

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de certains aspects morphologiques de la liaison des lipoprotéines de faible densité aux cellules endothéliales humaines en culture

Absil, Anne-bénédicte

Award date:
1986

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1986



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDE DE CERTAINS ASPECTS MORPHOLOGIQUES
DE LA LIAISON DES LIPOPROTEINES
DE FAIBLE DENSITE AUX CELLULES
ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE

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

Anne-Bénédicte ABSIL

Arrivée au terme de ce travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Mes remerciements vont d'abord à Madame Ronveaux, promoteur de ce mémoire pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie ensuite tous les membres de l'unité de Cytologie pour l'ambiance de travail agréable qu'ils ont toujours maintenue durant cette année.

Un merci tout spécial à Yves et Isabelle pour leur disponibilité.

Que messieurs Y. Houbion, J. Collet, T. Coche, mesdames N. Fievet, C. Devignon, A. van Vyve trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

Merci, également, au personnel de la maternité Provinciale de Namur.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et toute ma famille qui, par leur attitude à mon égard, ont contribué pour une large part à l'aboutissement de ces quatre années d'étude.

TABLE DES MATIERES

1. Préliminaire.	1
2. But du travail proprement dit.	
INTRODUCTION	
1. La cellule endothéliale humaine en culture	2
1.1. Structure des cellules endothéliales <i>in vitro</i>	
1.1.1. Structure en microscopie à contraste de phase	
1.1.2. Structure des cellules endothéliales en microscopie électronique	
1.2. Identification des cellules endothéliales.	4
1.2.1. Identification en MO à fluorescence de l'antigène du facteur VIII de la coagulation.	
1.2.2. Identification en microscopie électronique à transmission	
1.3. Fonction de l'endothélium <i>in vivo</i> .	5
2. Les lipoprotéines de faible densité	6
2.1. Origine des LDL	
2.1.1. Transport des graisses	
2.1.2. Classes des lipoprotéines	
2.2. Description des LDL	
2.2.1. Définition	
2.2.2. Structure	7
2.3. Les récepteurs des LDL	
2.3.1. Remarque préliminaire	
2.3.2. Caractéristiques des récepteurs de LDL	
2.3.2.1. Structure des récepteurs	8
2.3.2.2. Régulation	
2.3.2.3. Interaction des LDL avec les récepteurs	
2.4. Métabolisme des LDL	10
2.4.1. Transport membranaire des macromolécules	
2.4.1.1. Endocytose fluide ou pinocytose ou endocytose non induite	11
2.4.1.2. Endocytose adsorptive ou induite	
2.4.1.3. Différence entre ces deux voies	12
2.5. Facteurs influençant le mode d'endocytose <i>in vitro</i>	13
2.5.1. Influence du stade de la croissance cellulaire	14
2.5.2. Influence de la concentration en LDL	
MATERIEL ET METHODES	
1. Cellules endothéliales humaines en culture	
1.1. Culture des cellules endothéliales	17
1.1.1. Mise en culture	
1.1.2. Changement de milieu	
1.1.3. Repiquage	
1.2. Technique de caractérisation des cellules endothéliales	18
1.2.1. Microscopie à contraste de phase	
1.2.2. Mise en évidence de l'antigène du facteur VIII de la coagulation	
2. Préparation des lipoprotéines de faible densité (LDL)	19
2.1. Purification des LDL	
2.2. Caractérisation des fractions	20
2.2.1. Dosage du cholestérol total	
2.2.2. Dosage des protéines	21
2.3. Validité des LDL	
3. Couplage des LDL à l'or colloïdal	22
3.1. Préparation de l'or colloïdal	
3.2. Préparation du conjugué	

3.3 Mesure du diamètre des particules d'or colloïdal	23
3.4. Etude du conjugué par coloration négative	
3.4.1. Principe	
3.4.2. Protocole	
4. Incubation du conjugué avec les cellules endothéliales.	24
4.1. Préincubation des cellules endothéliales à confluence avec du LPDS.	
4.2. Incubation des cellules endothéliales avec les LDL	
5. Préincubation pour l'étude des cellules endothéliales en TEM	24
5.1. Préparation des sections ultrafines	
5.1.1 Fixation	
5.1.2. Postfixation, déshydratation et enrobage	
5.1.3. Coupe et coloration	
5.2. Préparation des répliques	26
5.2.1. Rinçage et déshydratation	
5.2.2. Préparation des cellules endothéliales pour l'utilisation de la technique de point critique	
5.2.3. Formation de la réplique	
5.2.4. Récupération de la réplique	
6. Etude de l'effet de la concentration en conjugué sur la liaison des LDL aux cellules endothéliales	27
6.1. Etude des sections ultrafines	
6.2. Etude des répliques de surface	28
6.2.1. Observation au TEM	
6.2.2. Observation et comptage des particules sur les photos	

RESULTATS

1. Culture de cellules endothéliales	29
1.1. Mise en culture	
1.2. Caractérisation en microscopie optique	
1.2.1. Microscopie optique à contraste de phase	
1.2.2. Microscopie optique à fluorescence	
1.3. Caractérisation en microscopie électronique	30
1.3.1. Sections transversales	
1.3.2. Sections sagittales	31
1.3.3. Caractérisation des répliques	32
1.3.3.1. Aspect des cellules fixées sans tétroxyde d'osmium	
1.3.3.2. Aspect des cellules post-fixées avec du tétroxyde d'osmium	
2. Les lipoprotéines de faible densité	
2.1. Le gradient	33
2.2. Les dosages de protéines et de cholestérol	
2.3. Observation des LDL en coloration négative	
3. La solution d'or colloïdal	
3.1. Mesure de la taille des particules d'or	
4. Le conjugué LDL-Or	34
4.1. Dosage des protéines du conjugué	
5. Liaison du conjugué à la surface cellulaire	
5.1. Observation des sections sagittales en TEM	
5.2. Observation des répliques	35
5.2.1. Aspect morphologique	
5.2.2. Etude de la répartition des amas à la surface cellulaire	37
5.3. Etude de la liaison des LDL aux cellules endothéliales en culture en	

fonction de la concentration en conjugué

5.3.1. Influence de la concentration en conjugué sur le nombre de particules d'or liées à la surface cellulaire

5.3.2. Influence de la concentration en conjugué sur la taille des amas

DISCUSSION

1. Culture de cellules endothéliales	39
1.1. Mise en culture	
1.2. Caractérisation des cellules endothéliales en microscopie optique.	
1.2.1. Microscopie optique à contraste de phase	
1.2.2. Microscopie optique à fluorescence	
1.3. Caractérisation des cellules endothéliales en TEM	
1.3.1. Section transversale	
1.3.2. Section sagittale	41
1.3.3. Caractérisation des répliques	
2. Les lipoprotéines de faible densité	43
2.1. Le gradient de densité	
2.2. Dosage du cholestérol et des protéines	44
2.3. Observation des LDL en coloration négative	
2.4. Influence de l'ultracentrifugation	45
3. La solution d'or colloïdal	
3.1. Mesure de la taille des particules	
3.2. Propriétés et caractérisation de l'or colloïdal	47
4. Le conjugué LDL-or.	
4.1. Dosage des protéines du conjugué	
4.2. Observation du conjugué en coloration négative	
5. Liaison du conjugué à la surface cellulaire	49
5.1. Observation de la liaison en section sagittale	
5.2. Observation des répliques	52
5.2.1. Aspects morphologiques	
5.2.2. Etude de la répartition des amas à la surface cellulaire	55
5.2.3. Localisation des amas à la surface cellulaire	
5.3. Etude de la liaison des LDL à la surface cellulaire en fonction de la concentration en conjugué	58
5.3.1. Effet de la concentration en conjugué sur le nombre de particules d'or liées à la surface cellulaire	
5.3.2. Influence de la concentration en conjugué sur la taille des amas	60

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Liste des abréviations.

BHT :	butylated hydroxytoluen
BSA :	bovin sérum albumin
CE :	cellule endothéliale
ECGF :	endothelial cell growth factor
EDTA :	éthylène diamine tétraacétate
FGF :	fibroblasts growth factor
HDL :	lipoprotéines de haute densité
KBr :	bromure de potassium
LDL :	lipoprotéine de faible densité
LP :	lipoprotéine
LPDS :	sérum déficient en lipoprotéines
MP :	membrane plasmique
NaCl :	chlorure de sodium
NaClO :	hypochlorite de sodium
NBS :	sérum de veau nouveau-né
PBS :	"phosphate buffer saline"
REL :	réticulum endoplasmique lisse
RER :	réticulum endoplasmique rugueux
TEM :	transmission électron microscopy
VHDL :	lipoprotéine de très haute densité
VLDL :	lipoprotéine de très faible densité
WPB :	corps de Weibel-Palade

INTRODUCTION

I. PRELIMINAIRES.

L'endothélium des vaisseaux sanguins offre une barrière naturelle à l'infiltration de toute substance indésirable dans les tissus sous-jacents et contrôle le passage des grosses molécules à travers les couches internes de leur paroi.

