

Les isoprostanes forment une vaste famille de composés "prostaglandine-like" (aussi appelés isoéicosanoïdes), produits à partir de l'auto-oxydation d'acides gras poly-insaturés (PUFA) dont principalement l'acide arachidonique (AA), mais également l'acide eicosapentanoïque et l'acide docosahexanoïque (DHA) (Pratico, 1999).

Leur biosynthèse *in vitro* fut mise en évidence par Pryor et Porter, il y a plus de 25 ans (Pryor et al., 1976). Par la suite, en 1990, Morrow et al. ont démontré que ces composés étaient aussi produits *in vivo* chez l'homme, via un mécanisme radicalaire, indépendant de l'action enzymatique de la cyclooxygénase (COX), catalysant la peroxydation de l'acide arachidonique (AA) (Morrow et al., 1990). De plus, les radicaux libres agiraient non seulement sur les acides gras libres, mais également sur les acides gras estérifiés au sein des membranes cellulaires ou encore ceux contenus dans les LDL (Morrow and Roberts, 1996).

Parmi les divers isoprostanes, nous nous sommes intéressés plus particulièrement, au cours de ce mémoire, aux F₂-isoprostanes, isomères du PGF_{2α}, bien décrits dans la littérature pour leur rôle de marqueurs du stress oxydatif. Toutefois, de plus en plus d'études démontrent que ces molécules semblent être bioactives et pourraient donc être également des médiateurs dans des processus pro-inflammatoires tels que ceux rencontrés lors de l'athérogenèse (pour une revue, voir Cracowski et al., 2002).

1.3.1 Mécanismes de formation des isoprostanes

Avant de passer rapidement en revue, comment et où se forment les isoprostanes, nous rappellerons rapidement la biosynthèse par voie enzymatique des prostaglandines.

1.3.1.1 Formation des prostaglandines par voie enzymatique

L'acide arachidonique, acide gras contenu dans les phospholipides membranaires, est le substrat de deux types d'enzymes : les cyclooxygénases (COX) et les lipoxygénases qui mènent respectivement à la formation de prostaglandines et de leucotriènes.

Pour être métabolisé, l'acide arachidonique doit tout d'abord être libéré de la membrane par l'action d'une phospholipase A₂ (PLA₂). Une fois libre, il pourra être transformé en prostaglandine G₂ (PGG₂) via l'activité cyclooxygénase des COX. Cet intermédiaire sera alors converti en PGH₂, composé instable, et ce via l'activité peroxydase des COX. Différents prostanoides pourront alors être synthétisés à partir de la PGH₂ via des prostaglandines synthases (figure 1.20).

Les prostaglandines E₂ et D₂ agissent comme médiateurs pro-inflammatoires sur les globules blancs, tandis que la prostacycline (PGI₂) et le thromboxane A₂ (TXA₂) jouent des rôles dans la vasotonie et l'agrégation plaquettaire, comme déjà décrit au point I.1.

Il existe deux isoformes de COX : la cyclooxygénase-1 (COX1) qui est constitutive et la cyclooxygénase-2 (COX2) qui est inductible.

La COX1 va induire la production basale de PG telles que la PGE₂, la PGI₂ et le TXA₂, qui auront un rôle régulateur dans de nombreux processus non pathologiques tels que l'homéostasie vasculaire ou les fonctions gastro-intestinales. L'activation de la COX2, induite par des cytokines pro-inflammatoires, permet d'augmenter la production de prostaglandines, telle que la PGE₂, et est souvent impliquée dans les processus d'inflammation chroniques pathologiques.

1.3.1.2 Formation des isoprostanes

Les isoprostanes sont, quant à eux, dérivés de l'acide arachidonique, via un mécanisme non enzymatique, catalysé par les radicaux libres.

Les hydrogènes bis-allyliques de l'acide arachidonique sont soustraits par des radicaux libres, ce qui peut mener à la formation de trois radicaux arachidonyle différents (*figure I.21*). Par la suite, le radical formé réagit directement avec l'O₂, ce qui donne lieu à la formation de radicaux peroxy dérivés de l'acide arachidonique. Ceux-ci subissent une endocyclisation suivie d'une addition d'O₂ pour former des endoperoxydes bicycliques de type PGH₂, semblables à ceux observés lors de la biosynthèse enzymatique des PGs due à l'action des cyclooxygénases (COXs) (*figure I.21*).

La réduction de ces endoperoxydes mène à la formation de composés de type "prostaglandine – like". Selon le type de cycle produit, on distinguera les F₂-isoprostanes, les E₂, D₂-isoprostanes et les isothromboxanes (*figure I.22*).

Au sein des F₂-isoprostanes, suivant la localisation du radical peroxy dérivé de l'AA, 4 régioisomères peuvent être formés, de type III, IV, V et VI (*figure I.22*). Chacun de ceux-ci peut théoriquement comporter 8 diastéréoisomères racémiques. Cela signifie donc que ce processus pourrait générer 64 composés différents. Toutefois, *in vivo*, la formation de certains d'entre eux est favorisée par rapport à d'autres. Les composés formés sont isomériques par rapport au PGF_{2α}, dérivé de la cyclooxygénase. La *figure I.23* permet de visualiser la différence structurale entre les F₂-isoprostanes et les PG classiques (Janssen et al., 2000). Les deux chaînes latérales des F₂-isoprostanes sont orientées en *cis* l'une par rapport à l'autre tandis que les deux chaînes latérales des PG classiques sont orientées en *trans*.

Il est important de souligner qu'à l'inverse des PGs, ces F₂-isoprostanes peuvent être formés *in situ* au niveau des membranes phospholipidiques par l'action directe des radicaux libres sur les acides gras insaturés incorporés et peuvent s'accumuler dans des tissus cibles. Par la suite, ils sont libérés en réponse à une activation cellulaire et probablement via un mécanisme dépendant d'une phospholipase A₂. Ils circulent ensuite dans le sang pour finalement être excrétés dans les urines (Pratico, 1999).

La nomenclature de ces composés est complexe et il n'est donc pas aisé de s'y retrouver dans la littérature traitant des isoprostanes.

Une comparaison des nomenclatures existantes est présentée au *tableau I.3* (Cracowski et al., 2002).

Tout au long de ce travail, nous utiliserons la nomenclature proposée par Former. Toutefois, il est bon de savoir que le 8-iso-PGF_{2α}, isomère dont nous étudierons plus précisément les effets, est également appelé le iPF_{2α}-III, le IPF_{2α}-IV, le 8-epi-PGF_{2α} ou encore le 15-F_{2t}-IsoP (Rokach et al., 1997).

On commence également à connaître les voies de métabolisation des isoprostanes.

Chez le lapin, des études *in vivo* sur la métabolisation du 8-iso-PGF_{2α}, ont montré que celui-ci est rapidement métabolisé via une déshydratation du C-15, puis par une réduction au niveau de la double liaison au niveau des C-13,14 et pour terminer, par une β-oxydation de la chaîne α (*figure I.24*). Cela aboutit à la formation de divers composés retrouvés dans l'urine de lapin. Un de ces métabolites majoritairement produit et identifié est le α-tétrano-15-kéto-13,14-dihydro-8-iso-PGF_{2α}. Notons que des 8-iso-PGF_{2α} non métabolisés sont aussi retrouvés dans les urines (Basu, 1998).

Chez l'homme, deux métabolites β -oxydés du 8-iso-PGF_{2 α} ont été récemment identifiés dans le plasma et les urines. Il s'agit du 2,3-dinor-15-F_{2t}-IsoP et du 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP (*figure I.25*) (Cracowski et al., 2002)

I.3.2 Les Isoprostanes, comme marqueurs de la peroxydation lipidique *in vitro* et *in vivo*

La découverte des IsoPs s'est révélée d'un intérêt majeur car leur mesure peut fournir un indice quantitatif fiable de la peroxydation lipidique et du stress oxydant *in vitro* et *in vivo*.

En effet, il semble que les mesures des quantités d'IsoPs, dans de nombreux tissus et fluides biologiques différents, tels que le sang, les urines, la bile, le liquide cébrospinal,... fournissent une approche sûre et non-invasive pour estimer la peroxydation lipidique notamment *in vivo*. Cela semble être une avancée majeure dans notre habilité à estimer le statut du stress oxydatif chez les êtres humains (Roberts et al., 1997). Ceci est d'autant plus intéressant que les méthodes traditionnelles comme le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) ou des hydroxydes lipidiques, souffrent d'un manque de spécificité et/ou de sensibilité et restent donc incertaines et peu fiables (Pratico, 1999). Cet argument est, entre autres, soutenu par une étude menée par Brunetti et al. qui évoquent le problème du temps de demi-vie trop court des hydroperoxydes lipidiques dans les fluides biologiques ou dans des tissus humains. Les isoprostanes, eux, sont stables, car ce sont des produits finis circulant dans le sang et libérés dans les urines (Brunetti et al., 2002). Les isoprostanes mesurés pourraient donc constituer un indice fiable pour évaluer le niveau de stress oxydatif.

Différentes approches ont été employées pour mesurer les F₂-isoprostanes. Morrow et Roberts (1990) ont utilisé une technique couplant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse pour quantifier les F₂-isoprostanes libres et estérifiés. Cette méthode requiert l'usage d'un standard interne isoprostane pour être fiable.

À côté de la chromatographie en phase gazeuse, on peut aussi utiliser la chromatographie en phase liquide. Avec cette méthode, une autre équipe a identifié le 8,12-iso-iPF_{2 α} -VI et le 5-épi-8,12-iso-iPF_{2 α} -VI comme les F₂-isoprostanes les plus abondants dans l'urine chez l'homme.

Il existe également une technique d'immuno-chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

I.3.2.1 Marqueurs *in vitro*

Pour démontrer le rôle des isoprostanes en tant que marqueurs de la peroxydation lipidique *in vitro*, différents systèmes expérimentaux ont été développés (pour une revue, voir Morrow and Roberts, 1996) :

- on peut incuber des microsomes de foie de rat en présence de Fe/ADP/ascorbate, ce qui génère une peroxydation lipidique. Celle-ci est confirmée à la fois par le dosage de MDA (malonaldéhyde) et des isoprostanes, qui augmentent bien au cours du temps.
- Plusieurs auteurs ont travaillé sur des LDL purifiées soumises à différentes conditions oxydantes.

C'est notamment le cas dans l'étude de Gopaul et al. (1994) qui mesurent le taux croissant de formation d'IsoP au cours de l'oxydation des LDL induite par la présence de cellules

endothéliales en culture (*figure I.26*). Ces auteurs signalent également que cette cinétique de formation correspond à celle d'autres marqueurs plus classiques de la peroxydation lipidique tels que les TBARS ou les hydroperoxydes lipidiques (Gopaul et al., 1994).

Lorsque les LDL sont incubées *in vitro* avec du peroxydinitrite, molécule bioactive formée à partir du NO et de l'anion superoxyde, on observe à nouveau la formation de F₂-IsoPs (*figure I.27*) (Moore et al., 1995). Cette formation de F₂-IsoPs dépend de la concentration en peroxydinitrite et est totalement inhibée par la présence de la superoxyde dismutase, qui empêche la formation de peroxydinitrite.

I.3.2.2 Marqueurs *in vivo*

De nombreuses données de la littérature montrent que les isoprostanes sont également de bons marqueurs de la peroxydation lipidique *in vivo* (pour une revue, voir Morrow and Roberts, 1996).

Dans un modèle bien caractérisé de stress oxydants dans le foie, chez le rat, par administration de CCl₄, on a suivi et le MDA et les isoprostanes dans le foie. Le traitement des rats augmente le niveau des deux molécules, mais dans le cas des F₂-IsoPs, l'augmentation est de l'ordre de 80 fois, alors que pour le MDA, elle n'est que de 2,7 fois. Les F₂-IsoPs semblent donc être un marqueur bien plus sensible que le MDA (pour une revue, voir Morrow and Roberts, 1996).

La fumée de cigarette contient également de nombreux oxydants et on a émis l'hypothèse que la consommation de cigarettes pourrait induire un stress oxydatif. L'équipe de Morrow et Roberts (pour une revue, voir Morrow and Roberts, 1997) a montré que chez des gros fumeurs, les isoprostanes (libres ou estérifiés) étaient présents dans la circulation en concentration deux fois supérieures à celles enregistrées chez les non fumeurs.

En outre, les F₂-IsoPs libres ou estérifiés dans le plasma, ainsi que les métabolites dans les urines, diminuent significativement pour des personnes ayant arrêté de fumer (Patrono and Fitzgerald, 1997).

Ces données renforcent l'hypothèse d'un stress oxydatif associé au tabagisme.

Enfin, le dosage des IsoPs peut être intéressant pour évaluer un médicament ou une diète *in vivo* chez l'homme (Roberts et al., 1997).

En effet, McGrath et al. (2002) ont étudié les effets de l'administration de nitrates organiques sur le contenu des plaquettes en isoprostanes. Les nitrates organiques sont importants dans le traitement de syndromes accentués et chroniques d'ischémie ainsi que pour les lésions cardiaques. Leur efficacité clinique, à long terme, est empêchée par le développement d'une tolérance hémodynamique. En effet, l'administration continue de nitrates s'associe à la production d'anions superoxyde et d'oxyde nitrique menant à la formation de peroxydinitrite. Ce stress oxydatif peut être diminué en administrant des anti-oxydants. Dans leur étude, ils comparent les effets de l'administration de nitrates organiques avec et sans anti-oxydants. Pour mesurer le stress oxydatif induit, il mesure la quantité de 8-iso-PGF_{2α} produits. Au cours de leur étude, McGrath et al. constatent, après 3 jours d'administration continue de nitrates, une augmentation significative des isoprostanes. Ils observent par contre que l'administration orale d'ascorbate, un anti-oxydant, diminue les isoprostanes dans les plaquettes. Cela suggère qu'il existe bien un stress oxydatif au niveau des membranes plaquettaires résultant de la thérapie aux nitrates, mais que ce stress peut être contrecarré par des anti-oxydants (McGrath et al., 2002).

I.3.3 Les isoprostanes, comme biomarqueurs de pathologies chez l'homme

Les taux urinaires et plasmatiques de 8-iso-PGF_{2α} sont aussi couramment utilisés comme marqueurs de dommages oxydatifs et de peroxydation lipidique dans diverses maladies comme la maladie d'Alzheimer, le diabète sucré et le syndrome hépato-rénal (Janssen et al., 2000). Le *tableau I.4* (Cracowsky et al., 2002) reprend une série de situations pathologiques, pour lesquelles on a constaté une augmentation des isoprostanes. Signalons cependant que ces données sont parfois contradictoires, selon le fluide biologique utilisé pour le dosage et la méthode analytique utilisée.

Des études ont suggéré un rôle du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, car 2 isoformes d'isoprostanes (8-iso-PGF_{2α} et iPF₂-IV) sont présentes dans les tissus cérébraux de patients atteints de ces pathologies (Pratico et al., 2001).

Des études sur le taux d'isoprostanes dans des pathologies cardiaques ont également été réalisées. Mehrabi et al. (2001) ont démontré, par exemple, que le taux de 8-iso-PGF_{2α} augmente dans les artères coronaires de patients atteints de cardiomyopathie et ils ont étudié le rôle joué par l'accumulation d'isoprostanes dans les valves aortiques et pulmonaires de patients atteints de cette pathologie. Il semble que, le 8-iso-PGF_{2α} s'accumule plus dans les valves pulmonaires que dans les valves aortiques. Il est important de signaler qu'un test d'immunoréactivité pour le 8-iso-PGF_{2α} révèle une colocalisation de celui-ci avec des monocytes/macrophages (Mehrabi et al., 2001).

I.3.4 Les isoprostanes et l'athérosclérose

Depuis quelques années, plusieurs études ont rapporté une corrélation entre l'augmentation de la concentration des F₂-IsoPs et plusieurs facteurs de risque pouvant mener au développement de maladies cardiovasculaires telle que l'athérosclérose (Pratico, 1999). Il s'agit notamment de la cigarette, du diabète sucré et de l'hypercholestérolémie (Patrono and Fitzgerald, 1997), ces facteurs étant associés à une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique.

Nous avons déjà évoqué le lien entre isoprostanes et **tabagisme**, ce qui renforce l'hypothèse d'un stress oxydatif induit par la consommation des cigarettes.

Mais il existe également un lien entre **hypercholestérolémie** et quantité élevée en isoprostanes. En 1999, Wilson et al. ont démontré une augmentation des taux d'isoprostanes circulants chez des cochons atteints d'hypercholestérolémie (*tableau I.5*) (Wilson et al., 1999).

Les taux urinaires de 8-iso-PGF_{2α} sont également élevés chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (Reilly et al., 1996). Toutes ces données confirment donc bien le lien entre l'hypercholestérolémie et l'augmentation de la peroxydation lipidique, entraînant la formation d'isoprostanes décelables à la fois dans les LDL et dans les urines (pour une revue, voir Pratico, 1999). Rappelons que les isoprostanes sont produits lors de l'oxydation des LDL (voir point I.3.2.1).

L'hyperhomocystéinémie est également un autre facteur de risque pouvant mener au développement de maladies cardiovasculaires. En effet, plusieurs études ont démontré des taux plasmatiques élevés en homocystéine totale dans le plasma de nombreux patients ayant des maladies coronariennes, cérébrovasculaires ou touchant les artères périphériques.

L'hyperhomocystéinémie augmente également le risque de décès chez des patients souffrant de maladies cardio-vasculaires déclarées.

Voutilainen et al. (1999) ont mis en évidence une relation entre les concentrations plasmatiques en homocystéine totale chez l'homme et en isoprostanes. Cela suggère un mécanisme par lequel un taux plasmatique élevé en homocystéine pourrait augmenter le risque de maladies cardiovasculaires athéro-thrombotiques via un stress oxydatif.

Certaines études se sont intéressées aux **plaques athérosclérotiques** afin de vérifier la présence d'isoprostanes au niveau des lésions. Pratico et al. (1997), suite à des extractions lipidiques au niveau de la lésion, ont mis en évidence la présence de F₂-isoprostanes au niveau de la plaque athérosclérotique. En fait, deux isoprostanes distincts sont détectés : le 8-iso-PGF_{2α} et le IPF_{2α}-I. Leur présence coïncide avec la formation de F₂-isoprostanes dans les LDL oxydées *in vitro*. De plus, ces résultats ont été confirmés via une technique d'immunolocalisation (*figure I.28*).

Gniwotta et al. (1997) ont également constaté la présence d'isoprostanes dans des extraits lipidiques provenant de lésions athérosclérotiques humaines situées notamment dans les artères fémorales, tibiales antérieure et dans l'aorte. Lors de la comparaison des lésions avec des vaisseaux contrôles non athérosclérotiques, ils constatent que les isoprostanes sont présents en quantités plus élevées dans les lésions que dans les vaisseaux contrôles (Gniwotta et al., 1997).

En conclusion, les résultats obtenus dans l'ensemble de ces études semblent bien prouver un lien entre l'augmentation d'isoprostanes et les pathologies impliquant les stress oxydatifs. Plus récemment, de nombreuses études tentent de démontrer que plusieurs molécules issues de la peroxydation lipidique et notamment de l'oxydation des LDL, dont les isoprostanes ne seraient pas seulement les marqueurs d'un stress oxydatif, mais également des médiateurs, bioactifs, en induisant divers effets sur différents types cellulaires.

I.3.5 Les isoprostanes, des molécules bioactives

Les isoprostanes semblent exercer des activités biologiques au niveau des différents types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose. Les études à ce sujet sont récentes, mais déjà un certain nombre d'effets des isoprostanes sur différents types cellulaires comme les cellules musculaires lisses, les plaquettes, les monocytes ou les cellules endothéliales, commencent à se dégager.