Toute altération de cet endothélium pourrait donc entraîner des modifications importantes de l'intima et/ou de la média du vaisseau. De telles lésions ont, par ailleurs, été impliquées dans la pathogénèse de l'athérosclérose (Ross, 1981).

Le développement des lésions athéroscléroseuses, limitées à l'intima d'un vaisseau artériel, se caractérise essentiellement par la prolifération des cellules musculaires lisses provenant de la média, par l'augmentation de la matrice interstitielle et par l'accumulation de cholestérol intra- et extra-cellulaire. De nombreuses observations confirment le fait que presque tout le cholestérol provient des lipoprotéines plasmatiques, en particulier, des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Wiklund et al., 1985).

Ces deux éléments ont été déterminants pour l'Unité de Cytologie dans l'orientation de la recherche sur l'athérosclérose et dans son choix d'étudier l'interaction des LDL avec les cellules endothéliales humaines.

2. BUT DU TRAVAIL PROPREMENT DIT.

Dans le but d'étudier le rôle précis des modifications de l'état physico-chimique de la membrane plasmique dans ces interactions existant entre les LDL et les cellules endothéliales (CE), l'un d'entre nous, Y. Poumay a réalisé la mise en culture de cellules endothéliales humaines et caractérisé le métabolisme des LDL dans ces cellules (Poumay and Ronveaux-Dupal, 1985).

L'étude de ce métabolisme comporte plusieurs étapes à savoir: la liaison des LDL à la membrane plasmique (MP), leur internalisation dans les vésicules cytoplasmiques et leur dégradation dans les lysosomes de cette cellule.

La liaison des LDL à la MP constitue un aspect intéressant de ce métabolisme. Cette liaison peut être analysée soit par radioiodination des LDL et mesure de la quantité de ^{125}I -LDL liées à la membrane, soit par l'étude de coupes ultrafines de cellules incubées en présence d'un conjugué

or colloïdal-LDL.

Malheureusement, aucune de ces techniques ne peut apporter d'information sur la distribution topographique des récepteurs sur la membrane cellulaire. Les répliques de surface permettent l'observation d'une grande surface de membrane. En 1982, Robenek a mis au point la technique de réplique de surface en conjonction avec le marquage à l'or colloïdal (Robenek, 1982), technique qui permet de remédier en partie aux lacunes précitées.

Dans ce travail, nous souhaitons réaliser, à l'aide de la technique de réplique de surface, une étude qualitative et si possible quantitative de la liaison des LDL à la membrane cellulaire des CE humaines en culture afin d'en préciser la distribution topographique, d'en visualiser le rassemblement en agrégats, d'en apprécier les variations dans le nombre et le type d'agrégats et de tester la possibilité de leur répartition préférentielle dans certaines régions de la surface membranaire / ceci en fonction de différentes concentrations en LDL et à 4° C, ce qui exclut toute internalisation des complexes LDL-récepteur.

1. LA CELLULE ENDOTHELIALE HUMAINE EN CULTURE.

1.1. STRUCTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES IN VITRO.

1.1.1. Structure en microscopie à contraste de phase.

La structure des cellules endothéliales (CE) de la veine ombilicale humaine a été bien étudiée par Haudenschild (Haudenschild et al., 1975).

Il en a donné une description depuis la mise en culture jusqu'au stade de confluence :

6 heures après la mise en culture, de petits groupes de 5 à 12 cellules fusiformes commencent à s'étaler sur la gélatine, leur noyau est ovale ou aplati.

Après 24 heures, les cellules occupent plus du double de leur surface originale, leur noyau est plus arrondi et montre deux nucléoles proéminents. Après 6 à 7 jours, la plupart des groupes ont atteint la confluence. Ils consistent en une monocouche de cellules polygonales de 35 μm X 50 μm d'une épaisseur de 4 μm (au niveau du noyau) et 0.7 μm (au niveau des prolongements) étroitement accolées présentant une disposition épithéloïde. Ces cellules ont la plupart des caractéristiques de l'endothélium *in vivo* (Haudenschild et al., 1976).

1.1.2. Structure des cellules endothéliales en microscopie électronique.

L'étude des sections transversales en microscopie électronique révèle l'architecture du cytoplasme. Une description parallèle à celle décrite ci-dessus a été réalisée par ces mêmes auteurs et complétée pour les cellules à confluence en 1984 (Haudenschild , 1984).

-Le noyau ellipsoïde ou légèrement arrondi est entouré d'un cytoplasme riche en organelles liés ou non à la membrane plasmique, de structures membraneuses et vésiculeuses et de ribosomes libres.

-Les vésicules pinocytotiques et "coatées" sont localisées au niveau des membranes, du côté "luminal" et aux zones de contact avec des cellules adjacentes.

Leur nombre varie considérablement selon les conditions de culture affectant l'activité pinocytotique des cellules.

-La périphérie consiste en de fins prolongements cellulaires qui s'interdigitent de manière complexe avec ceux des cellules voisines.

-Le cytosquelette comprend trois classes de filaments reliés entre eux

1.2.1. Identification en MO à fluorescence de l'antigène du facteur VIII de la coagulation.

Le facteur VIII:R de la coagulation participe à l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène de la membrane basale. Il possède également un antigène propre (VIII:R), complexe glycoprotéique synthétisé au niveau du foie, des CE, des mégacaryocytes et des plaquettes (Jaffe et al., 1973).

Le facteur de Von Willebrand peut être mis en évidence grâce à des anticorps couplés à la fluorescéine, et constitue un marqueur idéal des CE en culture.

1.2.2. Identification en microscopie électronique (ME) à transmission.

La ME révèle de nombreux granules en forme de batonnets limités par une membrane : les corps de Weibel-Palade (Weibel and Palade, 1964). Ces corps de $0.1 \times 3 \mu\text{m}$ contiennent 6 à 20 tubules d'environ 15 nm disposés longitudinalement. Leur nombre varie selon les endroits de la cellule. Ils sont observés après 6 heures de mise en culture et persistent après plusieurs repiquages.

1.3. FONCTION DE L'ENDOTHELIUM IN VIVO.

La structure géométrique continue de cette "membrane" ultrafine constituée d'une seule assise cellulaire justifie les deux fonctions de la barrière endothéliale.

-La propriété de thromborésistance, c'est à dire sa non-réactivité à l'état normal, avec les plaquettes sanguines et les facteurs de coagulation.

-La perméabilité sélective aux macromolécules permettant les échanges entre le sang circulant et les tissus sous-jacents.

2. LES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE (LDL).

2.1. ORIGINE DES LDL.

2.1.1. Transport des graisses.

Le système de transport des graisses peut être divisé en deux voies

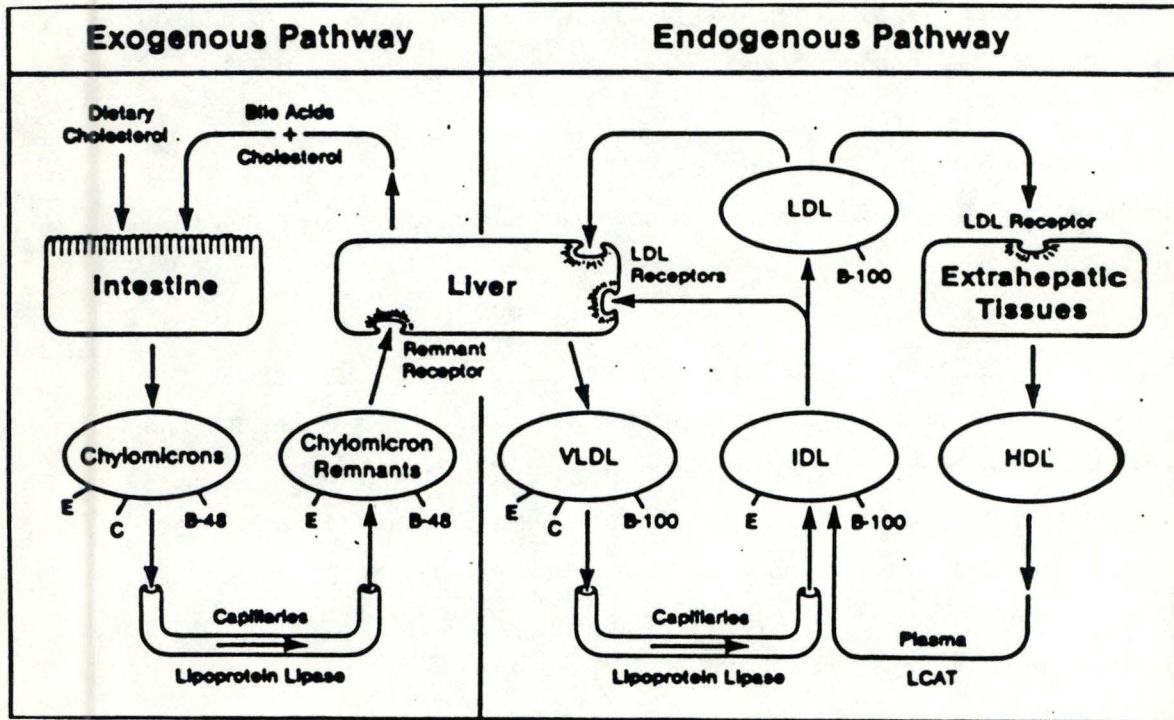


Figure 1 : système de transport des graisses

(Brown and Goldstein, 1984). (Figure 1)

Une voie exogène : le cholestérol alimentaire et biliaire est absorbé et rassemblé au niveau des cellules intestinales puis secrété sous forme de chylomicrons. Ceux-ci passent dans la circulation générale, libèrent leurs triglycérides au niveau des capillaires, des tissus musculaires et adipeux grâce à l'intervention d'un lipoprotéine lipase.

Le courant sanguin est débarrassé des "remnants" de chylomicrons qui se fixent à des récepteurs situés uniquement au niveau des cellules du foie.

Une voie endogène : le foie synthétise des VLDL qui passent dans la circulation générale, se libèrent de leurs triglycérides, deviennent des IDL qui pour une part sont enlevées de la circulation en se fixant aux récepteurs des LDL au niveau du foie; les IDL qui n'ont pas été incorporées séjournent dans la circulation plus longtemps et après avoir perdu leur apoprotéine-E, elles deviennent des LDL, très enrichies, proportionnellement, en esters de cholestérol. Ces LDL seront captées par des cellules extrahépatiques qui réexporteront vers le foie l'excès de cholestérol estérifié sous forme de HDL où il sera éliminé.

2.1.2. Classes des lipoprotéines.

Le métabolisme du cholestérol fait donc intervenir cinq grandes classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et les lipoprotéines de densité élevée (HDL).

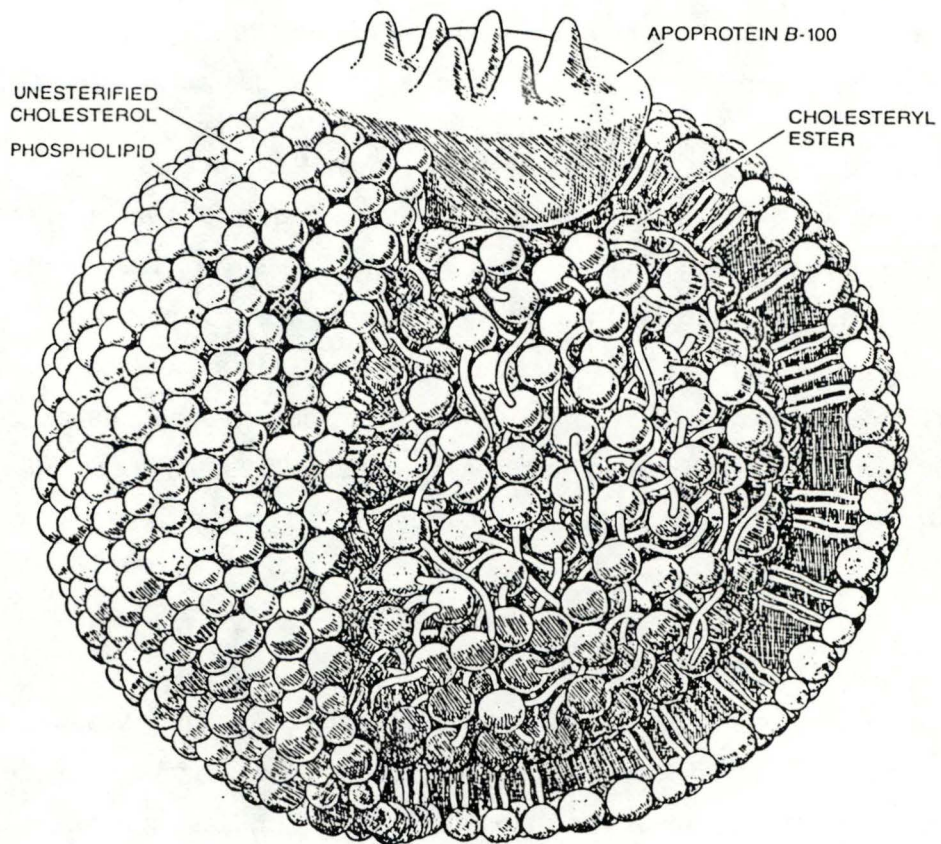
Ces lipoprotéines varient fortement en taille, composition lipidique et protéique mais semblent néanmoins avoir une structure générale similaire.

Nous aimerions, à présent, détailler les LDL qui constituent la classe des lipoprotéines que nous utiliserons dans ce travail.

2.2. DESCRIPTION DES LDL.

2.2.1. Définition.

Les lipoprotéines appelées LDL flottent après ultracentrifugation dans un gradient de densité, dans l'intervalle de densité 1.019-1.063 g/ml. En électrophorèse sur gel d'agarose, elles migrent avec les β -globulines d'où leur nom de β -lipoprotéines.



LDL, MAJOR CHOLESTEROL CARRIER in the bloodstream, is a spherical particle with a mass of three million daltons and a diameter of 22 nanometers (millionths of a millimeter). Its core consists of some 1,500 cholesteryl esters, each a cholesterol molecule attached by an ester linkage to a long fatty acid chain. The oily core is shielded from the aqueous plasma by a detergent coat composed of 800 molecules of phospholipid, 500 molecules of unesterified cholesterol and one large protein molecule, apoprotein B-100. When blood cholesterol is elevated, increasing the risk of atherosclerosis, the reason is almost always an increase in circulating LDL.

Figure 2: composition des LDL

2.2.2. Structure.

Les LDL sont des particules globulaires de 2 à 2.5 X 10⁶ daltons et d'environ 22 nm de diamètre, constituées de 75 % de lipides et de 25 % de protéines.

2.2.3. Composition.

Bien que de nombreux modèles aient été proposés, il est maintenant admis que ces particules sont constituées d'un core d'esters de cholestérol, chaque molécule étant attachée à une longue chaîne d'acide gras; ce "coat" gras est séparé du plasma par un "coat" de surface où l'on retrouve des phospholipides, du cholestérol libre et l'apoprotéine-B 100 synthétisée au niveau des hépatocytes (Brown and Goldstein, 1984). (Figure 2)

L'apoprotéine-B 100 d'un poids moléculaire de 500000 daltons comporte en fait plusieurs sous-unités de 8000 à 25000 daltons (plus fréquemment de 25000 daltons). Environ 5 à 9 % de cette apoprotéine-B 100 consiste en chaînes d'hydrates de carbone contenant du galactose, du mannose, de la glucosamine et des résidus d'acide sialique.

Les données que l'on possède concernent surtout la structure de l'apoprotéine-E, principale apoprotéine de la HDL, qui se lie également au récepteur des LDL (Innerness et al., 1978) : bien que l'apo-E et l'apo-B présentent une charge nette négative à pH physiologique, elles se lient néanmoins à des polyanions, telle l'héparine, suggérant que ces deux apoprotéines exposent des groupes de résidus basiques.

2.3. LES RECEPTEURS DE LDL.

2.3.1. Remarque préliminaire.

Laduron, en 1984, signale que le terme récepteur n'est pas toujours utilisé à bon escient, les "récepteurs" des LDL doivent plutôt être considérés comme sites accepteurs. Pour Laduron, et dans un contexte de neuro-transmetteurs, le principal critère distinctif entre un récepteur et un site accepteur est que la liaison du ligand entraîne une réponse physiologique: la transmission d'un signal.

Un site accepteur est seulement un site de liaison et la fixation d'un ligand n'entraîne pas la transmission d'un signal.