A. Les cellules musculaires lisses

Le 8-iso-PGF_{2α} s'est révélé être un puissant vasoconstricteur des vaisseaux des reins et des poumons chez des rats et des lapins (Pratico, 1999).

Une étude plus récente a confirmé que les isoprostanes peuvent bien exercer des effets biologiques sur des cellules musculaires, tels qu'une vasoconstriction puissante, suivie d'une relaxation. Mais on peut observer des différences selon l'espèce, le tissu et les isomères d'isoprostanes testés. En effet, la *figure I.29* montre la réponse à trois isomères différents de cellules musculaires lisses humaines (CML). Le 8-iso-PGF_{2α} a un effet vasoconstricteur par rapport aux 2 autres isomères qui semblent diminuer, voire perdre totalement, leur effet constricteur comme le 8-iso-PGF_{3α} qui provoque, non pas une constriction, mais une relaxation des cellules. Et pourtant, ces isomères d'isoprostanes ne diffèrent guère du point de vue de leur structure (*figure I.30*) (Janssen, 2000).

Il est également capable d'induire la mitogenèse des cellules musculaires lisses (Roberts et al., 1997).

B. Les plaquettes

En 1996, Pratico et al., ont montré que le 8-iso-PGF_{2α} induit un changement de forme des plaquettes (*figure I.31*) (Pratico et al., 1996).

En 1998, Minuz et al. ont montré que des concentrations nanomolaires en 8-iso-PGF_{2α} activent les plaquettes en favorisant leur adhérence, en augmentant l'expression du récepteur au fibrinogène à la surface des plaquettes et en réduisant l'activité inhibitrice du NO. Toutefois, la présence d'un agoniste plaquettaire, tel que la thrombine ou l'ADP, est requise afin d'induire l'agrégation des plaquettes (Minuz et al., 1998).

Néanmoins, l'effet du 8-iso-PGF_{2α} sur les plaquettes reste assez contesté. Actuellement, le mécanisme par lequel le 8-iso-PGF_{2α} active les plaquettes est toujours inconnu.

Minuz et al. signalent que l'activation des plaquettes passerait par une voie différente de celle du TXA₂, bien que ses effets sont inhibés par des antagonistes au récepteur au TXA₂.

Mais, Cranshaw et al. rapportent que les isoprostanes inhibent l'agrégation plaquettaire induite par un agoniste au récepteur au TXA₂ (U46619) ou du collagène (*figure I.32*) et ce dans des conditions pro-inflammatoires. Cette capacité d'inhibition peut s'expliquer par un effet du 8-iso-PGF_{2α} en tant qu'agoniste partiel ou faux agoniste pour le récepteur au TXA₂ sur les plaquettes.

Tous les isoprostanes n'ont d'ailleurs pas la même capacité d'inhibition d'agrégation plaquettaire induite par le U46619 et si on le classe par potentiel d'inhibition, on obtient : 8-iso-PGE₁ > 8-iso-PGE₂ > 8-iso-PGF_{2α} > 8-iso-PGF_{3α} > 8-iso-13,14-dihydro-15-keto PGF_{2α} (Cranshaw et al., 2001).

C. Les monocytes et les neutrophiles

Patrono et Fitzgerald signalaient, en 1997, que la formation des isoprostanes, au niveau des monocytes, peut modifier leurs fonctions (Patrono and Fitzgerald, 1997).

Une étude plus récente a montré que le 8-iso-PGF_{2α} déclenche l'adhérence des neutrophiles au fibrinogène humain de façon dose dépendante (*figure I.33*). Par contre, le 8-iso-PGF_{2α} ne déclenche pas l'adhérence des neutrophiles à des ICAM-1 humains purifiés, même à des concentrations élevées. De plus, en testant le 8-iso-PGF_{2α} sur d'autres sous-types de leucocytes, on constate qu'il n'y a pas d'adhérence des monocytes et des lymphocytes au fibrinogène ou à ICAM-1. De même, le 8-iso-PGF_{2α} ne déclenche pas le chémotactisme au niveau des neutrophiles, des monocytes ou des lymphocytes et ne stimule pas directement la production de radicaux libres.

D'après Fontana et al. (2001), le 8-iso-PGF_{2α} stimule l'adhérence des neutrophiles humains au fibrinogène, en déclenchant l'expression d'intégrines-β₂ CD11b/CD18 et CD11c/CD18 qui sont des récepteurs au fibrinogène.

D. Les cellules endothéliales

Peu de choses sont connues à ce niveau. Néanmoins, certaines études préliminaires suggèrent un effet des isoprostanes au niveau des cellules endothéliales.

En 1997, Roberts et al. ont montré que le 8-iso-PGF_{2α} est capable d'induire la libération d'endothéline-1 (ET-1) à partir de cellules endothéliales bovines en culture (Roberts et al., 1997), ce qui favorise ensuite la contraction des CML.

En 2001, Leitinger et al. ont montré que la stimulation des cellules endothéliales par l'isoprostane 8-iso-PGF_{2α}, provoque l'adhérence des monocytes et ce indépendamment de l'expression des VCAM-1 et des sélectines endothéliales, qui sont des molécules d'adhérence généralement exprimées suite à l'activation du facteur de transcription NFκB (Leitinger et al., 2001). Il s'agit certes de résultats obtenus en culture. Mais ils suggèrent le rôle pro-athérogène que pourraient jouer les isoprostanes *in vivo*.

I.3.6 Voies de transduction du signal impliquées

Les voies de transduction du signal par lesquelles le 8-iso-PGF_{2α} exerce ses effets, ne sont pas encore très claires. Certains auteurs suggèrent une interaction du 8-iso-PGF_{2α} avec le récepteur au TXA₂ (R-TXA₂ ou récepteur TP) (Pratico, 1999).

En effet, un antagoniste du récepteur au TXA₂, le SQ29548, semble inhiber en partie ou totalement les effets du 8-iso-PGF_{2α} sur la vasoconstriction rénale. De plus, des études de *binding* avec le 8-iso-PGF_{2α} marqué, suggèrent l'existence de sites de liaison à basse et à haute affinités. De nombreux auteurs pensent que les sites à basse affinité pourraient être les récepteurs au TXA₂, tandis que ceux à haute affinité seraient des récepteurs spécifiques aux isoprostanes, encore non identifiés (pour une revue, voir Roberts et al., 1997).

Les voies de transduction du signal restent donc encore très controversées.

I.3.6.1 Le récepteur au thromboxane A₂ (R-TXA₂ ou récepteur TP)

Le thromboxane A₂ est un métabolite de l'acide arachidonique qui est produit par la voie de la cyclooxygénase (*figure I.34*). Il induit l'agrégation plaquettaire, la contraction des cellules musculaires lisses et peut provoquer la division ou l'apoptose d'autres cellules (Shen et Tai, 1998).

Les effets du thromboxane A₂ sont médiés par des récepteurs localisés en surface des cellules. La structure du récepteur au TXA₂ humain est représentée à la *figure I.35*. Il représente une protéine composée de 343 acides aminés et un récepteur de type-rhodopsine couplé à la protéine G avec sept domaines transmembranaires (Narumiya et al., 1999). Les récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus incluant le thymus, les plaquettes, le foie, les reins, la rate et le placenta (Thomas et al., 1998).

I.3.6.2 Effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste au thromboxane A₂ (U46619)

Leitinger et al. ont étudié les effets de l'isoprostane et de l'agoniste au récepteur TP (U46619), afin d'y voir plus clair dans les voies d'activation induites respectivement par ces deux molécules.

Dans cette étude, les cellules endothéliales sont stimulées *in vitro* par les deux molécules, ce qui induit l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (*figure I.36 A et B*). Si un

antagoniste au récepteur TP, le SQ 29548 est ajouté, on constate une diminution de l'effet des deux molécules (*figure I.36 C*). Le 8-iso-PGF_{2α} semble donc se lier au récepteur TP.

Toutefois, il existe des différences dans les effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste lors de l'activation de cellules endothéliales. Premièrement, contrairement à l'isoprostane, l'agoniste induit l'expression des E-sélectines et de VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales. Cela a pour effet de provoquer l'adhérence des neutrophiles. Ensuite, l'adhérence des monocytes induite par l'agoniste est partiellement dépendante de VCAM-1 alors que l'adhérence des monocytes induite par le 8-iso-PGF_{2α} est totalement indépendante de ce dernier. Ces différences peuvent s'expliquer par deux hypothèses (Leitinger et al., 2001):

- 1) l'isoprostane agirait via un récepteur unique qui pourrait être semblable au récepteur TP du point de vue de la liaison ligand-récepteur, mais différent par les voies de transduction du signal. Toutefois, il a été démontré, *in vivo*, que les isoprostanes interagissent avec des récepteurs TP vasculaires.
- 2) l'isoprostane se lierait à un variant du récepteur TP, obtenu par splicing alternatif. Par exemple dans les plaquettes, le récepteur TP existe sous 2 formes :
 - Le TP α est couplé aux protéines G α_q et G α_{11} .
 - Le TP β est couplé aux protéines G α_{11} et G α_s .

De ce fait, les 2 TP régulent l'adénylate cyclase en sens inverse. On ne peut donc exclure que l'agoniste et l'isoprostane activent différemment les différents récepteurs TP et aboutissent donc à une activation différentielle des protéines G couplées au récepteur et des enzymes qu'elles régulent.

En 1992, Morrow et al. ont montré que le 8-iso-PGF_{2α} était un agoniste du récepteur TP vasculaire chez le rat. Par contre, il semble agir comme un antagoniste sur les récepteurs TP plaquettaires chez le rat et chez l'homme. Ces observations démontrent qu'il peut exister différents sous-types de récepteurs TP selon le type cellulaire (Morrow et al., 1992).

Kwek et al. (2001) ont observé les effets constricteurs du 8-iso-PGF_{2α} sur des branches tertiaires et quaternaires de l'artère ombilicale ainsi que sur la résistance des vaisseaux isolés du placenta. Les résultats montrent que le 8-iso-PGF_{2α} est un constricteur des conduits placentaires isolés et des artères résistantes. Toutefois des différences importantes existent dans l'ensemble des réponses au 8-iso-PGF_{2α}. Ceci suggère des changements dans la population des récepteurs à l'intérieur même du réseau vasculaire placentaire. De plus, les effets vasoconstricteurs du 8-iso-PGF_{2α} dans des vaisseaux placentaires résistants, ne sont pas inhibés par l'antagoniste du récepteur au thromboxane A₂, le SQ 29548. Donc, l'existence d'un autre récepteur que le récepteur TP, qui serait reconnu par le 8-iso-PGF_{2α} semble bien possible (Kwek et al., 2001).

En résumé, l'isoprostane reconnaît les récepteurs TP, mais on exclut toujours pas l'existence d'un autre récepteur à haute affinité. La *figure I.37* récapitule les données expérimentales obtenues sur cellules endothéliales (Leitinger et al., 2001).

I.4 Objectifs du mémoire

En URBC, dans le cadre d'un projet PAI (Pôle d'Attraction Interuniversitaire) en collaboration avec l'équipe des Pr. P Holvoet de la KUL, Pr. Cl. Remacle et JL. Balligand de l'UCL et Pr. H. Bult de l'UIA, nous nous intéressons de près aux mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes précoces de l'athérosclérose, en nous focalisant sur deux types cellulaires, les monocytes et les cellules endothéliales.

Pour rappel, le dysfonctionnement endothélial semble être une étape clé dans les phénomènes pro-athérogènes. Au laboratoire, nous essayons de comprendre ces dysfonctionnements en utilisant un modèle de cellules endothéliales humaines, dérivées de cordon ombilical : les HUV-EC-C, disponibles à l'ATCC. Pour provoquer ce dysfonctionnement de la cellule endothéliale, nous avons choisi l'isoprostane-8. Cette molécule fût d'abord considérée comme un marqueur de peroxydation lipidique et de stress oxydatifs *in vivo*. Mais elle semble également exercer des effets biologiques, comme la vasoconstriction, l'agrégation des plaquettes,... ce qui en fait un agent potentiellement pro-athérogène.

Les effets de l'isoprostane-8 sur les cellules endothéliales sont encore peu connus, bien que les études préliminaires sont en faveur d'effets pro-athérogènes : en effet, Leitinger et al. (2001) ont montré sur un modèle de cellules endothéliales en culture, que l'isoprostane-8 favorisait l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales incubées avec cette molécule, et ce de manière VCAM-1-indépendante. Les MAPK et la PKA semblent impliquées dans la réponse à l'isoprostane-8. Dans notre laboratoire, Aurélie Tacheny a confirmé ces résultats, mais elle a aussi montré que l'isoprostane-8 activait le facteur de transcription AP-1 et induisait l'expression du MCP-1, une chémokine recrutant les monocytes.

Mais la question du ou des récepteurs reconnus par l'isoprostane-8 reste toujours ouverte. D'une part, l'antagoniste SQ29548 du récepteur TP inhibe une grande partie des effets de l'isoprostane-8. Mais d'autre part, Leitinger et al. (2001) ont démontré des différences entre les effets du 8-iso-PGF_{2α} et d'un agoniste du récepteur au TXA₂, le U46619.

Ce mémoire a donc comme objectifs à la fois de continuer l'étude des effets de l'isoprostane-8 sur les cellules endothéliales humaines en culture, mais aussi de comparer les effets de l'isoprostane-8 avec ceux obtenus avec l'agoniste U46619 du récepteur TP.

Dans un premier temps, nous avons donc comparé les effets des deux molécules sur l'activation du facteur transcriptionnel AP-1.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé un damier à ADN pour mettre en évidence des différences de patterns d'expression entre des HUV-EC-C stimulées ou non avec le 8-iso-PGF_{2α} ou l'agoniste. Pour cela, nous avons utilisé un damier à ADN reprenant des sondes de captures représentant 202 gènes humains impliqués dans divers processus biologiques (de la prolifération à l'apoptose en passant par des processus inflammatoires et d'adhérence intercellulaire).

Il s'agit de damiers en cours de validation chez EAT. C'est pour cette raison que les cellules HUV-EC-C ont également été stimulées avec le TNFα, car les effets du TNFα sur les profils d'expression génique des cellules endothéliales sont bien décrits dans la littérature. Enfin, le dernier volet de ce mémoire avait pour but de confirmer les résultats obtenus sur damier par la technique de PCR en temps réel.

La technique de PCR en temps réel a également été utilisée pour suivre l'expression du MCP-1, puisque le damier utilisé ne permettait pas de la faire.

Nous espérons, au terme de ce mémoire, apporter plus de lumière sur les voies de transduction du signal empruntées par le 8-iso-PGF_{2α} et l'agoniste, en mettant le doigt sur les différences observées entre ces deux molécules.

II.1 La culture cellulaire des cellules endothéliales HUV-EC-C

Au cours de ce mémoire, nous avons utilisé une lignée de cellules endothéliales humaines, dérivées de veines de cordons ombilicaux : les HUV-EC-C disponibles à l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Celles-ci se distinguent de la souche parentale HUV-EC par un potentiel prolifératif prolongé (entre 50 et 60 doublements de population) en présence de divers facteurs de croissance et par un mode de culture plus aisé.

II.1.1 Matériels

- Cellules endothéliales HUV-EC-C (ATCC, No. CRL-1730)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm² (T25) ou de 75 cm² (T75) (Costar, USA)
- Milieu de rinçage préchauffé à 37 °C : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Milieux de culture (*voir tableau II.1*)
- Sérum de veau foetal (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Solution stérile de trypsine-EDTA : trypsine à 0,05 % ; EDTA 0,53 mM (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Gélatine 0,2 % diluée dans du PBS (Merck, Allemagne)
- Centrifugeuse de table (Universal Hettich, Allemagne)
- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Royaume-Uni)
- Chambre de Neubauer (Vel, Belgique)
- Solution de Bleu de trypan à 4 %, préparée dans 0,81 % de NaCl et 0,06 % de phosphate de potassium (Sigma, USA)
- Ampoules de congélation (Nunc, Danemark)
- DMSO (Acros Chimica, Belgique)
- Ethanol absolu (Merck, Allemagne)

II.1.2. Méthodes

a) Repiquage des cellules HUV-EC-C

Les cellules endothéliales sont cultivées dans des boîtes de culture stériles de 75 cm² (T75) préalablement incubées avec de la gélatine 0,2 %. Ces boîtes de culture sont maintenues dans une étuve à 37 °C + 5 % de CO₂ afin de maintenir un pH adéquat. Les HUV-EC-C sont cultivées dans un milieu F12K complet. Une fois arrivées à confluence, c'est-à-dire lorsqu'elles forment un tapis cellulaire uniforme sur l'ensemble de la boîte de culture, celles-ci sont repiquées. La confluence des HUV-EC-C en T75 équivaut à environ 3.10⁶ cellules.

Pour ce faire, le milieu de culture de la T75 est d'abord décanté. Ensuite, les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS préchauffé afin d'éliminer toute trace de sérum. Les cellules sont alors détachées suite à une incubation de 1 minute à 37 °C avec 1 ml de trypsine-EDTA. Lorsque l'ensemble des cellules se trouve en suspension, 9 ml de F12K + 10 % de sérum sont additionnés afin d'inhiber l'action de la trypsine. A cette étape, quelques µl de suspension cellulaire sont prélevés dans le but de réaliser un comptage cellulaire. Le reste de la suspension cellulaire est, quant à lui, centrifugé pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le tube de 10 ml est ensuite décanté et le culot resuspendu dans 10 ml de milieu F12K complet. Selon le nombre de cellules désiré, un certain volume de la suspension cellulaire est déposé dans une nouvelle T75. Le tout est complété à l'aide de milieu F12K complet afin d'atteindre un volume de 15 ml.

b) Comptage des cellules

Le comptage est effectué dans une chambre de Neubauer. Les quelques μl de suspension cellulaire prélevés sont dilués deux fois dans une solution de bleu de trypan qui va permettre de distinguer les cellules mortes (colorées en bleu) des cellules vivantes (non colorées). Ensuite, 10 μl de la dilution sont déposés de part et d'autre de la chambre de Neubauer. Le nombre de cellules vivantes contenues dans les huit compartiments quadrillés de la chambre est alors évalué. La quantité de cellules par ml, est déterminée en tenant compte du volume de la chambre et de la dilution des cellules.

c) Congélation des HUV-EC-C

Une fois la confluence cellulaire atteinte, les cellules sont rincées, trypsinisées et recueillies dans 9 ml de F12K + 10 % de sérum. Comme lors du repiquage, les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le culot est resuspendu dans 1 ml de milieu F12K, contenant 20 % de sérum et 10 % de DMSO, un cryoprotecteur pour les cellules. L'équivalent de chaque T75 est alors transvasé dans un cryotube, placé dans un système de refroidissement pour une nuit à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Par la suite, le cryotube est placé à -196°C dans l'azote liquide. Cette technique permet d'une part, une congélation progressive et d'autre part, d'éviter la formation de cristaux au sein des cellules.

d) Décongélation des HUV-EC-C

Dès son retrait de l'azote liquide, l'ampoule doit être immédiatement plongée dans un bain d'eau à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La décongélation ne doit pas durer plus d'une minute. Les cellules sont ensuite déposées dans une T75 contenant 15 ml de F12K + 10 % de sérum. Le lendemain, on veillera à changer le milieu afin d'éliminer le DMSO pouvant être toxique pour les cellules.