D'autres critères de spécificité sont signalés et sont applicables aussi bien

au récepteur qu'au site accepteur : haute affinité, saturabilité, réversibilité et stéréospécificité. (Laduron, 1984)

Toute la littérature traitant de l'endocytose des LDL par un mécanisme de haute affinité parle d'endocytose médiée par récepteur. Nous parlerons donc de récepteur sachant qu'au sens strict ce sont des accepteurs.

2.3.2. Caractéristiques des récepteurs de LDL.

2.3.2.1. Structure des récepteurs.

Le récepteur de LDL humain est une glycoprotéine transmembranaire synthétisée sur le réticulum endoplasmique rugueux, glycosylée dans le complexe golgien et incorporée au hasard dans la MP (Anderson et al., 1978).

La séquence des nucléotides d'un cDNA cloné de 5.3 Kb codant pour le récepteur de LDL humain révèle 5 domaines dans cette protéine de 839 acides aminés (AA) (Yamamoto et al., 1984; Goldstein and Brown, 1985).

- Une région sur le plasmalemme externe comprenant trois domaines :

1. Un domaine de 322 AA-NH₂ terminal incluant une région riche en résidus cystéine liés par des ponts disulfures et 8 exemplaires de 40 résidus qui peuvent supporter les sites de liaison pour les LDL.
2. Un domaine de 350 AA homologue à celui de EGF (facteur de croissance épithélial) de souris.
3. Des séquences d'AA qui servent de sites d'attachement pour les chaînes d'hydrocarbure liées à l'asparagine (liaison-N) et à la sérine/thréonine (liaison-O).

- Un domaine transmembranaire de 22 AA hydrophobes.

- Un domaine cytoplasmique contenant 55 AA-COOH terminal qui dirige le récepteur vers ses propres sites de fonction dans la cellule.

2.3.2.2. Régulation.

Les récepteurs de LDL sont présents à la surface de pratiquement toutes les cellules humaines et animales, leur nombre varie d'un type cellulaire à l'autre, les cellules hépatiques et stéroïdiennes en sont les plus pourvues.

Ce nombre peut même varier avec le stade de croissance de l'animal et dans certaines conditions physiologiques. Ceci implique que le métabolisme des LDL via les récepteurs varie selon les tissus et que d'autre part, le rôle du cholestérol dans la régulation du métabolisme varie de la même manière (Brown and Goldstein, 1976)

En condition physiologique, plus les besoins en cholestérol seront élevés, plus la cellule synthétisera de récepteurs; plus ses besoins seront restreints, plus le cholestérol s'accumulera dans le sang circulant et prédisposera à la formation de plaques athéromateuses.

In vitro, une incubation des cellules avec du LPDS stimule la cellule qui synthétise un plus grand nombre de récepteurs.

2.3.2.3. Interaction des LDL avec les récepteurs.

Le récepteur reconnaît de manière spécifique le ligand : des études de Bersot (Bersot et al., 1976) sur les fibroblastes ont montré que le groupement e-amino lysine des LDL était essentiel pour sa liaison aux récepteurs de haute affinité.

D'autres facteurs, tels la configuration de surface, la conformation des apoprotéines, l'interaction de l'apoprotéine avec les lipides de la LDL, le contenu des lipoprotéines joueraient probablement un rôle au niveau de la détermination des interactions entre les lipoprotéines et les récepteurs.

D'après Pitas (Pitas et al., 1979), les HDLc (des HDL riches en triglycérides) et les LDL présenteraient une séquence structurale commune responsable de l'interaction lipoprotéine-récepteur.

Comme nous l'avons précédemment signalé, la séquence d'AA de l'apo-B n'est pas encore connue. Par contre, celle de l'apo-E a été déterminée et elle a permis de préciser la nature ionique de l'interaction entre le ligand, au niveau de son apoprotéine, et le récepteur. (Figure 3)

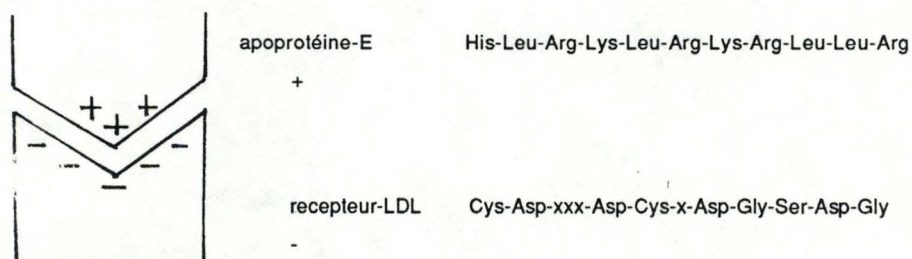
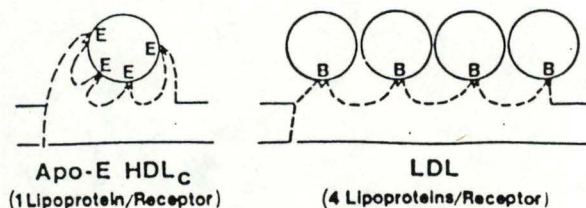


Figure 3: récepteur d'apoprotéine E

De nombreuses études biochimiques ont montré que l'affinité des HDL pour les récepteurs de LDL étaient 4 fois plus élevées que celle des LDL pour les mêmes récepteurs (Innery et al.; 1978). Dans leur état natif, les récepteurs de LDL existent en microagrégats, la liaison des LDL requièrent une migration des récepteurs pour permettre une interaction individuelle.

La paraformaldéhyde, en inhibant la migration latérale, diminue le nombre de LDL liées, elle n'a, par contre, aucun effet sur la liaison des HDLc aux récepteurs. Les études cinétiques et d'équilibre permettent d'établir les modèles suivants : Figure 4.



La liaison de la LDL au récepteur requiert certaines conditions :

- Les récepteurs doivent être suffisamment séparés ou mobiles pour permettre une interaction sans empêchement stérique.
- La liaison requiert des cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}).
- La liaison requiert des pH supérieurs à 6.5 (Basu et al., 1978).

L'internalisation du complexe est suivie d'une dissociation du récepteur et de la LDL de telle sorte qu'un recyclage du récepteur est possible : Basu et Goldstein ont observé qu'en faisant agir, sur des fibroblastes en culture, de la cycloheximide -un inhibiteur de la synthèse protéique- la liaison des LDL au récepteur durait encore plusieurs heures; pour ces auteurs, les récepteurs pourraient être réutilisés cent fois en 20 heures (Basu et al., 1981; Goldstein et al., 1979).

2.4. METABOLISME DES LDL.

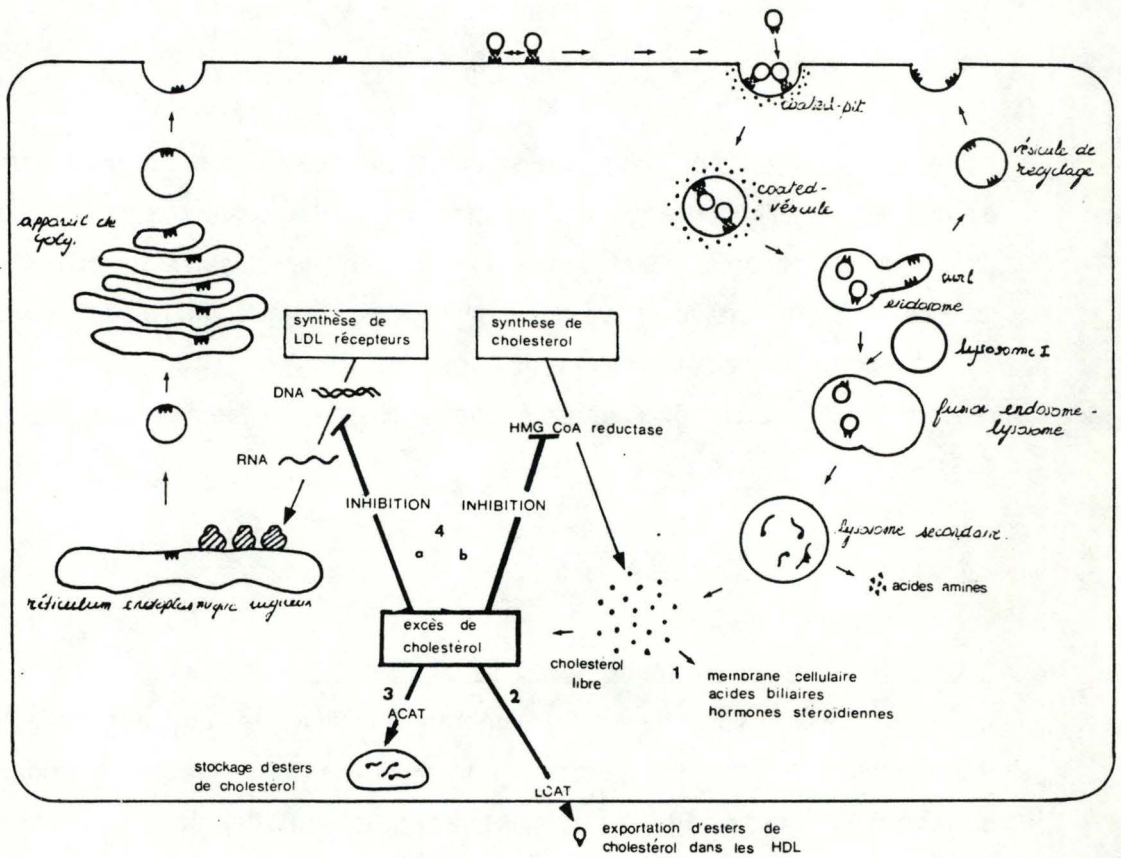
2.4.1. Transport membranaire des macromolécules.

La composition lipidique de la membrane cellulaire la rend imperméable à toute molécule chargée ainsi qu'aux molécules d'un poids moléculaire supérieur à 400 daltons. C'est pourquoi la cellule possède des caractéristiques qui lui permettent de réaliser l'endocytose dont les étapes générales sont : l'invagination de la membrane plasmique suivie de la formation d'une vésicule qui fusionne ultérieurement avec un lysosome où son contenu subit l'hydrolyse.

Endocytose fluide ou non induite:

Pour une cellule, et dans des conditions bien déterminées, la vitesse

ENDOCYTOSE ADSORPTIVE SPECIFIQUE DES LDL
MEDIÉE PAR RECEPTEURS.








-  LDL apo protéine B
-  LDL récepteur
-  ester de cholestérol
-  cholestérol libre
-  contenu des LDL

Figure 5: endocytose adsorptive ou induite

d'endocytose est constante, augmente avec le temps, et est fonction de la taille des macromolécules captées. De plus, ces molécules sont internalisées en fonction de leur concentration dans le milieu extérieur et non pas en fonction de leur importance métabolique pour la cellule.

Endocytose adsorptive ou induite:

Ce type d'endocytose est un mécanisme sélectif qui permet à la cellule d'intégrer un grand nombre de ligands sans devoir endocyter un volume de liquide extracellulaire correspondant.

2.4.1.1. Endocytose fluide ou pinocytose vraie ou endocytose non induite.

Mahley et Innerarity pensent qu'il pourrait s'agir d'interaction ionique entre les groupes d'AA des apo-B chargés positivement et la charge négative des sites au niveau de la membrane (Malhey and innerarity, 1983).

Du fait de cette nature non spécifique, l'affinité de liaison est généralement faible et la saturation est obtenue pour des concentrations élevées en LDL. D'autre part, étant donné le mécanisme de concentration des LDL sur la membrane, leur incorporation est plus élevée que par pinocytose et elle est proportionnelle à la surface d'internalisation de la membrane et à la densité des sites de liaison.

2.4.1.2. Endocytose adsorptive ou induite.

Cette voie a été décrite pour la première fois dans les fibroblastes en culture par Goldstein and Brown, en 1974, et elle est applicable pour les cellules endothéliales (Stein and Stein, 1976). (Figure 5)

-La liaison spécifique des apo-B avec les récepteurs de la cellule peut se dérouler soit directement au niveau des récepteurs des "coated-pits", soit au niveau des récepteurs dispersés dans la membrane suivie d'une migration du complexe vers les "coated-pits".

-internalisation du complexe LDL-récepteur obligatoirement dans une vésicule "coatée".

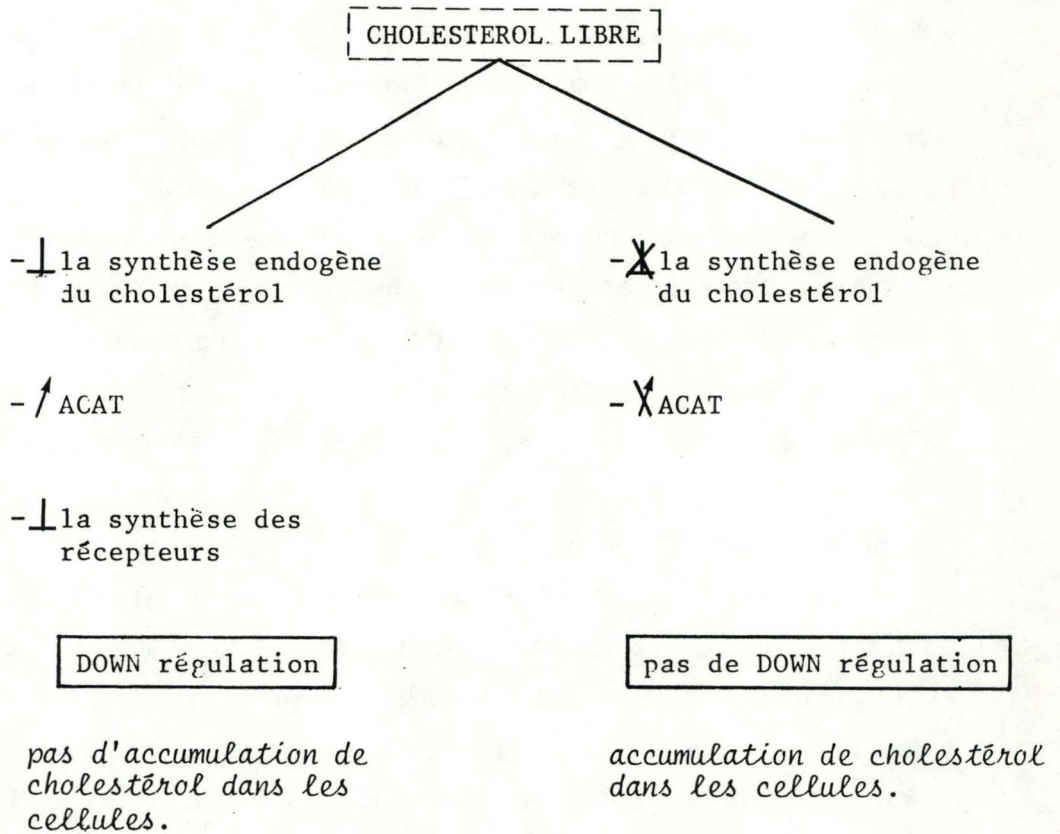
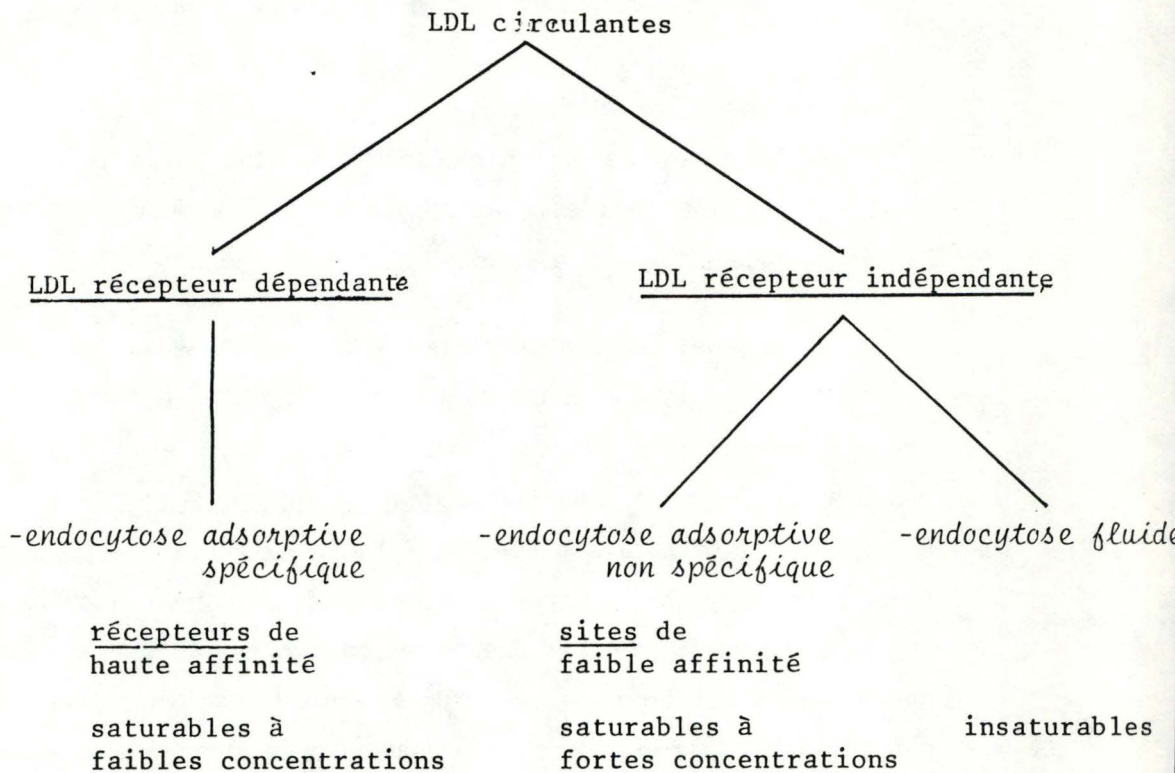
-perte du coat de clathrine.