II.2 Protocole d'activation des cellules HUV-EC-C

Au cours des différentes expériences réalisées lors de ce mémoire, le protocole d'activation des cellules endothéliales HUV-EC-C est identique. Une fois la confluence atteinte, le milieu de culture est décanté et les cellules sont préalablement rincées une fois avec du milieu F12K Stock. Cette étape a pour but d'éliminer au maximum les facteurs de croissance pouvant influencer l'état d'activation des cellules endothéliales. Par la suite, les cellules sont, si nécessaire, préincubées avec des inhibiteurs et enfin mises en présence de la molécule dont les effets sont étudiés. Les temps d'incubation varient selon le type d'expérience.

Le *tableau II.2* rassemble les informations utiles concernant les diverses molécules testées tout au long de ce travail.

II.3 Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par dosage colorimétrique

II.3.1. Principe

Le dosage colorimétrique permet de détecter la liaison d'un facteur de transcription (FT) à sa séquence consensus. En effet, des sondes de capture biotinylées, spécifiques du FT étudié, sont fixées au fond de plaques multi-puits pré-conditionnées à la streptavidine. Le facteur, s'il est activé, va donc pouvoir venir s'y lier. La détection de cette liaison sera alors rendue possible via un système d'anticorps (Ac) primaires spécifiques au FT et d'Ac secondaires couplés à la peroxydase.

II.3.2. Matériels

a) Fixation des sondes de capture

- Plaques 96 puits pré-conditionnées avec de la streptavidine (Roche, Allemagne)
- Sondes de capture double brin biotinylées contenant la séquence oligo-nucléotidique consensus pour AP-1 (Eurogentec, Belgique)
- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Eau distillée
- Tween 20 à 0,1 % (Sigma Aldrich, Allemagne)

b) Extraction nucléaire et dosage protéique

- Solution de rinçage 1 : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Solution de rinçage 2 : PBS : + Na₂MoO₄ (1 mM) + NaF (5 mM)
- HB 1X (*voir tableau II.3*)
- PIB (*voir tableau II.4*)
- Tampon de lyse (*voir tableau II.5*)
- RE stock (*Voir tableau II.6*)
- RE complet:
 - 500 µl de RE stock (*voir tableau II.6*)
 - 20 µl de PIC (Protease inhibitor cocktail) (Roche, Allemagne)
 - 20 µl de PIB (*voir tableau II.4*)
- SA stock : pour 20 ml (*voir tableau II.7*)
- SA complet :
 - 500 µl de SA stock (*voir tableau II.7*)
 - 20 µl de PIC (Protease inhibitor cocktail) (Roche, Allemagne)
 - 20 µl de PIB (*voir tableau II.4*)
- Extraits protéiques de cellules stimulées ou non
- Réactifs de protéines : bleu de Coomassie dilué 5 fois dans de l'eau distillée (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories)
- Etalon : BSA 5 µg dans 2,5 µl d'eau distillée (Sigma, USA)
- Centrifugeuse Labofuge 400R (Heraeus, Allemagne)
- Spectrophotomètre

c) Dosage colorimétrique proprement dit :

- Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- PMA (0,1 µg/ml) (Sigma, USA) + ionomycine (1 µM) (I.0634/ Sigma, USA)
- Tampon de lyse complet (*voir tableau II.8*)
- Tampon de liaison complet (*voir tableau II.9*)
- Tampon de liaison 3 X (*voir tableau II.10*)
- PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- BSA (A-3059/ Sigma, USA)
- Anticorps primaire polyclonal (IgG) de lapin anti-cFos (Santa Cruz, USA)
- Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (horse-radish peroxydase) (Roche, Allemagne)
- TMB (Tétra-Méthyl Benzidine) (Bio Source, Belgique)
- Solution Stop (Bio Source, Belgique)
- Lecteur multi-plaque (Ultramark, Bio-Rad, USA)

II.3.3. Méthodes

a) Fixation des sondes de capture :

Les sondes de capture biotinylées sont déposées dans les puits pré-conditionnés à la streptavidine, à une concentration finale de 4 picomoles pour 50 µl de PBS par puits. Après une heure d'incubation à 37 °C , les puits sont lavés deux fois avec 100 µl de PBS bis + Tween 20 à 0,1 %, puis une fois avec 200 µl d'eau distillée. Ces lavages éliminent ainsi l'excès de sondes non fixées. Enfin, les puits sont séchés à 37 °C pendant environ une heure et les plaques sont stockées en chambre froide à 4 °C.

b) Stimulation des cellules et extraction protéique :

Le repiquage des cellules HUV-EC-C est effectué la veille en boîte de culture T25 afin d'obtenir une densité moyenne de 1.10^6 cellules. Les contrôles négatifs correspondent à des cellules incubées en présence du milieu de dilution de la substance testée. Les contrôles positifs correspondent à une stimulation avec une solution de PMA (0,1 µg/ml) et d'ionomycine (1 µM) (*voir tableau II.2*).

Préalablement rincées avec du milieu F12K Stock, les cellules sont ensuite incubées pendant un temps déterminé avec notre molécule d'intérêt (*voir tableau II.2*). Après stimulation, les cellules sont rincées avec 3 ml de PBS froid, puis avec 3 ml de solution de rinçage 2, contenant des inhibiteurs de phosphatases. Les cellules sont alors incubées durant 10 minutes sur glace en présence de 3 ml de HB 1X froid. Cette solution hypotonique permet aux cellules de gonfler. L'incubation terminée, le HB est décanté et on ajoute 200 µl de tampon de lyse. Les cellules seront raclées dans celui-ci et centrifugées 30 secondes à 13.000 rpm. L'ajout de 30 µl de RE complet et un volume identique de SA complet permet de resuspendre le culot. Cette solution hypertonique permet l'extraction des protéines nucléaires. Pour cela, les cellules seront incubées sur roue à 4 °C durant au moins 30 minutes. Ensuite, une centrifugation de 10 minutes à 13.000 rpm à 4 °C est réalisée afin d'éliminer les débris membranaires. Le surnageant est alors dosé par Bradford et conservé à -70 °C.

c) Dosage colorimétrique proprement dit :

Les extraits nucléaires sont dilués dans du tampon de lyse de façon à obtenir de 5 à 10 µg de protéines par puits et pour un volume final de 20 µl. Ces 20 µl sont déposés dans chaque puits en plus de 30 µl de tampon de liaison complet, fraîchement préparé. L'incubation dure une heure sous légère agitation. Trois lavages de deux minutes au PBS bis + Tween 20 à 0,1 % permettent d'éliminer les protéines non liées à la séquence AP-1 (*voir figure II.1*).

Ensuite, 100 µl d'anticorps primaire anti-cFos dilué 1000 fois dans du PBS bis + BSA 1 % sont déposés dans chaque puits pour une heure d'incubation à température ambiante. Suite à cela, les puits sont rincés trois fois avec du PBS bis + Tween 20 à 0,1 %. Après les rinçages, 100 µl de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase dilué 1000 fois sont déposés dans les puits pour une heure d'incubation, puis rincés quatre fois au PBS bis + Tween 20 (0,1 %).

Pour assurer la réaction colorimétrique, 100 µl de TMB sont déposés dans chaque puits à l'abri de la lumière. Après une incubation de 10 minutes, la réaction est immédiatement arrêtée grâce à l'ajout de 100 µl de solution stop. La lecture se fait à l'aide d'un lecteur de multi-plaques à 450 nm.

II.4 Extraction d'ARN messenger

II.4.1. Principe

Avant toute chose, il est bon d'attirer l'attention sur le fait que toute manipulation d'ARNm est délicate et doit être effectuée dans des conditions "RNases-free" et ce afin d'éviter toute dégradation de celui-ci par des RNases endogènes ou exogènes (air, peau, salive, vêtements...)

Pour cette extraction, nous utilisons le Kit Micro-Fast Track™ (Invitrogen Corporation, USA) dont l'avantage principal est d'obtenir directement les ARNm des cellules stimulées ou non, sans devoir passer par une étape intermédiaire d'ARN total.

Afin d'isoler les ARNm des autres constituants cellulaires, des billes de cellulose oligo dT sont utilisées. L'ARNm s'y fixera par l'intermédiaire de sa queue poly (A). Après isolation des billes de cellulose, l'ARNm sera élué à l'aide d'un tampon pauvre en sels, précipité et enfin dosé et resuspendu à la concentration voulue avant d'être rétrotranscrit en ADNc durant la transcription inverse (*voir point II.5*).

II.4.2. Matériels

- Milieu de rinçage froid (4 °C) : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Solution stérile de trypsine-EDTA : trypsine à 0,05 % ; EDTA 0,53 mM (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu F12K stock + 10 % de sérum (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Centrifugeuse Biofuge 17 RS (Heraeus Sepatech, Allemagne)
- Micro-FastTrack™ 2.0 Kit (Invitrogen Corporation, USA) (*voir tableau II.11*)
- Ethanol absolu (Merck, Allemagne)
- Eau RNase free (Promega, USA)
- Seringues stériles avec aiguille 21G – 0,8 x 40 mm (TERUMO, Belgique)
- Spectrophotomètre Gene Quant II (Pharmacia, Allemagne)
- Centrifugeuse Biofuge (Heraeus instruments, Allemagne)

II.4.3. Méthodes

a) Préparation des cellules

Les cellules sont stimulées ou non pendant un temps déterminé.

Une fois la stimulation terminée, le milieu de stimulation de la T75 est décanté, et les cellules rincées avec 10 ml de PBS chaud. Les cellules sont ensuite détachées avec 1 ml de trypsine-EDTA. Une fois le détachement des cellules complet, 9 ml de F12K+10 % de sérum sont additionnés. La suspension cellulaire est alors centrifugée 10 minutes à 1000 rpm et à 4 °C. A cette étape, quelques µl de suspension cellulaire sont prélevés dans le but de réaliser un comptage cellulaire (voir point II.1.2.b)

Après centrifugation, le culot est lavé avec 5 ml de PBS froid (4 °C) et puis à nouveau centrifugé 10 minutes à 1000 rpm et à 4 °C. Le culot est alors resuspendu dans 1 ml de PBS froid. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un eppendorf à raison de 5 millions de cellules maximum par eppendorf.

b) Isolation de l'ARN messenger et lavage de la cellulose

La suspension cellulaire présente dans les eppendorfs est centrifugée pendant 5 minutes à 2000 rpm à 4 °C, puis resuspendue dans 1 ml de tampon de lyse contenant 1 ml de tampon Stock et 20 µl de protein/RNase Degrader. La solution est homogénéisée 4 fois à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 21 G jusqu'à la disparition de la viscosité, puis incubée 20 minutes à 45 °C. Suite à cela, 63 µl de NaCl 5 M sont ajoutés afin de précipiter les protéines et de dégrader l'ADN. Le tout est à nouveau homogénéisé à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 21 G pour permettre de cisailer l'ADN. La solution est transférée dans un microtube contenant des billes de cellulose. Afin d'assurer un bon ancrage de l'ARNm aux billes de cellulose, les tubes sont agités doucement pendant 20 minutes à température ambiante, puis centrifugés à 7000 rpm pendant 5 minutes.

Les billes de cellulose sont alors lavées 3 fois avec 1,3 ml de tampon de lavage et centrifugées 5 minutes à 7000 rpm entre chaque lavage. La cellulose est ensuite resuspendue dans 300 µl de tampon de lavage et transvasée sur une colonne Quick Spin.

Une centrifugation à 7000 rpm est réalisée pendant 10 secondes à température ambiante et le liquide contenu dans le tube collecteur est éliminé. La cellulose restée sur la colonne, est resuspendue dans 500 µl de tampon de lavage et centrifugée 10 secondes à 7000 rpm à température ambiante. Une mesure de la D.O. à 260 nm est effectuée à partir du liquide contenu dans le tube collecteur. L'étape précédente sera répétée jusqu'à obtenir un résultat inférieur à 0,05. L'étape suivante consiste à laver 2 fois la cellulose dans 200 µl de tampon pauvre en sels et à la centrifuger 10 sec à 7000 rpm entre chaque lavage.

c) Elution et précipitation de l'ARN messenger

La colonne est placée dans un nouveau tube, la cellulose est resuspendue dans 100 µl de tampon d'élution et centrifugée 10 secondes à 7000 rpm. Cette opération est effectuée une seconde fois ce qui permet d'éluer l'ensemble de l'ARNm dans le tube collecteur. 10 µl de glycogène carrier, 30 µl de Sodium Acétate et 600 µl d'éthanol absolu sont ensuite ajoutés au contenu. Cela permet de précipiter l'ARNm.

L'ensemble de la solution est conservé au moins 30 minutes à $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suite à cela, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 17.000 rpm à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le surnageant est alors éliminé afin de laisser sécher le culot d'ARNm à température ambiante. Une fois le culot devenu transparent, il est resuspendu dans $10\text{ }\mu\text{l}$ d'eau RNase free et déposé sur glace ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). La quantification est réalisée en prélevant $2\text{ }\mu\text{l}$ de la solution et en y ajoutant $68\text{ }\mu\text{l}$ d'eau RNase free. Elle permettra d'obtenir la D.O. à 260 et 280 nm à partir desquelles seront calculés le ratio et la concentration des échantillons.

II.5 Transcription inverse (RT)

II.5.1. Principe

Cette technique permet la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARNm. Elle fait appel à des amorces poly-T venant s'hybrider sur la queue poly-A des ARNm. La synthèse du brin d'ADN complémentaire est réalisée par l'élongation de l'amorce poly-T à partir de son extrémité 3' par une Superscript Reverse Transcriptase. Lors de la transcription inverse, il y a incorporation de dCTP biotinylés afin que les ADNc produits puissent être détectables après leur hybridation à leurs sondes de capture anti-complémentaire fixées sur le micro-damier.

II.5.2. Matériels

- ARN messagers extraits d'HUV-EC-C (ATCC, No. CRL - 1730)
- Amorce poly-T : oligo (dT)₍₁₂₋₁₈₎ 500 ng/ μl (Gibco BRL, USA)
- Superscript TMII RNase H 200 U/ μl (Gibco BRL, USA)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/ μl (Promega, USA)
- Ribonucléase H 2 U/ μl (Gibco BRL, USA)
- Eau RNase free (Promega, USA)
- Buffer RT 5 X (Invitrogen, Angleterre)
- DTT 0,1 μM (Gibco BRL, USA)
- Mix d'ARNm : * 3 μl de mélange de trois standards internes ayant chacun une concentration définie différente (EAT, Belgique) :
 - * 2 μl d'oligo dT (500 ng)
 - * 4,5 μl d'ARNm et d'eau RNase free (selon la concentration d'ARNm désirée)
- Mix de réaction : pour un échantillon :
 - 4 μl de tampon RT 5X
 - 2 μl de DTT 0,1 M
 - 1 μl de RNasin (40 U/ μl)
 - 2 μl de dNTP mix : - 2 μl de dATP (100 mM) (Roche, Allemagne)
- 2 μl de dTTP (100 mM) (Roche, Allemagne)
- 2 μl de dGTP (100 mM) (Roche, Allemagne)
- 3,2 μl de dCTP (10mM) (Roche, Allemagne)
(Stock (100 mM) à diluer 10 X)
- 32 μl de dCTP biotinylés (1 mM) (Roche, Allemagne)

II.5.3. Méthodes

Une fois le mix d'ARNm réalisé, celui-ci est incubé 10 minutes à $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ce qui a pour but de déplier l'ARNm et de faciliter la liaison spécifique de l'amorce poly T. Ensuite, la solution est directement incubée sur glace pendant 5 minutes afin d'empêcher son repliement.

Suite à cela, les échantillons sont mis en présence de 9 µl de mix de réaction et laissés 5 minutes à température ambiante. Ensuite, 1,5 µl de retro-transcriptase sont ajoutés et la transcription inverse proprement dite se déroule durant 1h30 à 42 °C. Cette étape est répétée une seconde fois. En fin de transcription, les échantillons sont placés 15 minutes à 70 °C afin d'inactiver l'enzyme. Ensuite, dans le but d'éliminer les matrices d'ARN, on procède à une incubation de 20 minutes à 37 °C en présence de 1 µl de RNase H. Enfin, les échantillons sont placés 3 minutes à 95 °C afin de dénaturer l'ADNc qui peut alors être conservé à – 20 °C.

II.6 Hybridation d'ADN cibles biotinylés

II.6.1. Principe

Les ADN cibles biotinylés issus de la transcription inverse s'hybrident spécifiquement à leur sonde de capture anti-complémentaire et ce grâce à la capacité que possède l'ADN dénaturé de se réassocier à sa séquence complémentaire quand les conditions (température, force ionique,...) sont adéquates.

II.6.2. Matériels

- Lame de verre portant les sondes de capture préalablement fixées (EAT, Belgique)
- Produits de RT
- ADN cible pour contrôle positif
- Chambres d'hybridation (Biozym, Hollande)
- NaCl (Merck, Allemagne)
- Couver-objet (M.J Research, USA)
- Four d'hybridation Hybridiser HB-D (Techne Duxford, Royaume-Uni)
- Thermomixer confort (Eppendorf, Allemagne)
- mix d'hybridation :
 - * 6,5 µl d'HybriBuffer A (EAT, Belgique)
 - * 26 µl d'HybriBuffer B (EAT, Belgique)
 - * 20 µl de produit de RT
 - * 2 µl de contrôle positif
 - * 10 µl d'eau RNase free
- Unibuffer dilué 4X (EAT, Belgique)
- Unibuffer (EAT, Belgique)

II.6.3. Méthodes

Les chambres d'hybridation sont délicatement placées sur la lame de verre en veillant à bien centrer le damier. Une fois les produits de RT ajoutés au mix d'hybridation, 65 µl de ce mélange sont déposés dans la chambre. Celles-ci sont recouvertes délicatement d'un couver-objet en plastique. Cette lame est alors déposée dans un thermomixer en présence de 400 µl d'eau RNase free afin d'assurer un taux d'humidité suffisant durant l'hybridation qui se déroule toute la nuit dans un four préchauffé à 60 °C à 14000 rpm.

II.7 Révélation

II.7.1. Principe

Pour rappel, au cours de la transcription inverse, les ADN cibles sont marqués par l'incorporation de dCTPs biotinylés. La révélation de son hybridation sur la sonde est donc effectuée à l'aide d'un conjugué anticorps anti-biotine couplé à de la Cyanine3. Celui-ci se lie à la biotine et sa présence sur le damier est mise en évidence par un scanner confocal. En effet, le fluorochrome est excité par le laser et la lumière émise est mesurée par un photodétecteur relié à un ordinateur. Une image digitalisée des spots est obtenue, dont l'intensité est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Après la révélation, les spots sont quantifiés à l'aide d'outils informatiques.

II.7.2. Matériels

- Unibuffer (EAT, Belgique)
- Unibuffer dilué 4X (EAT, Belgique)
- Solution de blocking (EAT, Belgique)
- Conjugué anticorps anti-biot-cy3 (Sigma, USA) dilué 1000 fois dans Unibuffer dilué 4X
- GMS 418 Array Scanner (Genetic MicroSystems, USA)
- Programme d'analyse GMS 418 (Genetic MicroSystems, USA)
- Film plastique

II.7.3. Méthodes

Après avoir délicatement enlevé les chambres d'hybridation, la lame va subir 4 lavages de 2 minutes chacun avec du tampon de lavage avant d'être incubée durant 45 minutes à l'obscurité en présence de 800 µl de la solution anti-biotine-cyanine 3 diluée dans du tampon de blocking. Ensuite, après 5 lavages avec du tampon de lavage et deux lavages à l'eau distillée, la lame est séchée par centrifugation à 600 rpm durant 5 minutes à 20 °C puis scannée.