-fusion de multiples vésicules d'endocytose en endosomes.

-dissociation du complexe avec recyclage du récepteur dans un "curl"(compartimental uncoupled receptor ligand).

-fusion de l'endosome avec un lysosome primaire et formation d'un lysosome secondaire, où les apoprotéines sont hydrolysées en AA et le cholestérol estérifié, en cholestérol libre et en acides gras par une

LES VOIES D'ENDOCYTOSE POUR LES LDL.



cholestérylestérase acide.

-Le cholestérol libre peut alors sortir des lysosomes où trois voies métaboliques lui sont ouvertes :

1. utilisation du cholestérol pour les synthèses cellulaires: membranaires, acides biliaires (cellules hépatiques), hormones stéroïdiennes (cellules surrénaliennes et gonadiennes).

Le cholestérol en excès :

2. est exporté par la cellule en étant intégré à une molécule de HDL après réestérification par une enzyme membranaire : la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT).
3. est emmagasiné dans le cytoplasme sous forme d'esters de cholestérol après réestérification par une enzyme cytoplasmique : l'acyl Coenzyme A cholestérol acyl transférase (ACAT). Les esters de cholestérol mis en réserve peuvent être réutilisés par la cellule pour être hydrolysés soit au niveau des lysosomes (cholestérol estérase acide) soit au niveau du cytoplasme (cholestérol estérase neutre).

Les besoins en cholestérol sont auto-régulés de manière à ce que le cholestérol ne s'accumule ni dans les lysosomes ni dans le cytoplasme.

En effet, le cholestérol en excès :

- supprime la synthèse endogène de cholestérol en inhibant l'hydroxyméthyl glutaryl CoA reductase (HMG CoA reductase).
- inhibe la synthèse de nouveaux récepteurs.

2.4.2.3. Différences entre ces deux voies.

Selon la voie d'endocytose utilisée, l'action du cholestérol sera différente :

voir schéma ci-contre

2.5 FACTEURS INFLUENÇANT LE MODE D'ENDOCYTOSE IN VITRO.

2.5.1. Influence du stade de la croissance cellulaire.

1° endocytose adsorptive :

Fielding et al., en 1979, ont étudié le métabolisme des LDL sur les cellules endothéliales d'aorte bovine en présence de facteurs de croissance FGF (Fibroblasts Growth Factor). Il ressort de leurs études, qu'à confluence, l'internalisation des LDL médiée par récepteurs est fortement diminuée.

Ces auteurs postulent que la régulation principale du métabolisme du cholestérol *in vivo* ne se fait ni par des enzymes intracellulaires appropriés (ACAT-LCAT) ni par un contrôle en feed-back négatif du nombre de récepteurs de haute affinité, mais par la disposition particulière des cellules en inhibition de contact.

C'est cette disposition qui permettrait à l'endothélium des gros vaisseaux de fonctionner comme une barrière sélective face au taux important de LDL plasmatiques circulantes.

Gospodarowicz et al., en 1978, ont étudié les fibroblastes et décelé une accumulation massive de fibronectine dans les cellules à confluence qui pourrait réduire la mobilité des récepteurs à ce stade.

Coetzee et al., en 1979, ont effectué le même type d'étude sur le même type cellulaire et ont souligné que l'effet de la confluence sur la dégradation des LDL était moins important à forte concentration et dépendait d'un facteur de croissance.

D'autre part, ils ont décrit un effet limitant du FGF sur la dégradation des LDL pour les CE humaines.

Van Hinsberg et al., en 1983, ont réalisé des études sur les CE de cordon ombilical humain en présence et en absence de ECGF (un autre facteur de croissance spécifique des CE) (Maciag et al., 1979).

Ils montrent que l'ECGF diminue le métabolisme des LDL avec un effet plus marqué sur les cellules confluentes.

Il faut cependant noter que cette diminution est nettement moins importante que pour les CE d'aorte bovine.

En absence d'ECGF, le métabolisme des LDL est identique quel que soit le stade de croissance cellulaire. De plus, les interactions des LDL avec les récepteurs de faible affinité sont moins affectées par l'effet de confluence.

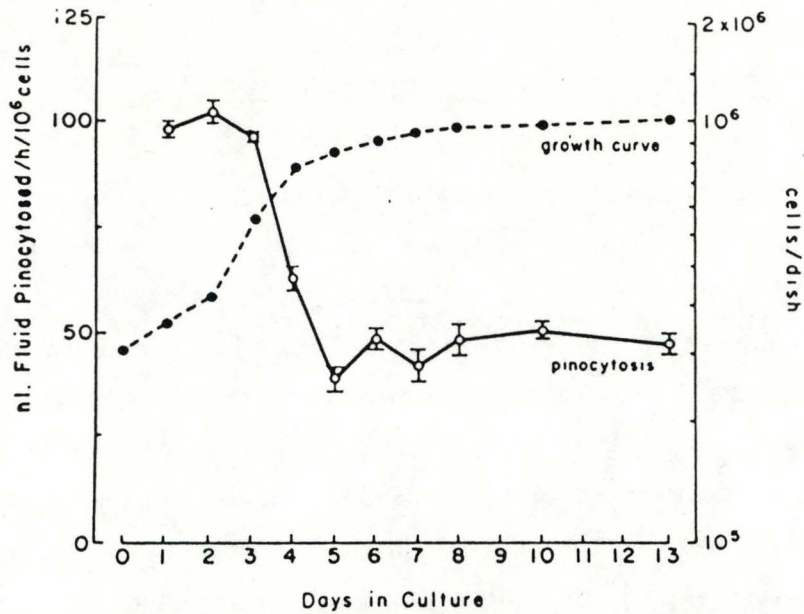


Fig. 1. Rate of pinocytosis at different stages of growth of endothelial cell cultures. Pinocytosis was measured during a 3-hour period on each day indicated. Each point is the mean of 4 determinations \pm 1 standard deviation of the mean. For the growth curve, cell numbers per 35 mm. diameter dish were measured at the same time each day. As seen by phase contrast microscopy, many cells were in contact with each other by day 3. On day 4, an entirely confluent monolayer had formed.

Figure 6: *taux de pinocytose et stade de croissance*

En conclusion de ces études, on peut dire que l'influence du stade de croissance sur le métabolisme des LDL *in vitro* dépend de l'espèce cellulaire envisagée, de la présence et du type de facteurs de croissance et de la concentration en LDL.

2° Endocytose fluide :

Davies et al., en 1980, ont établi des relations entre le taux de pinocytose et le stade de croissance. (Figure 6)

Il ressort de leurs études que le taux de pinocytose diminue avec la croissance cellulaire et se stabilise à confluence

2.5.2. Influence de la concentration en LDL.

Van Hinsberg et al., en 1983, ont étudié cet aspect d'un point de vue quantitatif en utilisant des ^{125}I -LDL. Leur étude portait sur des CE de l'artère ombilicale humaine.

L'endocytose totale a été mesurée à différentes concentrations. La forme curviligne de la relation indique la présence d'un phénomène saturable, responsable de l'inflexion et d'un phénomène insaturable.

La liaison des LDL avec les récepteurs de haute affinité est responsable du phénomène saturable.

Afin de mesurer l'importance du mécanisme spécifique affinité dans l'endocytose, par rapport au mécanisme non spécifique, Van Hinsberg a mesuré deux paramètres de l'endocytose : l'endocytose totale est mesurée en incubant les CE avec de faibles concentrations en I-LDL, l'endocytose non spécifique est mesurée en incubant les CE avec de faibles concentrations en ^{125}I -LDL et un excès de LDL natives.

La courbe de l'endocytose totale présente une partie linéaire pour les faibles concentrations en ^{125}I -LDL. Cette partie linéaire est à mettre en relation avec la rapidité d'interaction des LDL avec les récepteurs de haute affinité.

La contribution de l'interaction de haute affinité dans le phénomène général de l'endocytose peut être calculée en soustrayant de la quantité de I-LDL interagissant seul (endocytose totale), la quantité de I-LDL qui interagit en présence de LDL non marquées (endocytose non spécifique).

Ces auteurs ont également mesuré la contribution de l'interaction des LDL avec les sites de faible affinité en soustrayant de l'endocytose totale, l'endocytose adsorptive de haute affinité et l'endocytose fluide mesurée par

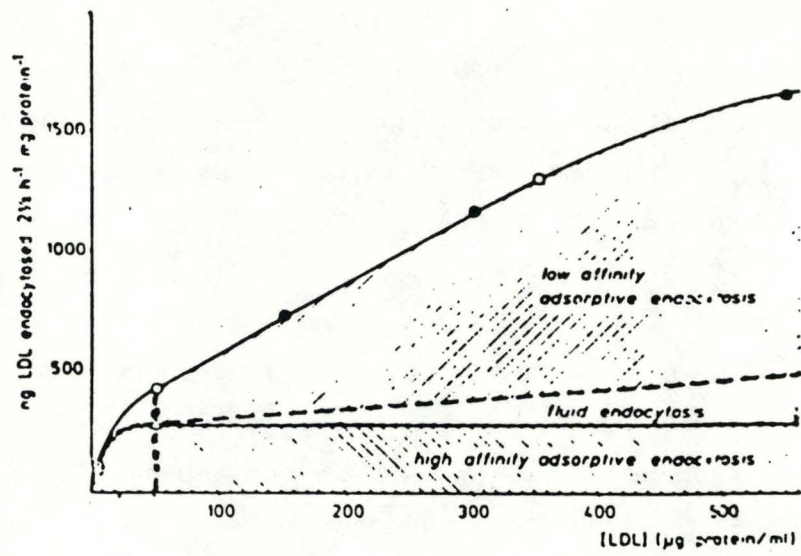


Figure 7: endocytose des LDL chez les cellules endothéliales

l'endocytose du saccharose.

Van Hinsberg remarque que plus la concentration en ^{125}I -LDL augmente, plus l'interaction due aux récepteurs de haute affinité augmente jusqu'à se stabiliser pour des concentrations de 50 $\mu\text{g/ml}$ en LDL (la saturation est de 90 % pour 20 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -LDL), au-delà, la part attribuable aux récepteurs de haute affinité reste constante et l'endocytose attribuable au site de faible affinité augmente.

Van Hinsberg a également montré qu'aux conditions physiologiques, c'est à dire pour des concentrations en LDL de 550 $\mu\text{g/ml}$, l'endocytose adsorptive de haute affinité représentait 17 %, l'endocytose adsorptive de faible affinité représentait 70 % et l'endocytose fluide représentait 12 %.

Nous savons que lorsque le cholestérol est endocyté de manière non spécifique, il n'y a pas de contrôle de l'entrée du cholestérol si bien que celui-ci s'accumule dans les cellules. On peut dès lors se demander pourquoi la cellule dispose d'un mécanisme qui lui permet de réguler l'entrée du cholestérol si ce mécanisme n'intervient que pour 17 % dans les conditions physiologiques. Il est important de rappeler ici, qu'*in vivo*, l'interaction des LDL avec les cellules se produit essentiellement par diacytose et donc que peu de cholestérol est retenu par les cellules. *In vitro*, ce phénomène de transcytose n'a pas été mis en évidence pour les raisons exposées précédemment (Vasile et al., 1983). Mais il semble que le type de régulation produit par les sites de faible affinité correspond à celui de la régulation produit par la diacytose, c'est à dire une absence de régulation en feed-back.

Une autre question survient alors : pourquoi étudier le métabolisme des LDL *in vitro* alors qu'il apparaît ne pas correspondre au mécanisme observé *in vivo* ?

Les études du métabolisme sur les CE en culture ont été entreprises en vue d'investiguer si une perturbation de la fonction endothéliale pouvait conduire à une altération du métabolisme des lipoprotéines au niveau vasculaire et au niveau corporel.

En effet, pour Van Hinsberg, l'implication active de l'endocytose dans l'accumulation lipidique de la paroi artérielle dépend de l'état fonctionnel de la cellule endothéliale.

Nous pensons que l'athérosclérose pourrait résulter d'une modification dans le mécanisme d'endocytose de la CE. Dans cette éventualité, il n'y aurait plus de transcytose normale mais une endocytose adsorptive spécifique et non spécifique prédominantes. De plus, il pourrait y avoir des modifications des LDL après leur passage dans les CE permettant aux macrophages de les capter, sans régulation en feed-back.

MATERIEL ET METHODES

1. CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE.

1.1 CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES.

1.1.1. Mise en culture.

Les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale sont régulièrement mises en culture selon la méthode de Jaffe (Jaffe et al., 1973).

Immédiatement après la délivrance, un morceau du cordon ombilical d'environ 25 cm de long est prélevé stérilement et placé à 4 °C dans un tampon appelé "Cord Buffer"*, jusqu'au moment où la manipulation commence. Un délai minimum de 24 heures entre le prélèvement et la mise en culture permet d'augmenter les pourcentages de réussite des cultures (Balconi et al., 1983).

Les boîtes de Pétri (Nunc, 60 mm) sont traitées à température de la pièce, pendant une heure environ avant la mise en culture, avec de la gélatine stérile (0,2 % dans de l'eau bidistillée).

La veine ombilicale est "canulée" avec un trocart et perfusée avec 40 ml de "Cord Buffer" à 37 °C afin d'éliminer le sang qu'elle contient.

Après avoir fermé l'autre extrémité, la veine est remplie sous une légère pression de collagénase (0,2 % dans du PBS) réchauffée à une température proche de 37°C, et incubée 15 minutes à cette température.

Après l'incubation, le contenu de la veine est récolté dans un tube à centrifuger à fond conique siliconé et stérile. La veine est ensuite reperfusée avec 20 ml de "Cord Buffer" qui sont également recueillis dans le même tube. Le tout est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 1000 tours/minute.

Le culot est alors resuspendu dans 5 ml de milieu M199* additionné de 20% de sérum de veau nouveau-né (NBS). La boîte de Pétri estensemencée et incubée à 37°C sous une atmosphère humide comprenant 95% d'air et 5% de CO₂.

1.1.2. Changement de milieu.

Le milieu de culture est changé 6 heures après la mise en culture, et par après, tous les deux jours.

1.1.3. Repiquage

Lorsque les cellules ont atteint la confluence, quatre à cinq jours après l'ensemencement (selon la densité cellulaire initiale), les boîtes sont rincées deux fois avec 2 ml de "tampon de rinçage" à température ambiante et incubées à 37 °C dans une solution contenant 2 ml de collagénase (0,2 % dans du tampon de rinçage) et 2 ml de BSA/EDTA (0.5 %/0.02 %) pendant 15 minutes environ jusqu'à ce que les cellules se décollent de la boîte.

Les cellules sont alors récoltées avec la solution d'incubation dans un tube à centrifuger; la boîte est rincée deux fois avec du M199 et le contenu est transvasé dans le tube; le tout est centrifugé 4 minutes à 1000 tours/minute.

Le culot est alors resuspendu dans 15 ml de M199 + 20 % de NBS pour un repiquage dans un rapport 1 à 3, et ensemencé dans 9 petites boîtes de Pétri (Nunc, 35 mm) préalablement traitées à la gélatine stérile.

Nous utilisons pour nos expériences les cellules à confluence issues de ce premier repiquage (stade de culture atteint environ 10 jours après l'ensemencement initial).

Toutes ces opérations doivent se dérouler dans des conditions de stérilité les plus strictes.

1.2 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES.

1.2.1. Microscopie à contraste de phase.

Les cellules sont observées quotidiennement au cours de la culture sous un microscope à contraste de phase.

1.2.2. Mise en évidence de l'antigène du facteur VIII de la coagulation.

1.2.2.1. Principe.

L'antigène associé au facteur VIII de la coagulation (facteur antihémophilique) peut être révélé par immunofluorescence grâce à un antisérum commercialisé.