II.8 Quantification

II.8.1. Principe

Après avoir scanné les lames, les images obtenues sont enregistrées en format 16 bit. La quantification est réalisée à l'aide du programme "Imagene 4.1" (Biodiscovery, USA) qui permet de déterminer la moyenne des intensités de chaque pixel à l'intérieur d'un spot. Les valeurs obtenues vont permettre de déterminer la variation d'expression de gènes lors d'une situation « test » par rapport à une situation « contrôle ».

II.8.2. Méthodes

Grâce au programme "Imagene 4.1" (Biodiscovery, USA), l'intensité de la fluorescence émise par chaque spot va pouvoir être déterminée. Pixel par pixel, le spot sera décomposé et défini selon une échelle de différentes intensités de gris. Pour chaque damier, une grille spécifique est conçue, correspondant à la taille de chacun des spots.

Une fois l'intensité des spots mesurée, les données sont traitées par Excell. Ce programme tient compte du bruit de fond entourant les spots et permet de normaliser nos valeurs par rapport à la fois aux standards internes et à l'intensité des spots correspondant aux gènes de référence (house keeping genes) et désigne pour chaque valeur un « cut off » c'est à dire une valeur correspondant à 2,5X la valeur du bruit de fond local à partir de laquelle notre changement d'expression pourra être considéré comme significatif .

II.9 PCR en temps réel

II.9.1 Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel permet de mesurer par fluorescence l'accumulation des produits d'amplification obtenus après chaque cycle PCR. En effet, elle permet d'associer de façon proportionnelle la quantité d'amplicons produite et l'intensité de la fluorescence mesurée, durant chaque cycle, dans chaque tube PCR.

La fluorescence détectée provient d'un fluorochrome, le SyBR Green, qui s'intercale entre les doubles brins d'ADN en émettant un signal fluorescent à 520 nm. L'identité des produits obtenus est vérifiée en établissant une courbe de dissociation. Celle-ci est obtenue en augmentant progressivement la température de 60 à 95 °C afin de dissocier les ADN bicaténares. Une fois la température de melting (T_m) atteinte, le SyBR Green est libéré en solution ce qui entraîne une chute de la fluorescence.

La quantification repose sur le concept du cycle seuil, le Ct (cycle treshold) (*figure II.2*). Le Ct est le cycle PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond. Il est possible d'obtenir la quantité d'ADN de départ dans l'échantillon, vu que le Ct se trouve dans la phase exponentielle de la réaction et donc sans influence de la limitation de matériel. Il existe une corrélation inversement proportionnelle entre ces deux données. En effet, le Ct diminue quand la quantité d'ADNc augmente.

Les différences obtenues, lors de la comparaison des Ct, sont normalisées par rapport à l'expression d'un gène de référence, dans notre cas, la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Le gène de référence, s'il est correctement choisi, a un taux de transcrits qui reste stable dans les conditions étudiées.

II.9.2. Extraction d'ARNm

Tout d'abord, une extraction d'ARNm est réalisée à l'aide du Kit Micro-FastTrack™ 2.0 (Invitrogen Corporation, USA) suivant la méthode déjà explicitée au point II.3.

II.9.3. Transcription inverse (RT)

Pour rappel, cette technique permet la synthèse d'ADN complémentaire à partir de l'ARNm extrait.

a) Matériels

- RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/μl (Promega, USA)
- Ribonucléase H 2 U/μl (Gibco BRL, USA)
- Eau RNase free (Promega, USA)
- Amorces poly-T : oligo (dT)₍₁₂₋₁₈₎ 500 ng/μl (Gibco BRL, USA)

- dNTP set (Eurogentec, Belgique)
- Superscript TMII RNase H 200 U/μl (Gibco BRL, USA)
- ARN messagers extraits d'HUV-EC-C (ATCC, No. CRL - 1730)
- DNase (Roche, Allemagne)

b) Méthode

La transcription inverse pour une PCR en temps réel diffère quelque peu par rapport à celle réalisée pour une hybridation (voir point II.5).

La première différence est la composition du mix d'ARNm qui est constitué de 0.5 μg d'ARNm auquel est ajouté 1 μl de DNase qui dégrade l'ADN génomique contaminant présent dans notre échantillon. De plus, la présence de standards internes n'est pas requise lors de la PCR en temps réel. Le volume final du mix d'ARNm est porté à 6,5 μl avec de l'eau RNase free. Une fois le mix d'ARNm réalisé, celui-ci est incubé à 37 °C pendant 30 minutes afin de permettre à la DNase d'agir. La réaction est ensuite arrêtée 5 minutes à 75 °C et remise sur glace. Ensuite, 2 μl d'oligo dT sont ajoutés, suivi d'une incubation de 10 minutes à 70 °C.

Une autre différence est retrouvée au niveau du mix de réaction qui contient du dNTP set au lieu du dNTP mix. La suite du protocole est identique à celui d'une RT pour une hybridation mise à part que l'ajout de 1,5 μl de rétro-transcriptase ne se fait qu'une fois.

II.9.4 Recherche de couples d'amorces

Le programme Primer Express 1.5 (Applied Biosystem, Pays-Bas) permet de choisir des couples d'amorces à partir de la séquence d'ARNm du gène d'intérêt obtenue dans le moteur de recherche NCBI.

Afin d'assurer la spécificité des amorces vis-à-vis de la séquence à amplifier, la longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb, tandis que celle des amorces varie entre 15 et 30 pb. Il faut que leur contenu en C/G représente 20 à 70 % de la séquence nucléotidique. Les amorces ne doivent contenir au maximum que 2 G et/ou C parmi les 5 derniers nucléotides à l'extrémité 3'. Enfin, la température de melting (T_m) des 2 amorces doit se situer entre 58 et 60 °C et celle-ci ne peut différer que de 1 ou 2 °C entre les 2 amorces.

Une fois les amorces choisies, nous vérifions la spécificité de celles-ci via deux autres logiciels. Tout d'abord grâce à Amplify, programme de simulation qui, à partir de la séquence à amplifier et des séquences des amorces, va nous donner un aperçu de ce que l'on va réellement amplifier. Dans notre cas, on s'attend à amplifier un seul fragment de la taille attendue.

Ensuite, nous utiliserons Blast afin de vérifier que les amorces n'amplifieront pas d'autres séquences contenues dans le génome humain.

II.9.5 Détermination de la concentration en amorces

Afin de déterminer les couples de concentrations en amorces pour lesquelles l'amplification est optimale, les amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt sont tout d'abord testées à 3 concentrations différentes (50 nM, 300 nM, 900 nM). Le meilleur couple de concentrations permettra une amplification optimale caractérisée par un Ct bas.

a) Matériels

- SyBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) (voir tableau II.12)

- Produits de RT : ADNc
- Amorces sens (Forward) et antisens (Reverse) spécifiques au gène d'intérêt répertoriées dans le *tableau II.13*
- Eau distillée
- Tips à filtre
- Gants
- Microtubes
- Optical tubes (Applied Biosystem, Pays-Bas)
- Optical caps (Applied Biosystem, Pays-Bas)
- Plaque 96 puits (Applied Biosystem, Pays-Bas)
- Abi Prism 7000 sequence detection system (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, USA)

b) Méthode

Une fois les amorces diluées, le mix d'ADNc et le mix de blanc sont réalisés. Leurs compositions sont reprises dans les *tableaux II.14 et II.15*. Dans chaque tube, 20 µl du mix correspondant sont déposés ainsi que les 5 µl des différentes dilutions des amorces. Après centrifugation, les tubes sont introduits dans l'appareil. Ensuite, les données sont encodées dans le programme informatique « SDS software ».

II.9.6 Détermination des efficacités de PCR

Une fois les concentrations optimales en amorces définies, des droites standard sont réalisées afin de déterminer l'efficacité d'amplification d'un fragment d'ADNc correspondant à chaque gène d'intérêt ainsi qu'au gène de référence. Celles-ci sont obtenues en réalisant des dilutions sériées (de 10^{-1} à 10^{-4}) de l'ADNc de départ.

Une PCR en temps réel est effectuée à partir de chacune de ces dilutions. Les valeurs de Ct obtenues sont portées en graphique en fonction de la dilution réalisée. Nous obtenons alors une droite de régression pour chaque gène dont la pente permet de déterminer l'efficacité de la PCR ($E = (10 - (1/\text{pente})) - 1$). Si les efficacités de PCR du gène d'intérêt et du gène de référence sont comparables, nous pourrions passer à l'expérience permettant de comparer l'expression de ceux-ci au sein de la condition test et de la condition contrôle.

a) Matériels (voir point II.9.5 a)

b) Méthode

Une fois la dilution des amorces terminée, le mix PCR est réalisé pour chaque gène étudié. Sa composition est reprise dans le *tableau II.16*.

Dans chaque tube, 20 µl de Master mix sont déposés ainsi que 5 µl d'ADNc à la bonne dilution ou 5 µl d'eau pour les blancs. Après centrifugation, les tubes sont introduits dans l'appareil. Ensuite, les données sont encodées dans le programme informatique « SDS software ». Le programme PCR peut alors être lancé.

II.9.7 Analyse des résultats

L'analyse des résultats commence par la détermination des Ct (cycles seuils) qui s'obtient en fixant le seuil de détection dans la zone d'amplification exponentielle. Au-dessus de ce seuil, l'intensité de fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond.

Ensuite, le ΔCt pour chaque gène dans chacune des conditions est évalué au moyen de la formule : $\Delta Ct = Ct$ du gène d'intérêt - Ct du gène de référence. Ceci est suivi du calcul de leur $\Delta\Delta Ct$ par la formule : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ de la condition test - ΔCt de la condition contrôle négatif. Une fois la valeur du $\Delta\Delta Ct$ obtenue, la valeur relative d'expression du gène étudié, dans les différentes conditions, est déterminée en utilisant la formule $E = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Si la valeur relative est égale à 1, cela signifie qu'il n'y a pas de variation d'expression du gène dans la condition étudiée.

Ce mémoire a comme objectifs majeurs d'une part de préciser les effets du 8-iso-PGF_{2α} sur les cellules endothéliales, pour confirmer qu'il s'agit bien d'une molécule bioactive, athérogène et d'autre part, les mécanismes moléculaires d'action restant controversés, en particulier en ce qui concerne les récepteurs reconnus par cette molécule, de comparer les effets du 8-iso-PGF_{2α} avec un agoniste du récepteur TP au TXA₂, dans l'espoir de mieux mettre en évidence des différences dans les réponses cellulaires à ces 2 molécules. Dans un premier temps, nous avons comparé les effets de ces 2 molécules sur l'activation du facteur transcriptionnel AP-1 dans le modèle des cellules endothéliales humaines HUV-EC-C.

III.1 Effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste du récepteur au thromboxane A₂ (U46619) sur l'activation du facteur de transcription AP-1

Comme cela a été explicité dans l'introduction, AP-1 fait partie d'une famille de facteurs de transcription dont la régulation fait intervenir des mécanismes de phosphorylation. En interagissant avec l'ADN, AP-1 peut jouer un rôle dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, mais il est également de plus en plus impliqué dans des processus inflammatoires tels que ceux liés à l'athérogenèse (Wang et al., 1999 et O'Neill, 1995).

Comme signalé dans l'objectif du mémoire, des expériences ont déjà été réalisées au sein du laboratoire sur l'activation du facteur de transcription AP-1 lors de la stimulation des cellules endothéliales avec l'isoprostane-8. Ces expériences ont permis de mettre en évidence des effets dose-dépendants de l'isoprostane-8 sur l'activation de ce facteur et plus précisément sa capacité à se fixer à sa séquence consensus. Elles ont également permis de mettre au point les conditions expérimentales que nous utiliserons au cours de ce mémoire.

Les premiers dosages ont été réalisés après des temps d'incubation de 15, 30, 45 minutes, 1H et 1H30, en présence de 8-iso-PGF_{2α} à une concentration de 50 μM. Ces expériences ont révélé que l'activation maximale du facteur de transcription AP-1 était obtenue avec un temps d'incubation de 45 minutes en présence de 8-iso-PGF_{2α}.

La littérature nous a appris que les concentrations physiologiques du 8-iso-PGF_{2α} mesurées dans les urines et dans le plasma sont nettement inférieures à 50 μM. Afin d'être plus proche des conditions dans l'organisme, A.Tacheny a testé différentes concentrations de 8-iso-PGF_{2α} dans le cadre de sa thèse. La *figure III.1* reprend les différentes concentrations testées, de 0,25 à 50 μM. Il faut également tenir compte que la présence d'éthanol (EtOH), utilisé pour diluer le 8-iso-PGF_{2α}, ou de sérum, peut avoir des effets secondaires sur les cellules, et ce indépendamment de l'isoprostane-8. C'est la raison pour laquelle la condition de stimulation est comparée à un contrôle négatif adapté, contenant un pourcentage d'EtOH et de sérum identique à celui des « conditions tests » (CTL EtOH = F12K stock + 0,01% d'éthanol absolu + 10 % de sérum).

En observant les résultats obtenus à la *figure III.1*, nous constatons bien un effet dose-dépendant du 8-iso-PGF_{2α}, avec un plateau atteint à la concentration de 10 μM.

Suite à ces résultats, la concentration de 10 μM, a donc été retenue pour effectuer les stimulations au 8-iso-PGF_{2α}, tout en sachant que cette molécule d'intérêt était déjà active sur les cellules endothéliales pour des concentrations inférieures. En effet, il est important de souligner,

qu'à la concentration 0,25 μM , le facteur de transcription AP-1 présentait déjà une activité de 240 % par rapport au contrôle négatif.

III.1.1 Effets comparatifs du 8-iso-PGF_{2 α} et de l'agoniste U46619

Afin de savoir si les voies de signalisation empruntées par le 8-iso-PGF_{2 α} et l'agoniste du récepteur au thromboxane A₂ (U46619) sont identiques ou non, nous avons, au cours de ce mémoire, comparé leurs effets sur l'activation du facteur de transcription AP-1. Nous espérons ainsi y voir plus clair sur le type de récepteur membranaire et les voies de signalisation utilisées par ces deux molécules.

Un premier dosage a été réalisé en stimulant les HUV-EC-C avec le 8-iso-PGF_{2 α} (10 μM) et le U46619 (10 μM) pendant 45 minutes. Signalons également la présence d'un CTL EtOH servant de contrôle négatif, lequel contient un pourcentage d'EtOH et de sérum identique à celui des "conditions tests".

La *figure III.2* reprend les résultats obtenus.

Les HUV-EC-C stimulées avec le 8-iso-PGF_{2 α} présentent une activation d'AP-1 supérieure d'environ 2,5 x par rapport au CTL EtOH. Ceci est en accord avec ce qui a déjà été mis en évidence par A. Tacheny au cours des deux premières années de sa thèse. Toutefois, l'agoniste du récepteur TP, induit une activation de AP-1 bien plus importante (4 x supérieure par rapport au CTL EtOH).

III.1.2 Effets de différents inhibiteurs de voies de signalisation

Dans le cadre de sa thèse, A. Tacheny avait déjà testé les effets de plusieurs inhibiteurs de voies de transduction du signal sur l'activation du facteur de transcription AP-1 suite à une stimulation avec le 8-iso-PGF_{2 α} . Les résultats obtenus ont démontré un effet des inhibiteurs de p42/44^{MAPK}, de la PKA, de la PKC, de l'antagoniste du récepteur TP et d'un chélateur du Ca⁺⁺.

Suite à ces données préliminaires, nous avons voulu tester, au cours de ce mémoire, ces mêmes inhibiteurs de voies de transduction du signal pour comparer leurs effets après une stimulation des HUV-EC-C avec le 8-iso-PGF_{2 α} et le U46619, afin de déterminer si l'activation de AP-1 passe par les mêmes voies de transduction du signal pour ces deux molécules.

Au cours de cette expérience, les HUV-EC-C sont pré-incubées 1 heure avec une solution contenant soit du PD98059 (inhibiteur de p42/44^{MAPK}), soit du Gö6976 ou de la Calphostine C (Cc) (inhibiteurs de PKC), soit du H89 (inhibiteur de PKA) ou du BAPTA-AM (chélateur du Ca⁺⁺).

Ces molécules sont diluées dans du milieu F12K stock + 10 % de sérum pour atteindre les concentrations finales données dans le *tableau II.2* des *Matériels et Méthodes*.

Des inhibiteurs de MAPK tels que SB203580 (p38^{MAPK}) et SP600125 (JNK) ont également été testés : le premier induisait une activation de AP-1 dans la condition CTL EtOH et le second produisait des résultats peu reproductibles (résultats non montrés). Nous avons donc laissé tomber ces molécules.

Après 1 heure d'incubation avec les inhibiteurs, les cellules sont ensuite stimulées avec le 8-iso-PGF_{2 α} (10 μM) ou le U46619 (10 μM) durant 45 minutes. Afin de mettre en évidence les effets des inhibiteurs, nous avons également réalisé une stimulation des HUV-EC-C avec le 8-iso-PGF_{2 α} (10 μM), le U46619 (10 μM) et le CTL EtOH, **SANS** pré-incubation avec les inhibiteurs. Enfin, l'effet des inhibiteurs seuls a également été testé.

Les résultats obtenus suite à l'utilisation du test colorimétrique en plaques multi-puits sont illustrés aux *figures III.3* et *III.4*. La première figure met en évidence l'activation de AP-1 exprimée en absorbance à 450 nm et la seconde reprend les mêmes résultats exprimés en pourcentage par rapport au CTL EtOH.

En observant les résultats **sans** inhibiteurs, nous constatons une activation de AP-1 pour les conditions 8-iso-PGF_{2α} et U46619. A nouveau, nous observons une activation plus importante de AP-1 avec l'agoniste par rapport à l'activation due au 8-iso-PGF_{2α} (228 % pour le 8-iso-PGF_{2α} et 449 % pour le U46619 par rapport au CTL et ce en absence d'inhibiteur). Pour chaque inhibiteur testé, le CTL EtOH réalisé démontre que ceux-ci n'ont pas d'effets sur les HUV-EC-C.

Par contre, on constate une inhibition de l'activation de AP-1 pour les conditions 8-iso-PGF_{2α} et U46619 et ce, pour tous les inhibiteurs testés.

La *figure III.4* reprend ces résultats exprimés en fonction du pourcentage d'activation de AP-1 par le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619 par rapport au contrôle négatif correspondant au même temps d'incubation. Nous constatons que le BAPTA-AM diminue l'activation basale de AP-1 dans les cellules non stimulées (12,6 %). L'activation d'AP-1 induite pour les 2 agents stimulateurs est complètement supprimée. Toutes les autres molécules utilisées interfèrent avec les voies de signalisation contrecarrant quasi totalement les effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste U46619.

Les résultats obtenus ci-dessus ont été confirmés lors d'une deuxième expérience.

III.1.3 Discussion

Les résultats apportés par ces expériences renforcent les résultats obtenus lors des études précédentes, à savoir que AP-1 est bien activé par le 8-iso-PGF_{2α}. De plus, nous avons mis en évidence une activation plus importante de AP-1 avec l'agoniste du récepteur TP par rapport au 8-iso-PGF_{2α}.

L'activation de AP-1, suite à une stimulation par le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619, est diminuée en présence d'inhibiteurs de PKC, de PKA, de MAKPK et de BAPTA-AM. Cette expérience nous permet de mettre en évidence l'implication de ces voies de transduction du signal lors d'une activation des cellules endothéliales induite par le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619.

Actuellement, il n'existe pas de données dans la littérature sur l'activation de AP-1 par le 8-iso-PGF_{2α} ou par l'agoniste du récepteur au thromboxane A₂ (U46619). Toutefois, Leitinger et al. (2001) ont déjà voulu comparer les effets du 8-iso-PGF_{2α} et du U46619, sur les cellules endothéliales humaines en culture, les HUVECs en culture primaire.

L'agoniste favorise l'adhérence des PMN et des monocytes et ce de manière VCAM-1 dépendante. Par contre, la stimulation des cellules endothéliales par le 8-iso-PGF_{2α} provoque une adhérence accrue uniquement des monocytes aux cellules endothéliales et ce indépendamment de l'expression des VCAM-1 et des sélectines endothéliales qui sont des molécules d'adhérence généralement exprimées suite à l'activation du facteur de transcription NFκB (Leitinger et al., 2001).

Leitinger et al. ont étudié également l'effet du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste du récepteur TP sur la phosphorylation des MAPK, notamment des p42/44^{MAPK}, également appelées ERK1/ERK2 (Extracellular Regulated Kinases) et dont la voie est principalement enclenchée par des facteurs de croissance tels que le PDGF, l'insuline ou encore des facteurs mitogènes. Ils ont

aussi étudié leurs effets sur la $p38^{MAPK}$ qui répond entre-autre aux stimulations de l'IL-1 et du $TNF\alpha$. En utilisant la technique du Western Blot, ils observent que la phosphorylation de ERK1/ERK2 était induite par les 2 molécules. Toutefois, un pré-traitement avec un inhibiteur de la kinase MEK1 (PD 98059) bloque l'effet du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ sur l'adhérence des monocytes, mais pas de l'agoniste. De plus, le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et l'agoniste induisent la phosphorylation de la voie $p38^{MAPK}$. Un pré-traitement avec un inhibiteur spécifique de $p38^{MAPK}$, le SB203580, diminue l'action du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et de l'agoniste sur l'adhérence des monocytes (Leitinger et al., 2001).

Ils ont ensuite testé différents inhibiteurs sur l'adhérence des monocytes induite lorsque les cellules endothéliales sont stimulées avec le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ou l'agoniste.

L'ajout d'un inhibiteur de la voie de la protéine kinase A (PKA), le H89, provoque une inhibition de l'effet du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, mais pas de l'agoniste du récepteur TP. Toutefois, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie de la protéine kinase C (PKC), le bisindolylmaleimide I (bisI) semble inhiber l'effet de l'agoniste du récepteur TP, mais ne réduit que d'environ 50% l'action du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$.

Ces résultats démontrent que la voie de PKA est en grande partie impliquée dans l'interaction monocytes-cellules endothéliales induite par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, tandis que l'activation des cellules endothéliales par l'agoniste du récepteur TP semble dépendre majoritairement de la voie de PKC.

Dans notre cas, en utilisant deux autres inhibiteurs de PKC (Gö6976 et Calphostine C) nous confirmons l'implication de la PKC dans l'activation de AP-1 bien que dans le cas de la Calphostine C, l'inhibition soit plus importante pour les deux molécules par rapport à leur inhibition par Gö6976.

Nous ne pouvons évidemment pas directement comparer les résultats obtenus par Leitinger et les nôtres. En effet, leur étude est basée sur un test d'adhérence des monocytes et pas sur l'activation du facteur de transcription AP-1. Dans notre cas, nous observons une inhibition des effets induits par les deux molécules en présence des inhibiteurs de PKA (H89), de MAPK (PD98059) et de PKC (Gö6976 ou Calphostine C).

Il est important de signaler que, récemment, d'autres études ont été réalisées sur l'activation de la voie $p38^{MAPK}$ en présence de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, dans les plaquettes humaines (Minuz et al., 2002).

Ces auteurs signalent également qu'un inhibiteur de p42/44 kinase ne semble pas affecter l'adhérence des plaquettes. Les réponses plaquettaires induites par les deux molécules semblent donc bien spécifiquement médiées par $p38^{MAPK}$. Il faut tout de même signaler que l'activation des plaquettes par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ se fait en présence d'autres agonistes des plaquettes comme la thrombine (Minuz et al., 2002).

En conclusion, nous avons démontré une activation du facteur de transcription AP-1 en présence du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et du U46619. L'effet des inhibiteurs de la PKC, de la PKA, de MAPK et de BAPTA-AM suppose l'implication de ces voies lors d'une stimulation avec nos deux molécules stimulantes. Par contre, l'utilisation d'inhibiteurs ne nous a pas permis de dégager des différences entre le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et l'agoniste U46619.

III.2 Comparaison des patterns d'expression des cellules HUV-EC-C stimulées avec le 8-iso-PGF₂ α et l'agoniste du récepteur TP (U46619) via hybridation sur un damier à ADN

Ce travail s'insère dans le cadre de la validation par EAT (Eppendorf array technologies), d'un damier généraliste reprenant 202 gènes humains. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, les phénomènes d'adhérence intercellulaire, la différenciation cellulaire, la coagulation,...(pour une liste complète, voir annexe 1). Divers modèles cellulaires ont été utilisés au laboratoire pour valider ce damier, dont les cellules endothéliales humaines HUV-EC-C. Signalons à cet égard que le damier comporte plusieurs gènes impliqués dans un dysfonctionnement de la cellule endothéliale lié à un contexte pro-inflammatoire ou pro-athérogène (*tableau III.1*).

Comme le montre la *figure III.5*, le design du damier le divise en trois zones distinctes. Ces différentes zones sont identiques entre elles, ce qui permet à chaque gène d'être représenté en triple sur l'ensemble du damier. Ce type de design a l'avantage de permettre une exploitation des résultats, même en cas de problèmes techniques lors d'une des étapes de l'hybridation. En effet, auparavant, les trois spots destinés à l'analyse d'un même gène étaient situés les uns à côté des autres. En cas de bulles, de taches ou d'un bruit de fond important sur une partie du damier, les résultats étaient inutilisables. Grâce à ce nouveau design, si une partie du damier est endommagée, il reste encore deux zones où la lecture des résultats est possible. Nous verrons des cas concrets en présentant nos résultats.

Les expériences d'hybridation nécessitent de nombreuses étapes successives. C'est pourquoi le damier comporte diverses sondes de capture permettant de contrôler les étapes de fixation, d'hybridation et de détection. Les **contrôles de fixation** sont constitués d'ADN multibiotinylés permettant de vérifier que les sondes de capture ont bien été fixées lors du spotting. Ces contrôles de fixation ont été spottés à différentes concentrations, afin de vérifier que la concentration et la fluorescence varient bien de façon proportionnelle. C'est pour cela que nous les désignons par **courbe de concentration** (*figure III.5*). Les **contrôles positifs d'hybridation** sont des sondes de capture dont la séquence est complémentaire à un amplicon biotinylé. Celui-ci est ajouté dans le mélange d'hybridation et permet de contrôler l'étape d'hybridation. Un signal positif doit être obtenu pour ces contrôles. Une autre sonde de capture complémentaire à une séquence d'origine végétale, et donc ne devant pas être présente dans notre mix d'hybridation, sert de **contrôle négatif d'hybridation**, bien évidemment aucun signal ne doit être observé sur cette sonde de capture.

Afin de permettre la normalisation des résultats obtenus, des gènes de référence ainsi que des standards internes sont utilisés. Pour ce travail, une dizaine de gènes de référence ont été utilisés ainsi que trois standards internes. Les **gènes de référence** sont des gènes qui devraient être exprimés de manière constante au sein de la cellule quelles que soient les conditions de culture de cette dernière. Ces gènes de référence peuvent varier d'un modèle à l'autre. En prévoyant 10, il y a de bonnes chances que plusieurs d'entre eux soient de « bons » gènes de référence. Les **standards internes** correspondent, eux, à des gènes d'origine végétale. Ils servent aussi à contrôler le bon déroulement de la RT. Ces standards sont ajoutés à trois concentrations connues lors de la transcription inverse. Leur fluorescence émise après hybridation en corrélation avec la fluorescence correspondant aux gènes de référence, permettra la normalisation des données obtenues.

Les gènes de référence et les standards internes sont présents en grand nombre et à divers endroits du damier ; ceci permettra de normaliser les résultats en tenant compte de possibles effets de non homogénéité du bruit de fond.

III.2.1 Conditions de stimulation des cellules endothéliales

Le protocole d'activation des cellules HUV-EC-C est décrit dans le point II.2 des *Matériels et méthodes*.

Dans cette étude, quatre conditions vont être testées : un contrôle négatif, un contrôle positif et les cellules stimulées au 8-iso-PGF_{2α} ou à l'agoniste du récepteur au TXA₂ (U46619). Pour rappel, les solutions de stimulation sont préparées dans du milieu F12K stock et 10 % de sérum afin d'obtenir une concentration de travail de 10 μM. Le **contrôle négatif** contient de l'EtOH 0.01% et 10 % de sérum. Le **contrôle positif** est une stimulation avec le TNFα. Pour rappel, le TNFα est une molécule pro-inflammatoire qui a été choisie comme contrôle positif, car elle joue un rôle important dans l'activation des cellules endothéliales en cas de stress pro-inflammatoires. Il est utilisé à une concentration de travail de 10 μg/ml auquel sont ajoutés du sérum (10 %) et de l'EtOH (0.01%). (stimulation comparable aux autres conditions). Ce contrôle positif permettra une validation des résultats à la fois pour ce travail et pour EAT, car des études ont déjà été réalisées sur des cellules endothéliales stimulées avec le TNFα suivies d'une hybridation sur un damier à ADN (Murakami et al., 2000 et Bandman et al., 2002).

Différents temps de stimulation ont été utilisés. D'après les données trouvées dans la littérature, le temps de stimulation généralement utilisé est de 3 heures. Cependant, nous avons aussi travaillé avec des stimulations de 6 heures afin de mettre en évidence de possibles variations dans les niveaux d'expression des gènes ou dans le nombre de gènes exprimés après une plus longue incubation en présence des molécules stimulatrices.

Suivant ces conditions, nous avons donc réalisé 3 expériences **indépendantes** avec 3 h de stimulation (expériences A, B et C) ainsi qu'une expérience avec 6 h de stimulation (exp D). Ces expériences sont indépendantes de par la génération des cellules, la culture de celles-ci et les extractions d'ARNm qui ont été réalisées à des jours différents. Il est utile de signaler que nous avons dû utiliser au moins 3 T75 par condition afin d'avoir assez de matériel cellulaire.

III.2.2 Extraction d'ARNm

L'ARNm est extrait des cellules HUV-EC-C selon le protocole décrit dans le point II.4 des *Matériels et méthodes*. Chaque extraction d'ARNm a été réalisée en parallèle pour les quatre conditions au sein d'une même expérience. La quantité d'ARNm extraite par échantillon est évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. La quantité de protéines est également déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm afin d'évaluer la pureté des échantillons en ARNm. Cette pureté est considérée comme correcte quand le rapport des absorbances (appelé ratio) est égal ou supérieur à 1,6. Une quantité importante de protéines contaminantes dans les échantillons, caractérisée par un ratio faible, peut poser des problèmes, en effet cela peut induire des interférences lors de la transcription inverse. Pour chaque extraction réalisée, des résultats de quantification ont été obtenus. Ils sont repris dans le *tableau III.2*. On peut constater qu'au fur et à mesure des extractions, on a amélioré la valeur du ratio. Ce tableau donne également une information sur le volume d'ARNm prélevé (en μl) pour chaque condition afin de réaliser la RT à partir de 0,5 μg d'ARNm. Il permet aussi d'observer une corrélation entre le nombre de cellules utilisées et les quantités d'ARNm extraites qui sont comprises en général entre 2 et 5 μg pour 3 T75 (environ de 4 à 5.10⁶ cellules).

III.2.3 Transcription inverse

Cette étape est réalisée selon le protocole décrit dans le point II.5 des *Matériels et méthodes*. Lors de la transcription inverse, on ajoute des standards internes aux échantillons d'ARNm extraits de cellules HUV-EC-C. Pour rappel, ces standards internes sont des ARNm d'origine végétale qui sont incorporés à des concentrations différentes, afin de pouvoir réaliser une normalisation des résultats et vérifier la qualité de la RT.

Sachant qu'il faut hybrider des quantités équivalentes d'ADN complémentaire sur le damier généraliste, nous avons pris une quantité identique d'ARNm (0,5 µg) pour chaque condition afin de réaliser la RT.

III.2.4 Hybridation des ADN cibles biotinylés

Le protocole de cette étape est décrit dans le point II.6 des *Matériels et méthodes*. Pour chaque expérience, 6 lames sont utilisées comme représenté à la *figure III.6*.

Cette figure reprend également la disposition de chaque condition pour toutes les expériences indépendantes réalisées. Sur les trois premières lames, chaque condition "test" et son contrôle sont hybridés en vis-à-vis afin de pouvoir comparer les résultats entre lames. Sur les trois dernières lames, on compare chaque condition "test" entre elles. Des triplicats de damiers sont donc réalisés pour chaque condition. Cela permet de limiter les risques de perte d'un damier suite, par exemple, à un bruit de fond trop important.

L'étape d'hybridation est une étape délicate. Au cours de l'hybridation, plusieurs événements peuvent compromettre la lisibilité du damier. La pose du couvre objet, le dépôt du mix d'hybridation, le maintien d'une température et d'une humidité adéquate durant la nuit d'hybridation, les différentes manipulations durant les lavages et le séchage des lames sont autant d'étapes où le moindre problème peut conduire à un artefact majeur compromettant la lecture des résultats. Par exemple, si lors de l'ajout du mix d'hybridation, des bulles se forment à cet endroit, l'hybridation ne se déroulera pas dans des conditions optimales et le bruit de fond local risque d'être plus important. La normalisation des résultats sera donc perturbée. L'utilisation d'un thermomixeur limite, en théorie, ce genre de désagrément en assurant une température adéquate, une humidité constante et une agitation perpétuelle des lames visant à faire voyager au maximum les bulles d'air (s'il y en a) durant la durée de l'hybridation.

La révélation et la quantification des ADNc hybridés sont effectuées suivant le protocole décrit au point II.7 et II.8 des *Matériels et méthodes*. Les ADNc cibles biotinylés hybridés à leur sonde anti-complémentaire, sont mis en évidence par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, la cyanine-3. La liaison spécifique des anticorps à leur cible se fait en présence d'une solution de blocking masquant les sites de liaison non spécifiques éventuels. La détection de la liaison anticorps-cible se réalise grâce à un scanner confocal.

L'intensité de fluorescence pour chaque spot est proportionnelle à la quantité de cibles hybridées et est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Chaque damier a été scanné à trois gains différents du photomultiplicateur : 100, 70 et 50 pour une intensité maximale du laser (100 %). Ces gains correspondent au pourcentage de lumière émise par le fluorochrome et repris par le photodétecteur. Cette opération a pour but d'obtenir des intensités détectables, mais non saturées pour chaque type de spot : que ce soit pour des spots correspondant à des gènes fortement exprimés (« high copy mRNA ») et qui requièrent un faible gain pour éviter la saturation ou que ce soit pour des spots correspondant à des gènes faiblement exprimés (« low copy mRNA ») et qui requièrent un gain élevé pour une détection satisfaisante.

Nous avons choisi de ne représenter que les gains 70 et 100 dans les figures représentant les différentes hybridations réalisées, car c'est pour ces 2 gains que l'on obtient le maximum d'informations complémentaires. La *figure III.7* représente le « design » du damier généraliste en localisant la position de chaque sonde de capture spécifique pour un ARNm donné. La *figure III.8* représente un agrandissement d'un damier hybridé, les trois parties identiques le constituant, un CTL + d'hybridation, un CTL - d'hybridation, la courbe de concentration et un standard interne. En réalité, un damier fait 13,5 mm x 13,5 mm.

III.2.5 Résultats

Trois expériences indépendantes (expériences A, B et C) ont été réalisées suivant les mêmes conditions. Les cellules HUV-EC-C sont mises en présence des molécules stimulatrices (8-iso-PGF_{2α}, U46619 et TNFα) pendant 3 heures.

La *figure III.9 A et B* reprend les résultats d'hybridation de l'expérience A (décrite dans le tableau III.2) au gain 100 (A) et au gain 70 (B). Le bruit de fond sur ces damiers est très faible. Lors de cette expérience, deux damiers sur douze furent inexploitable, car ils ont séché lors de l'hybridation « over night » dans le thermomixeur (damiers non montrés). Il faut aussi remarquer que pour ces deux damiers, nous avons dû utiliser des couvre-objets rigides qui ont donné des résultats de piètre qualité comparés aux résultats obtenus avec les couvre-objets souples.

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'expérience A, nous avons réalisé une seconde expérience appelée « expérience B ». Cette deuxième expérience est semblable en tout point à l'expérience A mais les cellules utilisées sont de génération différente. La *figure III.10* reprend les résultats d'hybridation de l'expérience B au gain 70. Deux damiers n'ont pu être exploités car le bruit de fond était trop important et ne permettait pas la quantification. Malheureusement, le damier CTL EtOH présente beaucoup plus de spots saturés par rapport au damier CTL EtOH de l'expérience A. Ce phénomène ne semble pas venir de l'hybridation car les contrôles positifs et négatifs sont corrects ainsi que le bruit de fond. Nous pensons plutôt à un problème lors d'une des étapes de la transcription inverse. Cette expérience devra donc être recommencée afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'expérience A. C'est ce que nous avons fait lors de l'expérience C. La *figure III.11* montre un des trois damiers sur lesquels la condition 8-iso-PGF_{2α} a été hybridée. Ce damier présente une tache au centre. Les deux autres damiers ne sont pas présentés, car l'artéfact est d'une telle importance qu'il les rend inutilisables. Il en est de même pour la condition U46619, un seul des trois damiers est exploitable. Les deux autres ne sont donc pas non plus présentés. C'est donc à partir de ces deux damiers (un pour le 8-iso-PGF_{2α} et un pour le U46619) que les quantifications ont été réalisées. Ceci illustre l'intérêt du design du damier en 3 parties, car la tache ne touche que la zone centrale du damier, permettant ainsi la réalisation de la quantification, sur les 2 parties latérales. L'origine de ces artéfacts est sans doute due à une différence de température entre la lame et le mix d'hybridation. Les lames ayant été conservées à 4 °C et le mix, une fois préparé, étant maintenu à 60 °C. La différence de température pourrait engendrer une précipitation d'un des composants du mix d'hybridation, ce qui expliquerait le phénomène observé. Les damiers des conditions CTL EtOH 0,01% et TNFα, quant à eux, sont parfaitement utilisables et ne présentent pas d'artéfact. Un exemple des damiers obtenus est représenté à la *figure III.11*.

L'expérience D présente deux différences par rapport à l'expérience A : les cellules utilisées ne sont pas de la même génération et le temps d'incubation n'est plus de 3 heures mais de 6 heures.

La *figure III.12* (A) et (B) illustre les damiers de l'expérience D avec le gain 100 (A) et le gain 70 (B). Pour quelques damiers, le bruit de fond était légèrement plus élevé comparé aux

expériences A, B et C, mais sans répercussion sur la quantification. Toutefois, 2 damiers n'ont pas pu être analysés suite à la présence de bulles provoquant un assèchement de certaines zones du damier (damiers non montrés).

La quantification des damiers est réalisée via un programme statistique qui va normaliser les valeurs obtenues à partir des standards internes et des gènes de références. La quantification est toujours réalisée en comparant la condition CTL EtOH et la condition "test". Après avoir quantifié ces différents damiers, nous avons réalisé une comparaison de l'expression des gènes contrôles par rapport aux gènes tests. Cette comparaison a pour but de découvrir les variations d'expression de certains gènes suivant les conditions testées.

Suite à cette analyse, nous avons obtenu des données à la fois quantitatives et qualitatives.

Les données qualitatives permettent de confirmer qu'il y a une variation sans pour autant considérer les valeurs proposées comme significatives. C'est le cas de certains gènes qui sont exprimés dans la condition CTL EtOH, mais qu'on ne retrouve pas exprimés dans le test.

Afin de faciliter la compréhension de cet ensemble de données, nous avons réalisé des tableaux et des figures permettant une meilleure visualisation de ces données.

Le *tableau III.3* représente les gènes dont l'expression augmente et ce pour les trois conditions testées (TNF α , U46619 et 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ après 3 heures de stimulation). Nous avons constaté une variation pour 32 gènes après stimulation au TNF α , de 13 gènes pour le U46619 et de 6 gènes pour le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$.

La *figure III.13* met en évidence les gènes dont l'expression varie dans les différentes conditions. Nous constatons qu'il y a beaucoup de gènes dont l'expression varie après une induction par TNF α après trois heures d'incubation. Il est intéressant de constater que quatre gènes voient leur expression augmenter et ce, pour les trois conditions de stimulation. Ces gènes sont ICAM-1, IL-8, IL-6 et PSMD11. Il s'agit de gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire, dans les réponses inflammatoires et immunes, ainsi que dans la dégradation de protéines.

Le *tableau III.4* permet de visualiser les similitudes entre l'expérience A et C. Etant donné les résultats obtenus lors de l'expérience B, nous ne la prendrons pas en compte. Nous observons que lors des conditions de stimulation par TNF α , la majorité des variations sont les mêmes pour l'expérience A que pour la C. Par contre, pour les conditions de stimulation avec le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et le U46619, la comparaison des données fût moins évidente vu que quatre damiers étaient inutilisables. De plus, dans le cas de l'U46619, les gènes de référence (house keeping genes) ont montré une grande variabilité lors de la quantification, alors que justement ces gènes sont choisis pour leur stabilité d'un point de vue expression. Signalons néanmoins pour l'agoniste, des résultats intéressants :

- 17 gènes montrant une augmentation significative de leur expression (par rapport à 13 dans l'expérience A (*tableau III.3*))
- parmi ces 17, on retrouve 8 gènes communs entre ces 2 expériences (en rouge dans le *tableau III.4*).
- ces 8 gènes présentent une plus forte induction que pour l'expérience A.

Nous n'avons pas d'explication définitive nous permettant d'expliquer les différences observées pour l'expérience C par rapport à l'expérience A, dans le cas de l'agoniste.

Mais l'interprétation la plus probable reste une erreur lors de la quantification des ARNm par manque d'homogénéité de la solution. Cette erreur nous aurait conduit à sous-estimer la quantité d'ARNm pour cet échantillon et donc à déposer plus d'ADNc sur le damier lors de l'hybridation.

Le *tableau III.5* reprend l'augmentation de l'expression des gènes lors d'une stimulation sur une période de 6 heures. Nous avons constaté une augmentation de l'expression de 20 gènes pour le TNF α , de 30 gènes pour le U46619 et de 33 gènes pour le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Nous avons choisi ce temps de stimulation plus long pour voir si des différences d'expression étaient décelables au cours du temps. Nous observons que le nombre de gènes dont l'expression augmente dans les conditions 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et U46619 pendant 6 heures de stimulation est plus important que pour 3 heures de stimulation. Cette augmentation est plus facilement visualisable en comparant les *figures III.13* et *III.14*. En effet, nous constatons qu'il y a beaucoup plus de gènes dont l'expression augmente pour les conditions de stimulation 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et U46619 pendant 6 heures par rapport aux mêmes stimulations mais sur une période de 3 heures (13 au lieu de 4).

III.2.6 Discussion

L'activation des cellules endothéliales induit des modifications d'expression d'un grand nombre de gènes encodant des protéines d'adhérence dont des cytokines, des molécules pro-thrombotiques,... L'endothélium assure diverses fonctions biologiques de par sa localisation à l'interface sang / tissu, ce qui explique la complexité et le nombre élevé des réponses transcriptionnelles suite à une stimulation. Puisque le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ semble exercer des effets biologiques au niveau des parois vasculaires, nous avons recherché des gènes induits lors d'une stimulation des cellules endothéliales en présence du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ et en présence de l'agoniste du récepteur au thromboxane A $_2$ (U46619). En comparant les patterns d'expression obtenus, nous espérons également mettre en évidence des différences entre les voies de signalisation utilisées par ces deux molécules.

Pour cela, nous avons utilisé un damier à ADN reprenant des sondes de capture correspondant à 202 gènes humains impliqués dans différents processus biologiques.

Lors de nos expériences indépendantes, nous avons incubé les cellules HUV-EC-C en présence de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, de U46619, d'un CTL EtOH correspondant au contrôle négatif et de TNF α correspondant au contrôle positif. Celui-ci permettra la validation des damiers utilisés, car notre travail s'insère dans une phase d'essais d'hybridation sur ce damier développé par EAT. D'autres modèles cellulaires ont également été utilisés au sein du laboratoire.

Le *tableau III.4* reprend les résultats obtenus au cours de l'expérience C, en pointant les gènes induits et dans l'expérience C, et dans l'expérience A. En présence du TNF α , nous constatons l'induction de 24 gènes et nous nous attendions à l'augmentation de certains d'entre eux en présence de cette cytokine pro-inflammatoire. C'est le cas des interleukines 8 et 6 (IL-8 et IL-6), qui induisent une réponse pro-inflammatoire et immune, de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) qui est induite en réponse à un stress, de la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui intervient dans la formation de prostaglandines et de thromboxane A $_2$ à partir de l'acide arachidonique suite à un stress inflammatoire, de la kinase-6 dépendante de la cycline (CDK-6) et le colony stimulating factor-1 (CSF-1) intervenant dans la prolifération et la différenciation cellulaire, intercellular cellular adhesion-1 (ICAM-1) qui est une molécule d'adhérence et le bone morphogenic protein-2 (BMP2), SMAD3 et la caveoline-1 (CAV-1) qui interviennent dans des voies de signalisation. Signalons que la cavéoline-1 structure les cavéoles qui sont particulièrement abondantes dans les cellules endothéliales. Les cavéoles, associées à des processus d'endocytose (Conner and Schmid, 2003), régulent également l'activité de la NO synthase constitutive des cellules endothéliales (Goligorsky et al., 2002).

Dans l'expérience A, le TNF α (*tableau III.3*) induisait l'expression de 32 gènes. Parmi

ceux-ci, on retrouve 17 gènes également induits dans l'expérience C.

Nous retrouvons également d'autres gènes exprimés en réponse au TNF α comme l'annexine 1 (ANX-1) qui est une molécule anti-inflammatoire et la protéine anti-oxydante-2 (AOP2) qui a aussi un rôle de défense face à un stress.

Curieusement, dans l'expérience A et dans l'expérience C, nous constatons une induction du gène PLAU encodant l'urokinase (ou u-PA), c'est-à-dire un activateur du plasminogène, à effet anti-coagulant, puisqu'il favorise la fibrinolyse. Ce qui nous a surpris d'avantage, c'est que des gènes qui ont pourtant une action opposée à PLAU ont eux aussi été induits : PAI-1 et PAI-2. Les produits de traduction de ces gènes sont des inhibiteurs de la voie d'activation du plasminogène.

Si on compare 3 et 6 heures de stimulation avec le TNF α (*tableau III 3 et 4* pour le temps 3 heures et *tableau III.5* pour le temps 6 heures), nous retrouvons, en grande partie, les mêmes gènes. Certains d'entre eux voient leur transcription augmentée, c'est le cas pour ICAM-1, IL-8, SOD2, COX-2, PLAU, PAI-1 et PAI-2.

Nous avons confronté nos résultats aux données de la littérature. Murakami et al. (2000) ont analysé les variations de l'expression de gènes suite à une incubation de 4 heures d'HUVECs en présence de TNF α . Les ARNm sont extraits des cellules, puis rétro-transcrits, pour être hybridés sur un damier à ADN comprenant 35 000 sondes de capture correspondant à des gènes humains. Ils ont constaté l'induction de gènes tels que IL-8 (cytokine pro-inflammatoire), ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine (qui médient l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales) ainsi que PAI-1 (inhibiteur de la voie d'activation du plasminogène). Une autre étude menée par Bandman et al. (2002) révèle l'induction de gènes comme IL-6, SOD-2, PAI-1, ICAM-1, IL-8, MCP-1, VEGF-C, vWF, COX-2... suite à une incubation de 24 h des cellules endothéliales artérielles (HAEC) et des cellules musculaires lisses (CASmMC) en présence de TNF α et d'IL- β .

Nous constatons donc que les résultats que nous avons obtenus par hybridation sont en accord avec les données récoltées de la littérature pour une série de gènes. Murakami et al. (2000) constatent cependant une augmentation de l'expression de TNF α , ce qui ne fut pas notre cas.

Si nous comparons les résultats des expériences à 3 h (A et C) et à 6 h (D) avec celles de Murakami et al. (2000) qui réalisent des incubations de 4 h en présence du TNF α , il faut signaler cependant que les expériences réalisées dans ce mémoire et celles effectuées par Murakami et al. (2000) ne sont pas identiques en tout point : la lignée cellulaire diffère et leur damier comprend un nombre beaucoup plus élevé de sondes. Malgré tout, tout en restant prudent, nous pouvons établir un parallélisme qui nous permet d'émettre quelques hypothèses. La première hypothèse est qu'il y aurait un pic d'activation entre 3 et 6 heures d'incubation pour le gène ICAM-1, car nous observons que l'expression de ICAM-1 augmente de 3 à 6 heures, mais l'expression de celui-ci pourrait être plus élevée à 4 h qu'à 6 h.

Cette hypothèse semble également valable pour d'autres gènes tels que l'IL-8 et l'IL-6. L'expression du gène IL-8 augmente fortement suite à une stimulation en présence du TNF α de 3 heures à 6 heures, alors que l'expression du gène IL-6 semble rester stable. Bandman et al. (2002) ont obtenu une augmentation de la transcription d'IL-6 après une stimulation avec le TNF α et l'IL-1 β de 24 heures.

En conclusion, les données recueillies pour TNF α dans notre travail et dans la littérature présentent de nombreuses similitudes. Les données récoltées peuvent donc être prises en considération et les techniques utilisées pour y parvenir sont efficaces, même s'il est évident

qu'il faut encore répéter ces expériences et les vérifier par PCR en temps réel.

Ensuite, nous avons comparé les gènes exprimés après une incubation des cellules HUV-EC-C en présence du 8-iso-PGF_{2α} et du U46619 durant 3 h et 6 h. Après 3 heures d'incubation, nous avons observé que certains gènes induits par le 8-iso-PGF_{2α} et par le U46619 sont les mêmes, mais le U46619 entraîne des augmentations d'expression plus marquées (*tableaux III.3, 4, 5 et 6*)

Les gènes IL-6, IL-8 (cytokine et chémokine pro-inflammatoires) et ICAM-1 (une molécule d'adhérence intercellulaire) sont trois gènes induits en présence de ces deux molécules lors des expériences A et C. Pour l'agoniste du récepteur TP (U46619), nous constatons une augmentation de gènes tels que PAI-1, PAI-2, PLAU et uPAR. Ces gènes interviennent dans la voie d'activation (uPAR et PLAU) et d'inhibition (PAI-1 et PAI-2) du plasminogène. COX-2 et SOD2 sont induits dans les deux expériences avec l'agoniste U46619 mais pas avec le 8-iso-PGF_{2α}.

Après 6 heures d'incubation avec le 8-iso-PGF_{2α}, le gène t-PA est lui aussi surexprimé tout comme PAI-1, PLAU et uPAR.

La voie d'activation du plasminogène semble donc être une cible des deux molécules stimulatrices. L'induction des gènes dont les fonctions s'opposent pourrait s'expliquer par une tentative de réponse de la cellule endothéliale qui suite à un stress induirait l'induction des activateurs de fibrinolyse (t-PA, uPAR et PLAU) afin de contrecarrer l'action de PAI-1 et PAI-2 exprimés. Une autre hypothèse serait qu'il existe une même voie d'activation pour ces différents gènes. Pour PLAU, uPAR et t-PA, cette voie serait constitutive alors que pour PAI-1 et PAI-2, cette voie serait activée par un stress.

En faisant un parallélisme entre les cytokines pro-inflammatoires et les gènes intervenant dans la fibrinolyse, nous constatons une différence dans leur temps d'induction. En effet, lors d'une stimulation au 8-iso-PGF_{2α}, les gènes codant pour des réponses pro-inflammatoires semblent être exprimés après 3 h, alors que les gènes de la voie d'activation du plasminogène semblent être induits après une stimulation de plus longue durée. Ce qui pourrait renforcer l'hypothèse d'une réponse défensive de la cellule face aux inhibiteurs du plasminogène si le stress persiste.

Une étude menée par Ishizuka et al. (1998) signale qu'un traitement d'HUVECs avec un agoniste du récepteur au TXA₂ (U46619) induit l'accumulation d'ARNm et l'expression en surface d'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et de ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1). Le U46619 (10⁻⁷ ou 10⁻⁶ M) est ajouté aux cellules endothéliales pendant 2 h ou 6 h. Les ARNm extraits sont rétrotranscrits et amplifiés par PCR en temps réel.

Ces données semblent appuyer les résultats obtenus lors des différentes hybridations réalisées comme l'augmentation de l'expression du gène ICAM-1 lors d'une stimulation en présence du U46619 pendant 3 h ou 6 h. Malheureusement, le damier généraliste ne comporte pas les sondes de capture pour ELAM-1 et VCAM-1.

Pour en revenir à une comparaison plus globale entre le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619, nous avons constaté que le nombre de gènes induits, dans les deux cas, augmente entre 3 h d'incubation et 6 h d'incubation (respectivement 33 et 30). Mais ils sont en général peu induits (moins de 3x). En outre, on ne retrouve que 3 gènes communs aux 2 molécules activatrices (PLAU, BCLX et TFAP2A) et leur induction est très faible (toujours inférieure à 3x). Il faut

donc rester très prudent et attendre la confirmation de ces résultats avec la PCR en temps réel.

L'induction des gènes en présence du 8-iso-PGF_{2α} ou du U46619 pourrait donc être assez lente. Dans le cas des maladies cardiovasculaires, nous avons vu que la plaque athéromateuse se formait suite à des phénomènes persistants et s'amplifiant au cours du temps. Si ces gènes, induits en plus grand nombre après 6 h, le sont également pour des temps plus longs. Ils pourraient, au niveau de la lésion, contribuer, en association avec d'autres phénomènes pro-athérogènes, à la formation d'une plaque athéromateuse.

En conclusion, les résultats obtenus sont encourageants, mais ils doivent encore être confirmés par des expériences supplémentaires d'une part et par la PCR en temps réel d'autre part.

Si on s'en tient aux temps 3 heures, pour lequel, nous avons 2 expériences indépendantes, nous constatons que le 8-iso-PGF_{2α} induit des gènes reconnus pour être impliqués dans les processus d'inflammation (IL-6, IL-8, ICAM-1).

Mais l'induction observée est très faible (≤ 2 fois). Pour les temps 6 heures, on observe un plus grand nombre de gènes induits, mais qui présentent peu de similitudes avec le temps 3 heures. Si on s'en tient aux gènes induits plus de 2 fois, on peut pointer quelques gènes qui attirent l'attention : BCL2 qui joue un rôle dans l'apoptose, APOJ qui encode une chaperonne extracellulaire, CAV-1 encodant la cavéoline-1 déjà mentionnée ci-dessus,... Il faudra donc vérifier si des incubations plus longues avec le 8-iso-PGF_{2α} aboutissent bien à des induction significatives de ces gènes.

Quant à la comparaison U46619 et 8-iso-PGF_{2α}, nous constatons que certains gènes sont bien induits par les 2 molécules, mais ils représentent moins de la moitié des gènes induits par les 2 molécules.

Par exemple, dans le *tableau III.4* (expérience C 3 h), ils représentent 6 sur 17 gènes induit pour le U46619 et 6 sur 20 gènes induits pour le 8-iso-PGF_{2α}. D'autre part, le U46619, semble être un meilleur inducteur que le 8-iso-PGF_{2α}. Les expériences préliminaires réalisées dans ce mémoire, ne permettent donc pas de tirer des conclusions définitives ni sur la nature des récepteurs reconnus par le 8-iso-PGF_{2α}, ni sur les voies de signalisation différentielles entre le 8-iso-PGF_{2α} et l'agoniste U46619. Toutefois, 2 gènes relevant dans le contexte de l'athérogenèse semblent induits par l'agoniste U46619, de même que par le TNF α , mais pas par le 8-iso-PGF_{2α} : COX-2, impliqué dans la production inductible de prostaglandines et SOD2, impliquée dans les mécanismes anti-oxydants. Ces 2 gènes peuvent donc constituer une piste future pour mieux déterminer le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α}.

III.3 Confirmation des résultats obtenus au cours des hybridations par PCR en temps réel

Afin de confirmer les résultats obtenus suite à l'hybridation au cours de nos différentes expériences, nous avons utilisé la technique de PCR en temps réel.

III.3.1 Extraction d'ARNm et rétrotranscription

Comme cela a été expliqué précédemment, l'ARNm est extrait des cellules HUV-EC-C selon le protocole décrit dans le point II.4 des Matériels et méthodes. Chaque extraction d'ARNm a été réalisée en parallèle pour les quatre conditions (CTL EtOH, 8-iso-PGF_{2α}, U46619 et TNFα). Après quantification, l'ARNm extrait est rétrotranscrit en ADNc comme décrit dans le point II.5 des *Matériels et méthodes*. Toutefois, comme cela est détaillé au point II.9.3 des *Matériels et méthodes*, la transcription inverse pour une PCR en temps réel diffère quelque peu par rapport à celle réalisée pour une hybridation : la composition du mix d'ARNm et la composition du mix de réaction ne sont pas les mêmes.

Afin de s'assurer de l'absence de contamination en ADN génomique dans nos échantillons, nous avons effectué différentes rétrotranscriptions pour l'échantillon CTL EtOH :

- **avec** DNase et **avec** superscript (CTL +) afin de dégrader tout ADN génomique contaminant et afin d'amplifier uniquement l'ARNm de nos échantillons. Il doit donc y avoir une amplification lors de la PCR en temps réel.

- **avec** DNase et **sans** superscript (CTL NAC+) afin de vérifier que la DNase a bien dégradé tout ADN génomique contaminant. En absence de superscript, l'ARNm n'est pas rétrotranscrit. Il n'y a donc normalement pas d'amplification dans cet échantillon lors de la PCR en temps réel, car l'ADN génomique contaminant a été normalement dégradé (NAC : Non amplification control)

- **sans** DNase et **avec** superscript (CTL -). Cet échantillon doit être comparé avec le CTL + afin de déterminer la présence d'ADN génomique contaminant vu l'absence de DNase dans ce cas-ci. Il permettra également de savoir si la DNase n'a pas dégradé notre ARNm dans le CTL +. Il doit y avoir amplification lors de la PCR en temps réel.

- **sans** DNase et **sans** superscript (CTL NAC -). Cet échantillon doit être comparé avec le CTL NAC +. Il ne doit pas être amplifié lors de la PCR en temps réel. Toutefois, en cas de présence d'une contamination en ADN génomique, celui-ci sera amplifié.

Nous avons réalisé le maximum de rétrotranscriptions avec DNase et avec superscript pour toutes les conditions testées pour avoir un matériel suffisant pour effectuer différentes expériences. Après cette rétrotranscription, l'ADNc obtenu est utilisé en PCR en temps réel.

Nous avons sélectionné une première série de gènes pour être étudiés en PCR en temps réel au cours de ce mémoire, le temps disponible ne permettant pas d'en étudier plus. Les gènes qui ont été retenus pour cette analyse sont ceux pour lesquels nous avons constaté une variation significative d'expression au sein d'une ou plusieurs de nos conditions d'activation et qui semblaient impliqués directement dans le dysfonctionnement endothélial. Ces gènes sont repris dans le *tableau III.7*.

La méthode de recherche et les programmes utilisés afin de déterminer les couples d'amorces adéquats pour chaque gène sont décrits dans le point II.9.4 des *Matériels et méthodes*. Seules les amorces pour PAI-1 et PAI-2 n'ont pas été commandées car elles amplifiaient d'autres

parties du génome de manière non spécifique. Nous avons recherché d'autres couples d'amorces pour ces deux gènes, mais ceux-ci n'ont pas encore été commandés.

III.3.2 Mise au point des conditions de la PCR en temps réel

Les mises au point ont été réalisées avec des extraits d'ARNm excédentaires provenant de l'expérience C. Nous avons tout d'abord réalisé des courbes standard pour les gènes suivants : ICAM-1, IL-6, IL-8, BMP2, SOD2, PLA2, uPAR et COX-2. Leurs courbes standards ont été réalisées en parallèle avec la courbe du gène de référence que nous avons choisi, le gène encodant la GAPDH.

La courbe standard permet de comparer les efficacités de PCR entre les gènes étudiés et le gène de référence. Ces courbes standards sont réalisées aux concentrations 300 nM/300 nM ([amorces sens]/[amorces anti-sens]) pour les gènes d'intérêt, car c'est la concentration la plus couramment utilisée. Pour le gène de référence, la GAPDH, les concentrations en amorces ont été mises au point précédemment. Elles sont de 300 nM/300 nM.

Nous avons obtenu directement la concentration optimale en amorces pour les gènes IL-6, BMP2, SOD2, PLA2, uPAR et COX-2. C'est-à-dire que l'efficacité de PCR pour chacun de ces gènes était comparable à celle obtenue pour la GAPDH. Pour le gène IL-8, nous avons constaté une amplification non spécifique représentée à la *figure III.15*. Ceci peut être dû à une non-spécificité des amorces. Ce pic d'aspécificité a également été observé lors d'une expérience de PCR en temps réel réalisée sur des ADNc obtenus à partir d'ARNm extraits de monocytes. Nous avons donc décidé de ne pas utiliser les amorces pour ce gène lors de nos tests. Comme pour PAI-1 et pour PAI-2, les séquences des amorces seront à redéfinir dans Primer Express.

L'efficacité de PCR aux concentrations 300 nM/300 nM n'étant pas optimale pour ICAM-1, nous avons réalisé une matrice d'amorce. Au cours de celle-ci, nous avons testé différentes combinaisons de concentrations pour les amorces sens et anti-sens comme représenté au *tableau III.8*, et ce, afin de déterminer le couple de concentrations optimales. Le test est effectué en double, en présence d'ADN et chaque fois accompagné d'un blanc. La concentration optimale sera celle où l'amplification de l'ADN commencera au Ct le plus bas. Le blanc quant à lui ne devra présenter aucune amplification. Toutefois, si le blanc présente un Ct inférieur à 40, cela traduirait que les amorces en excès par rapport au template forment des dimères entre elles. La concentration optimale après analyse des résultats est de 900 nM pour l'amorce sens et de 50 nM pour l'amorce anti-sens pour ICAM-1 (*figure III.16*).

III.3.3 Résultats

Nous avons réalisé une première expérience afin de comparer l'expression des gènes ICAM-1, IL-6 et BMP2 après 3 h d'incubation en présence des molécules stimulatrices : 8-iso-PGF_{2α}, U46619 et TNFα. Des doubles pour chaque condition ont été réalisés. Ceux-ci sont accompagnés de blancs pour chaque gène testé, ainsi que pour GAPDH, le gène de référence. Nous avons également vérifié en parallèle l'absence d'ADN génomique pour la condition CTL EtOH comme explicité au point III.3.1.

Malheureusement, nous n'avons pas obtenu d'amplification correcte pour l'échantillon CTL EtOH, les courbes obtenues lors de la PCR en temps réel sont plates et les droites standard de GAPDH sont tout à fait incorrectes. Nous avons réalisé un deuxième test en utilisant un autre échantillon CTL EtOH provenant d'une RT indépendante. Les mêmes résultats ont été constatés. Nous avons alors mis en doute la qualité de l'ARNm extrait à partir de la condition CTL EtOH. Le CTL EtOH étant inutilisable, nous n'avons pas pu confirmer les résultats obtenus au cours des hybridations par la technique de PCR en temps réel.

Suite à cela, nous avons décidé d'utiliser les ADN complémentaires de l'expérience F résultant d'une stimulation pendant 6 h des HUV-EC-C en présence des molécules stimulatrices : $\text{TNF}\alpha$, U46619 et 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Nous espérons ainsi pouvoir comparer les résultats obtenus au cours de l'hybridation de l'expérience D (incubation de 6 h).

Nous avons donc réalisé une PCR en temps réel pour étudier les variations d'expression des gènes ICAM-1, SOD2, PLA2, uPAR, COX-2 et BMP-2 après 6 h en présence de molécules stimulatrices : 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, U46619 et $\text{TNF}\alpha$. Pour chaque condition, des doubles et des blancs ont été réalisés ainsi que pour le gène de référence, la GAPDH. En parallèle, nous avons également vérifié l'absence d'ADN génomique contaminant pour la condition CTL EtOH comme explicité au point III.3.1. Cette expérience a été recommencée, car nous avons constaté des courbes plates et des droites standard incorrectes pour la condition CTL EtOH. Au deuxième essai, nous avons rencontré les mêmes problèmes que lors de la PCR en temps réel effectuée pour les gènes dont l'expression varie après 3 h. Nous en avons conclu qu'une mauvaise qualité de l'ARNm de la condition CTL EtOH était une nouvelle fois en cause.

Le temps et le matériel cellulaire ne nous permettant pas de refaire une nouvelle extraction d'ARNm, nous n'avons pas pu comparer, au cours de ce mémoire, les résultats obtenus par hybridation avec la PCR en temps réel.

Toutefois, en parallèle à ce travail, nous avons réalisé des tests par PCR en temps réel sur MCP-1. Pour rappel, il s'agit d'une molécule chémoattractante sécrétée par la cellule endothéliale afin de recruter les monocytes. Au laboratoire, A. Tacheny a mis en évidence, à l'aide d'un test ELISA, une augmentation de la sécrétion du MCP-1 au niveau des cellules endothéliales incubées en présence du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$.

Nous avons effectué une PCR en temps réel pour MCP-1 à partir d'extraits d'ARNm de l'expérience C (3 h de stimulation) afin de voir si l'expression de MCP-1 varie au sein des cellules stimulées au 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Des mises au point ont également été effectuées pour ce gène. Les concentrations optimales en amorces obtenues sont de 900 nM/300 nM (*figure III. 17*). Pour ce couple de concentrations en amorce, nous avons obtenu des efficacités de PCR comparables entre MCP-1 et GAPDH. En effet, les droites obtenues à partir des Ct des deux gènes en fonction des différentes dilutions d'ADNc effectuées, ont des pentes plus ou moins identiques : -3,455 pour GAPDH et -3,6735 pour MCP-1 (*figure III.18 A*). Nous pouvons donc calculer les efficacités de PCR pour ces deux gènes à partir de la formule suivante : $E = (10^{-(1/\text{pente})}) - 1$. Ces efficacités sont de 94,7 % pour GAPDH et 87,1 % pour MCP-1. Ensuite, la *figure III.18 B* reprend le graphe obtenu à partir des delta Ct (Ct gène d'intérêt - Ct gène de référence) pour chaque dilution. La droite obtenue doit posséder une pente inférieure ou égale à 0,1 en valeur absolue. Dans notre cas, la pente étant de -0,07, nous pouvons passer à l'étape suivante qui est d'effectuer un test à partir de la condition CTL EtOH et de la condition 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ (3 h de stimulation). La *figure III.19* représente la courbe d'amplification obtenue après la PCR en temps réel réalisée pour la condition CTL EtOH et pour la condition 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. L'amplification et les doubles de chaque condition ainsi que les blancs sont corrects. Nous observons également que le Ct de la condition test est plus petit que le Ct de la condition contrôle, nous pouvons donc nous attendre à une augmentation d'expression de MCP-1 après stimulation à l'8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Les courbes d'amplification pour GAPDH (non montrées) ne présentaient quant à elles, pas de différence nette entre les Ct « contrôle » et « test » ce qui confirme sa validité comme gène de référence.

Pour calculer le pourcentage d'induction de MCP-1, nous effectuons les différents calculs représentés au *tableau III.9*. Suite à l'analyse de ces résultats, nous avons constaté une augmentation de l'expression de MCP-1 d'environ 177 % en présence du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ par rapport au CTL EtOH.

Cette induction est faible, mais a toutefois été confirmée lors d'une seconde expérience. Il serait toutefois bon de confirmer cette surexpression à partir d'échantillons d'ADNc indépendants du point de vue des stimulations, de la génération cellulaire et des extractions d'ARNm. Signalons cependant qu'elle est conforme avec l'augmentation de l'expression au niveau protéomique, décelée par test ELISA.

III.3.4 Discussion

La PCR en temps réel est utilisée par de nombreux auteurs pour valider les résultats obtenus après hybridation sur damier, sur membrane,.... lorsqu'ils constatent une augmentation d'expression pour un ou plusieurs gènes d'intérêt.

Dans notre cas, l'ARNm extrait pour la condition CTL EtOH étant inutilisable, cette technique ne nous a pas permis de confirmer les variations dans l'expression des gènes induits à 3 h et 6 h d'incubation en présence du 8-iso-PGF_{2α}, du U46619 et du TNFα. Nous n'avons donc pas pu vérifier les résultats obtenus par hybridation. Signalons cependant que d'autres chercheurs du laboratoire, ayant utilisé les mêmes damiers sur d'autres modèles cellulaires, sont parvenus à confirmer par PCR en temps réel, les augmentations d'expression génique décelées avec le damier.

Vu que la qualité de l'ARNm extrait est sans doute à l'origine des problèmes rencontrés lors de nos expériences, une vérification de sa pureté pourrait être réalisée. La qualité de l'ARNm peut être vérifiée en réalisant un gel d'agarose (1 %) sur lequel 2 µl d'ARNm sont chargés. Cette technique est longue et utilise une grande quantité de matériel car il faut à nouveau prélever 2 µl pour la quantification. Nous n'avons pas opté pour cette technique pour ces raisons.

Cependant, il existe un appareil, le « 2100 Bioanalyser » (Aligent), permettant de vérifier la qualité et la quantité d'ARNm en utilisant 1 µl d'ARNm. De plus, il présente un gain de temps significatif puisqu'il permettrait de traiter 12 échantillons en 30 minutes. Cet appareil est déjà présent au laboratoire mais n'est pas encore fonctionnel.

Les résultats obtenus sur le damier dans ce travail lors des différentes hybridations, sont également conformes aux résultats de PCR en temps réel obtenus par Ishizuka et al. (1998) avec l'agoniste U46619. En effet, ils ont signalé une expression en surface des HUVECs de molécules d'adhérence comme ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1, suite à une incubation en présence de l'agoniste du récepteur au TXA₂ (U46619).

Ceci pourrait renforcer l'idée que d'autres gènes induits mis en évidence lors des hybridations, le soient également en PCR en temps réel. D'où l'intérêt de réaliser de nouvelles extractions d'ARNm, pour valider les résultats obtenus au cours des hybridations

La PCR en temps réel nous a toutefois permis de confirmer les résultats obtenus par A. Tacheny lors des tests ELISA effectués dans le cadre de sa thèse. L'augmentation d'expression du gène MCP-1 est en corrélation avec la sécrétion de MCP-1 induit par le 8-iso-PGF_{2α}. Comme explicité dans les résultats, un nouveau test à partir d'ADNc provenant d'une expérience indépendante pourrait être réalisé afin d'apporter une confirmation supplémentaire.

IV. Conclusions et perspectives

L'isoprostane-8, composé de type prostaglandine dérivé de l'auto-oxydation d'acides gras insaturés, tel que l'acide arachidonique, fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de recherches concernant les maladies cardiovasculaires. Cette molécule, considérée comme un marqueur de stress oxydatifs et de peroxydation lipidique *in vivo*, semble également avoir des effets biologiques qui en font une molécule pro-athérogène. En effet, elle active les plaquettes en diminuant l'activité inhibitrice du NO (Minuz et al., 1998) et elle exerce sur les cellules musculaires lisses une vasoconstriction ainsi que leur mitogenèse (Pratico, 1999).

Toutefois, son mode d'action et les mécanismes moléculaires impliqués sont encore inconnus.

Au cours de ce mémoire, les effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste du récepteur au TXA₂ (U46619) ont été étudiés sur un modèle de cellules endothéliales humaines en culture : les HUV-EC-C, afin de déterminer d'une part les effets de ces molécules sur les CE et d'autre part de mettre en évidence des différences dans les réponses cellulaires induites par chacune de ces deux molécules. Ces différences devraient donner des indications sur les récepteurs reconnus par le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619, ainsi que sur les voies de signalisation déclenchées.

Dans un premier temps, nous avons vérifié les effets du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste du récepteur au TXA₂ sur l'activation du facteur de transcription AP-1 au niveau des cellules endothéliales.

Ensuite, nous avons utilisé un damier à ADN pour mettre en évidence les profils d'expression génique pour des HUV-EC-C stimulées ou non avec le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619, en espérant mettre en évidence des différences.

Pour terminer, nous avons essayé de confirmer les résultats obtenus par hybridation en PCR en temps réel. Cette technique a également été utilisée pour mettre en évidence une variation d'expression génique pour le MCP-1, chémokine dont le gène ne figure pas sur le damier généraliste et dont une augmentation de sécrétion a déjà été mise en évidence au cours de la thèse de A. Tacheny suite à des tests ELISA.

Nous avons tout d'abord démontré une activation du facteur de transcription AP-1 en présence du 8-iso-PGF_{2α}, mais également du U46619. En effet, ce dernier induit une activation d'AP-1 quatre fois supérieure par rapport aux cellules « contrôles ». De plus, l'utilisation des inhibiteurs de la PKC, de la PKA, de MAPK et d'un chélateur de Ca⁺⁺ (BAPTA-AM) provoquent l'inhibition des voies de signalisation empruntées par les deux molécules. Les résultats apportés par ces expériences renforcent ceux obtenus au cours de la thèse de A. Tacheny, à savoir que AP-1 est bien activé par le 8-iso-PGF_{2α}. Toutefois, les inhibiteurs de signalisation ne nous ont pas permis de déterminer si les voies de signalisation empruntées par ces deux molécules sont identiques ou non.

Les données de la littérature mentionnent l'implication de la voie de p38^{MAPK} en présence des deux molécules (Minuz et al., 2002). L'inhibiteur de la p38^{MAPK} (SB203580) a été testé, mais il induisait une activation de AP-1 dans la condition CTL EtOH (contrôle négatif d'AP-1). Il faudra donc réaliser des tests supplémentaires afin de déterminer l'origine de cette activation.

Ces résultats n'ayant pas permis d'observer des différences entre les voies de transduction du signal, pour les 2 molécules étudiées nous nous sommes tournés vers une approche transcriptionnelle, visant à mettre en évidence des profils d'expression géniques, au niveau ARNm, via des damiers à ADN. Cette approche pourrait nous donner des informations sur le

type et le nombre de gènes induits suite à une incubation des cellules en présence d'un contrôle négatif, du 8-iso-PGF_{2α}, et du U46619. Nous avons également choisi un contrôle positif, le TNFα, car il existe dans la littérature de nombreuses données sur les effets du TNFα sur l'expression génique des cellules endothéliales, que ce soit via des techniques classiques (Northern-Blot, RT-PCR, PCR en temps réel) ou via des techniques de type damier à ADN (Bandman et al., 2002 ; Murakami et al., 2000 et Gerristen and Bloor, 1993).

En comparant les résultats des expériences indépendantes avec ceux rapportés par la littérature concernant le TNFα, nous avons pu valider la technique du damier à ADN. Nous retrouvons, en effet, un parallélisme entre les gènes exprimés lors des hybridations réalisées dans ce travail et ceux cités dans la littérature en présence de TNFα comme par exemple : ICAM-1, IL-8, PAI-1, uPA, tPA et COX-2.

Puisque les résultats obtenus avec le TNFα sont cohérents avec les données de la littérature, nous pouvons donc considérer que les variations d'expression génique obtenues avec le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619 sont fiables, avec cependant deux remarques :

- primo, les expériences avec le 8-iso-PGF_{2α} et le U46619 doivent être recommencées, pour mieux mettre en évidence les variations d'expression génique relevantes, et exclure celles qui ne sont pas reproductibles ;
- secundo, il faut rester très prudent pour les effets du 8-iso-PGF_{2α}, car les inductions observées sont extrêmement faibles (de l'ordre de deux fois) et seules celles confirmées de manière non ambiguë par la PCR en temps réel, devront être prises en considération.

Au cours des hybridations réalisées lors de ce mémoire, nous avons cependant constaté une variation de l'expression de plusieurs gènes au sein des HUV-EC-C stimulées pendant 3 h et 6 h avec le 8-iso-PGF_{2α}, le U46619 et le TNFα (*figure IV.1*). Parmi ces gènes, nous retrouvons : ICAM-1, SOD2, uPAR, PLAU, COX-2, PAI-1, PAI-2, IL-8, IL-6 et BMP2. Ils interviennent dans la réponse pro-inflammatoire, ce qui renforcerait l'hypothèse que le 8-iso-PGF_{2α} est un agent plutôt pro-athérogène. Nous avons également constaté des gènes induits en présence du 8-iso-PGF_{2α} et en présence du U46619. L'hypothèse d'une similitude entre leurs voies d'activation est donc une nouvelle fois mise en avant. Néanmoins, le U46619 induit, comme le TNFα, la COX-2 responsable de la production inductible des prostaglandines et la MnSOD-2, enzyme antioxydante, contrairement au 8-iso-PGF_{2α}. Cela renforce l'hypothèse que les voies de signalisation déclenchée par le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α} ne sont pas complètement identiques, même si certaines voies moléculaires sont communes.

Enfin, la variation d'expression de certains gènes après 6 h nous a interpellé. En présence du U46619, nous avons constaté l'induction de TIMP2 et de MMP14, deux gènes ayant des rôles opposés. En effet, TIMP2 code pour un inhibiteur de la dégradation de la matrice extracellulaire tandis que MMP14 code pour une métallo-protéinase membranaire. Une fois de plus, l'activation de ces gènes dont les fonctions s'opposent pourrait s'expliquer par une tentative de réponse de la cellule endothéliale suite à un stress.

En présence du 8-iso-PGF_{2α}, il semble que seuls les gènes TIMP1 et TIMP2 soient exprimés, ce qui constitue encore une différence qu'il serait utile d'investiguer par la suite.

Toutefois, nous n'avons pas pu tirer de conclusion au sujet du ou des récepteurs empruntés par le 8-iso-PGF_{2α}.

Suite à ces résultats, il serait utile de réaliser un damier plus ciblé sur la cellule endothéliale. Ce damier contiendrait non seulement, les gènes pour lesquels nous avons bien observé une induction au cours de ce mémoire, mais également des gènes qui actuellement ne se retrouvent pas sur le damier :

- MCP-1, chémokine qu'on sait être induite par le 8-iso-PGF_{2α} et qui n'est pas sur le damier,

- Des gènes encodant des protéines d'adhérence telles que PECAM-1, VCAM-1, E- et P-sélectines,
 - Des gènes encodant des protéines importantes dans les fonctions endothéliales, telles que le facteur de von Willebrand, la NOS (NO synthase) constitutive,.....
- Enfin, il faudrait confirmer que l'induction des gènes suivants est bien significative :
- Apo J qui code pour une chaperone extracellulaire,
 - S 100 A, p 21, CCND1, E2F2 ,... qui régulent le cycle cellulaire, etc.

Enfin, il faudra confirmer les résultats obtenus pour le temps 6 heures pour confirmer si la faible induction observée pour de nombreux gènes en présence des deux molécules (entre 2 et 3 fois), est bien significative. Si oui, on pourrait envisager d'étudier l'expression de ces gènes pour des temps plus longs.

Nous avons choisi de confirmer les résultats des hybridations par la technique de PCR en temps réel. Malheureusement, des problèmes de qualité des préparations d'ARNm sont survenus à deux reprises et nous n'avons pas pu confirmer ces résultats. Il serait donc intéressant de refaire des extractions d'ARNm aux mêmes temps de stimulation (3 h et 6 h) en présence des molécules stimulatrices.

Vu que la qualité de l'ARNm extrait semble être à l'origine des problèmes survenus lors de la PCR en temps réel, il serait utile de pouvoir vérifier la qualité de cet ARNm avant la rétrotranscription. Ceci peut être réalisé à l'aide d'un appareil permettant de quantifier et de vérifier la pureté de l'ARNm en peu de temps et en utilisant peu de matériel extrait. Il s'agit du Bioanalyser (Agilent). Cet appareil vient d'être installé au laboratoire, mais il n'est pas encore fonctionnel.

La technique de PCR en temps réel nous a également permis de mettre en évidence une faible augmentation de l'expression du gène MCP-1. Cette donnée apporte une information complémentaire aux tests ELISA réalisés dans le cadre de la thèse de A. Tacheny. Ces tests ont montré une augmentation de sécrétion du MCP1 lors d'une stimulation des HUV-EC-C en présence du 8-iso-PGF_{2α}.

Au vu des résultats obtenus sur l'ensemble de ce mémoire, nous pouvons envisager quelques perspectives à plus long terme. L'effet du 8-iso-PGF_{2α} pourrait être testé sur d'autres types cellulaires impliqués dans les maladies cardiovasculaires tels que les monocytes, également étudiés au laboratoire.

Enfin, ce travail peut être complété par une approche protéomique, réalisée dans le cadre de la thèse de Cindy Gustin, pour mettre en évidence des variations de l'expression génique au niveau protéinique des cellules endothéliales ou des monocytes en présence du 8-iso-PGF_{2α} et de l'agoniste du récepteur au thromboxane A₂.

On peut donc espérer par ces différentes approches arriver à une meilleure compréhension quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement endothélial induit par une molécule pro-athérogène, comme l'isoprostane-8.

Table des matières

1. Introduction

<u>I.1 L'ENDOTHELIUM, INTERFACE IMPORTANT ENTRE SANG ET TISSU</u>	1
<u>I.2. L'ATHEROSCLEROSE</u>	5
I.2.1 RAPPEL DE LA STRUCTURE GENERALE DE L' ARTERE NORMALE	5
I.2.2 INITIATION DE LA LESION ATHEROSCLEROTIQUE.....	6
I.2.3 LES ACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA LESION.....	6
I.2.4 LES FACTEURS DE RISQUE	8
I.2.5 LES LIPOPROTEINES	9
I.2.5.1 <u>Structure et composition</u>	9
I.2.5.2 <u>Le métabolisme des lipides</u>	9
I.2.5.3 <u>Les lipoprotéines impliquées dans l'athérosclérose</u>	10
a) Les lipoprotéines anti-athérogènes : les HDL ou « bon cholestérol ».....	10
b) Les lipoprotéines pro-athérogènes : les LDL ou « mauvais cholestérol »	11
I.2.5.4 <u>Les LDL oxydées</u>	11
<u>I.3 LES ISOPROSTANES</u>	13
I.3.1 MECANISMES DE FORMATION DES ISOPROSTANES	13
I.3.1.1 <u>Formation des prostaglandines par voie enzymatique</u>	13
I.3.1.2 <u>Formation des isoprostanes</u>	14
I.3.2 LES ISOPROSTANES, COMME MARQUEURS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	15
I.3.2.1 <u>Marqueurs in vitro</u>	15
I.3.2.2 <u>Marqueurs in vivo</u>	16
I.3.3 LES ISOPROSTANES, COMME BIOMARQUEURS DE PATHOLOGIES CHEZ L'HOMME	17
I.3.4 LES ISOPROSTANES ET L'ATHEROSCLEROSE	17
I.3.5 LES ISOPROSTANES, DES MOLECULES BIOACTIVES	18
I.3.6 VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL IMPLIQUEES.....	20
I.3.6.1 <u>Le récepteur au thromboxane A₂ (R-TXA₂ ou récepteur TP)</u>	20
I.3.6.2 <u>Effets du 8-iso-PGF₂α et de l'agoniste au thromboxane A₂ (U46619)</u>	20
<u>I.4 OBJECTIFS DU MEMOIRE</u>	22

2. Matériels et méthodes

<u>II.1 LA CULTURE CELLULAIRE DES CELLULES ENDOTHELIALES HUV-EC-C</u>	24
II.1.1 MATERIELS.....	24
II.1.2. METHODES	24
a) <u>Repiquage des cellules HUV-EC-C</u>	24
b) <u>Comptage des cellules</u>	25
c) <u>Congélation des HUV-EC-C</u>	25
d) <u>Décongélation des HUV-EC-C</u>	25
<u>II.2 PROTOCOLE D'ACTIVATION DES CELLULES HUV-EC-C</u>	25
<u>II.3 MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1 PAR DOSAGE COLORIMETRIQUE</u>	26
II.3.1. PRINCIPE.....	26
II.3.2. MATERIELS.....	26
a) <u>Fixation des sondes de capture</u>	26
b) <u>Extraction nucléaire et dosage protéique</u>	26
c) <u>Dosage colorimétrique proprement dit</u> :	27
II.3.3. METHODES	27
a) <u>Fixation des sondes de capture</u> :	27
b) <u>Stimulation des cellules et extraction protéique</u> :	27
c) <u>Dosage colorimétrique proprement dit</u> :	28

<u>II.4 EXTRACTION D'ARN MESSAGER</u>	28
II.4.1. PRINCIPE.....	28
II.4.2. MATERIELS	28
II.4.3. METHODES	29
a) <u>Préparation des cellules</u>	29
b) <u>Isolation de l'ARN messenger et lavage de la cellulose</u>	29
c) <u>Elution et précipitation de l'ARN messenger</u>	29
<u>II.5 TRANSCRIPTION INVERSE (RT)</u>	30
II.5.1. PRINCIPE.....	30
II.5.2. MATERIELS	30
II.5.3. METHODES	30
<u>II.6 HYBRIDATION D'ADN CIBLES BIOTINYLES</u>	31
II.6.1. PRINCIPE.....	31
II.6.2. MATERIELS	31
II.6.3. METHODES	31
<u>II.7 REVELATION</u>	32
II.7.1. PRINCIPE.....	32
II.7.2. MATERIELS	32
II.7.3. METHODES	32
<u>II.8 QUANTIFICATION</u>	32
II.8.1. PRINCIPE.....	32
II.8.2. METHODES	32
<u>II.9 PCR EN TEMPS REEL</u>	33
II.9.1 PRINCIPE.....	33
II.9.2. EXTRACTION D'ARNM.....	33
II.9.3. TRANSCRIPTION INVERSE (RT)	33
a) <u>Matériels</u>	33
b) <u>Méthode</u>	34
II.9.4 RECHERCHE DE COUPLES D'AMORCES.....	34
II.9.5 DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN AMORCES	34
a) <u>Matériels</u>	34
b) <u>Méthode</u>	35
II.9.6 DETERMINATION DES EFFICIENCES DE PCR.....	35
b) <u>Méthode</u>	35
II.9.7 ANALYSE DES RESULTATS	35
<u>3. Résultats et discussion</u>	
<u>III.1 EFFETS DU 8-ISO-PGF_{2α} ET DE L'AGONISTE DU RECEPTEUR AU THROMBOXANE A₂ (U46619) SUR L'ACTIVATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1</u>	37
III.1.1 EFFETS COMPARATIFS DU 8-ISO-PGF _{2α} ET DE L'AGONISTE U46619.....	38
III.1.2 EFFETS DE DIFFERENTS INHIBITEURS DE VOIES DE SIGNALISATION.....	38
III.1.3 DISCUSSION.....	39
<u>III.2 COMPARAISON DES PATTERNS D'EXPRESSION DES CELLULES HUV-EC-C STIMULEES AVEC LE 8-ISO-PGF_{2α} ET L'AGONISTE DU RECEPTEUR TP (U46619) VIA HYBRIDATION SUR UN DAMIER A ADN</u>	41
III.2.1 CONDITIONS DE STIMULATION DES CELLULES ENDOTHELIALES	42
III.2.2 EXTRACTION D'ARNM.....	42
III.2.3 TRANSCRIPTION INVERSE	43
III.2.4 HYBRIDATION DES ADN CIBLES BIOTINYLES	43
III.2.5 RESULTATS	44
III.2.6 DISCUSSION.....	46

<u>III.3 CONFIRMATION DES RESULTATS OBTENUS AU COURS DES HYBRIDATIONS PAR PCR EN TEMPS REEL</u>	50
III.3.1 EXTRACTION D'ARNm ET RETROTRANSCRIPTION.....	50
III.3.2 MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	51
III.3.3 RESULTATS.....	51
III.3.4 DISCUSSION.....	53

4. Conclusion et perspectives

5. Bibliographie

6. Annexes

- Bandman, O., Coleman, R.T., Loring, J.F., Seilhamer, J.J. and Cocks, B.G. (2002) Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci*, **975**, 77-90.
- Basu, S. (1998) Metabolism of 8-iso-prostaglandin F₂α. *FEBS Lett*, **428**, 32-36.
- Brunetti, L., Orlando, G., Michelotto, B., Recinella, L., Di Nisio, C., Ciabattini, G. and Vacca, M. (2002) Identification of 8-iso-prostaglandin F₂α in rat brain neuronal endings: a possible marker of membrane phospholipid peroxidation. *Life Sci*, **71**, 2447-2455.
- Busse, R. and Fleming, I. (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*, **33**, 181-194.
- Collins, T. (1993) Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*, **68**, 499-508.
- Collins, T. (1996) Elements of vascular pathobiology. In Alphonse E. Sirica, M.S., Ph.D. (ed.), *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Lippincott-Raven, pp. p125-155.
- Conner, S.D. and Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- Cracowski, J.L., Camus, L., Durand, T., Devillier, P., Guy, A., Hardy, G., Stanke-Labesque, F., Rossi, J.C. and Bessard, G. (2002a) Response of rat thoracic aorta to F(2)-isoprostane metabolites. *J Cardiovasc Pharmacol*, **39**, 396-403.
- Cracowski, J.L., Devillier, P., Durand, T., Stanke-Labesque, F. and Bessard, G. (2001) Vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res*, **38**, 93-103.
- Cracowski, J.L., Durand, T. and Bessard, G. (2002b) Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 360-366.
- Cranshaw, J.H., Evans, T.W. and Mitchell, J.A. (2001) Characterization of the effects of isoprostanes on platelet aggregation in human whole blood. *Br J Pharmacol*, **132**, 1699-1706.
- Crossman, D.C., Carr, D.P., Tuddenham, E.G., Pearson, J.D. and McVey, J.H. (1990) The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem*, **265**, 9782-9787.
- D.J.Rader, M.D., J.M. Wilson, M.D., Ph.D. (1995) Gene therapy for lipid disorders. In E.Haber (ed.), *Molecular cardiovascular medicine*, pp. 97-114.
- Demuth, K., Myara, I. and Moatti, N. (1995) [Biology of the endothelial cell and atherogenesis]. *Ann Biol Clin (Paris)*, **53**, 171-191.

- Elghozi, J.L. and Duval, D. (1987) *Aide mémoire de pharmacologie*. Flammarion.
- Fontana, L., Giagulli, C., Minuz, P., Lechi, A. and Laudanna, C. (2001) 8-Iso-PGF₂ alpha induces beta 2-integrin-mediated rapid adhesion of human polymorphonuclear neutrophils: a link between oxidative stress and ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 55-60.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109**, 81-96.
- Gniwotta, C., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd and Kuhn, H. (1997) Prostaglandin F₂-like compounds, F₂-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 3236-3241.
- Goligorsky, M.S., Li, H., Brodsky, S. and Chen, J. (2002) Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol*, **283**, F1-10.
- Gopaul, N.K., Nourooz-Zadeh, J., Mallet, A.I. and Anggard, E.E. (1994) Formation of F₂-isoprostanes during aortic endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett*, **348**, 297-300.
- Ishizuka, T., Kawakami, M., Hidaka, T., Matsuki, Y., Takamizawa, M., Suzuki, K., Kurita, A. and Nakamura, H. (1998) Stimulation with thromboxane A₂ (TXA₂) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol*, **112**, 464-470.
- Janssen, L.J. (2000) Isoprostanes: generation, pharmacology, and roles in free-radical-mediated effects in the lung. *Pulm Pharmacol Ther*, **13**, 149-155.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
- Kwek, K., Read, M.A., Khong, T.Y., Bisits, A.T. and Walters, W.A. (2001) Vasoactive effects of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) in isolated human placental conduit and resistance blood vessels in vitro. *Placenta*, **22**, 526-533.
- Leitinger, N., Huber, J., Rizza, C., Mechtcheriakova, D., Bochkov, V., Koshelnick, Y., Berliner, J.A. and Binder, B.R. (2001) The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *Faseb J*, **15**, 1254-1256.
- Libby, P. (2002) Les maladies cardio-vasculaires. *Pour la science*, **296**, 60-67.
- Luscher, T.F. and Barton, M. (1997) Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, **20**, II-3-10.
- M. Krieger, P.D. (1995) Lipoprotein receptor and atherosclerosis. In Haber, E. (ed.), *Molecular cardiovascular medicine*, pp. 31-47.
- Massy, Z.A. and Keane, W.F. (1996) Pathogenesis of atherosclerosis. *Semin Nephrol*, **16**, 12-20.

- McGrath, L.T., Dixon, L., Morgan, D.R. and McVeigh, G.E. (2002) Production of 8-epi prostaglandin F(2alpha) in human platelets during administration of organic nitrates. *J Am Coll Cardiol*, **40**, 820-825.
- Mehrabi, M.R., Serbecic, N., Ekmekcioglu, C., Tamaddon, F., Ullrich, R., Sinzinger, H. and Glogar, H.D. (2001) The isoprostane 8-epi-PGF(2alpha) is a valuable indicator of oxidative injury in human heart valves. *Cardiovasc Pathol*, **10**, 241-245.
- Michiels, C. (2003) Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology*, **sous presse**.
- Minuz, P., Andrioli, G., Degan, M., Gaino, S., Ortolani, R., Tommasoli, R., Zuliani, V., Lechi, A. and Lechi, C. (1998) The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1248-1256.
- Minuz, P., Gaino, S., Zuliani, V., Tommasoli, R.M., Benati, D., Ortolani, R., Zancanaro, C., Berton, G. and Santonastaso, C.L. (2002) Functional role of p38 mitogen activated protein kinase in platelet activation induced by a thromboxane A2 analogue and by 8-iso-prostaglandin F2alpha. *Thromb Haemost*, **87**, 888-898.
- Moore, K.P., Darley-Usmar, V., Morrow, J. and Roberts, L.J., 2nd. (1995) Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res*, **77**, 335-341.
- Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F. and Roberts, L.J., 2nd. (1990) A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9383-9387.
- Morrow, J.D. and Roberts, L.J., 2nd. (1996) The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol*, **51**, 1-9.
- Murakami, T., Mataka, C., Nagao, C., Umetani, M., Wada, Y., Ishii, M., Tsutsumi, S., Kohro, T., Saiura, A., Aburatani, H., Hamakubo, T. and Kodama, T. (2000) The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor alpha using DNA microarray analysis. *J Atheroscler Thromb*, **7**, 39-44.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. and Ushikubi, F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, **79**, 1193-1226.
- Nofer, J.R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G. and von Eckardstein, A. (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, **161**, 1-16.
- O'Neill, L.A. (1995) Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1. *Biochim Biophys Acta*, **1266**, 31-44.
- Patrino, C. and FitzGerald, G.A. (1997) Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2309-2315.

- Pratico, D. (1999) F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis*, **147**, 1-10.
- Pratico, D., Iuliano, L., Mauriello, A., Spagnoli, L., Lawson, J.A., Rokach, J., Maclouf, J., Violi, F. and FitzGerald, G.A. (1997) Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, **100**, 2028-2034.
- Pratico, D., Lawson, J.A., Rokach, J. and FitzGerald, G.A. (2001) The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 243-247.
- Pratico, D., Smyth, E.M., Violi, F. and FitzGerald, G.A. (1996) Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem*, **271**, 14916-14924.
- Pryor, W.A., Stanley, J.P. and Blair, E. (1976) Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, **11**, 370-379.
- Reilly, Delanty, Tremoli, Rader, Fitzgerald (1996) Elevated levels of 8-epi prostaglandin F_{2α}, in familial hypercholesterolemia : evidence of oxidative stress in vivo. *Circulation*, **94** (suppl I):I-638.
- Roberts, L.J., 2nd and Morrow, J.D. (1997) The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta*, **1345**, 121-135.
- Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.W., Adiyaman, M., Lawson, J.A. and FitzGerald, G.A. (1997) The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins*, **54**, 823-851.
- Ross, R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*, **314**, 488-500.
- Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, **57**, 791-804.
- Salvyre, R., Auge, N., Benoist, H. and Negre-Salvyre, A. (2002) Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1585**, 213-221.
- Shen, R.F. and Tai, H.H. (1998) Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci*, **5**, 153-172.
- Subbanagounder, G., Watson, A.D. and Berliner, J.A. (2000) Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1751-1761.
- Talbert, R.L. (1997) Hyperlipidemia. In DiPiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G. and Posey, L.M. (eds.), *Pharmacotherapy A pathophysiologic Approach*, pp. 459-490.
- Tedgui, A. and Mallat, Z. (2001) Athérosclérose et inflammation. *médecine-sciences*, **17**, 162-169.

- Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H. and Coffman, T.M. (1998) Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin Invest*, **102**, 1994-2001.
- Thompson, M.W., Mc Innes, R.R. and Willard, H.F. (1995) Génétique médicale. *Médecine-science Flammarion*, 463.
- Voutilainen, S., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd, Alfthan, G., Alho, H., Nyysönen, K. and Salonen, J.T. (1999) Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1263-1266.
- Wang, N., Verna, L., Hardy, S., Forsayeth, J., Zhu, Y. and Stemerman, M.B. (1999) Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 2078-2084.
- Wilson, S.H., Best, P.J., Lerman, L.O., Holmes, D.R., Jr., Richardson, D.M. and Lerman, A. (1999) Enhanced coronary vasoconstriction to oxidative stress product, 8-epi-prostaglandinF₂ alpha, in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*, **44**, 601-607.
- Witztum, J.L. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, **88**, 1785-1792.
- Woolf N., Pathology – Basic and Systemic, Ltd, W.S.C., 1998.