1.2.2.2. Protocole.

Le marquage s'effectue sur des cellules à confluence ayant poussé sur un couvre-objet stérile placé dans la boîte de Pétri.

-Immerger le couvre-objet dans du PBS et effectuer 3 rinçages.

-Fixer les cellules avec une solution de formaldéhyde (paraformaldéhyde 3%

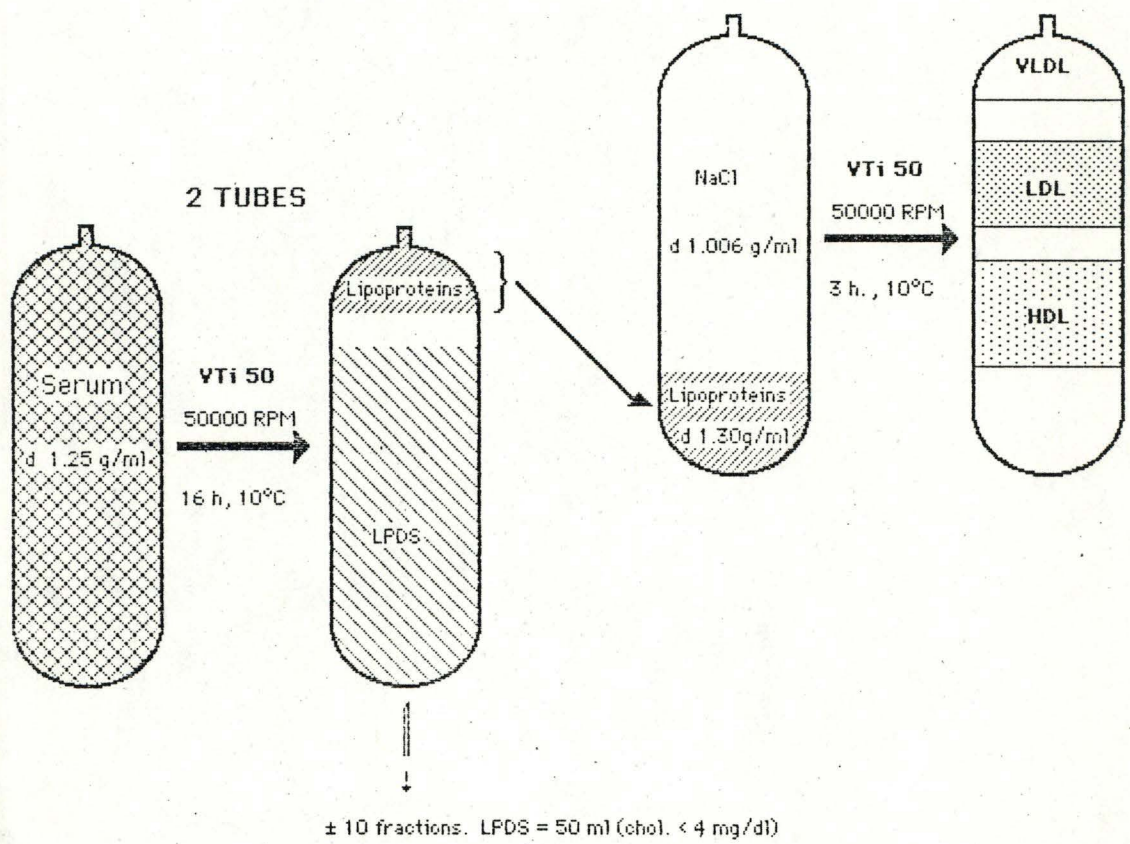


Figure 8: Purification des lipoprotéines du sérum
(Poumay and Ronveaux-Dupal)

- dans du PBS, 10 μ l CaCl_2 M et 10 μ l MgCl_2 M pour 100 ml de solution) pendant 20 minutes.
- Rincer rapidement avec du PBS.
 - Dans une chambre humide, déposer sur des morceaux de parafilm 25 μ l d'antisérum de lapin anti-facteur VIII humain dilué 50 x dans du PBS (Behringwerke A.G., W. Germany) pour le test, 25 μ l de PBS pour le contrôle.
 - Renverser le couvre-objet sur l'antisérum et incubé pendant 30 minutes.
 - Laver le couvre-objet deux fois avec du PBS/gélatine 0.2 % pendant 2 x 5 minutes.
 - Procéder de la même manière avec les globulines anti-lapin de chèvre conjuguées à la fluorescéine diluées 10 x.
 - Laver le couvre-objet deux fois avec du PBS/gélatine 0.2 % 2 x 5 minutes..
 - Monter le couvre-objet sur une lame dans une goutte de glycérol/PBS (90%/10%).
 - Observer rapidement au microscope à fluorescence.

Toutes ces manipulations se font à température ambiante.

2. PREPARATION ET CARACTERISATION DES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE (LDL).

2.1 PURIFICATION DES LDL.

Nous avons utilisé la méthode modifiée de Chung (Poumay and Ronveaux-Dupal, 1985). (Figure 8)

- 80 ml de sérum poolé frais ABO obtenus de 20 volontaires au Centre de la Croix Rouge sont centrifugés pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, afin d'éliminer un maximum de globules rouges.
- Le sérum, auquel on a ajouté du BHT 10 μ M, est ajusté à une densité de 1.25 g/ml avec du KBr solide et réparti dans deux tubes à centrifuger (Beckman, "Quick Seal", 25 X 89 mm) que l'on scelle à la chaleur.
- Ces tubes sont ensuite placés dans un rotor vertical Beckman VTI 50, et centrifugés à 10 °C pendant 16 heures à 50000 tours/minute dans une ultracentrifugeuse Beckman L5-65. Le frein est coupé en fin de décélération à 2000 tours/minute, de manière à permettre le rééquilibrage des couches.

- Après centrifugation, le sommet des tubes est découpé lentement avec un scalpel et la couche jaune-orange est prélevée avec une pipette Pasteur à extrémité rétrécie. Cette couche correspondant aux lipoprotéines, est séparée des autres protéines du sérum par une zone claire.
- Les lipoprotéines des deux tubes sont ajustées à la densité de 1.30 g/ml avec du KBr solide (Chung et al, 1980).
- 30 ml de NaCl 0.9 % + BHT sont déposés dans un tube à centrifuger Beckman et la solution de LP est ensuite injectée au moyen d'une seringue et d'un fin tuyau de plastique afin de remplir le tube.
- La centrifugation est effectuée comme ci-dessus pendant 180 minutes, mais le dispositif d'accélération lente est branché de manière à ne pas perturber le gradient. Le frein est également coupé à 2000 tours/minutes en fin de décélération.
- Nous obtenons alors trois couches clairement séparées correspondant aux VLDL, LDL et HDL.
- Le fond de chacun des deux premiers tubes est alors percé au moyen d'une aiguille et le contenu est recueilli en aliquots de 3 ml sur lesquels nous effectuerons le dosage du cholestérol.

Pour l'étude analytique de la distribution du cholestérol total et des protéines, nous fractionnons le tube en \pm 40 aliquots de 1 ml avec une pipette Pasteur à extrémité rétrécie.

Pour les manipulations préparatives, les fractions situées au-dessus de la bande des LDL, facilement identifiables par leur couleur orangée, sont prélevées. Les LDL sont alors fractionnées en aliquots de 1 ml et les dosages exposés ci-dessous sont effectués.

2.2. CARACTERISATION DES FRACTIONS.

2.2.1. Dosage du cholestérol total.

2.2.1.1. Principe.

Le dosage du cholestérol total basé sur la réaction de Allain et al.; 1974 s'effectue selon la réaction suivante :

cholestérol estérifié $\xrightarrow{\text{CHOLESTÉROL ESTÉRASE}}$ cholestérol + acides gras

cholestérol $\xrightarrow{\text{CHOLESTÉROL OXYDASE}}$ cholestène-4,one-3 + H₂O₂

2 H₂O₂ + Phénol + Amino-4-antipyrine $\xrightarrow{\text{PÉROXYDASE}}$ Quinone + 4 H₂O

La séquence de réaction est complète après 10 minutes à 37°C

2.2.1.2. Protocole.

Pour le dosage du cholestérol, nous utilisons un kit enzymatique (Analis). Le cholestérol est dosé sur 10 µl de chacun des aliquots. Le graphique montrant la distribution de cholestérol total dans les aliquots présente un pic correspondant aux échantillons les plus riches en cholestérol total que l'on identifie aux LDL.

Nous effectuons également ce dosage sur les différents aliquots fractionnés à partir du fond du tube : les aliquots présentant une concentration en cholestérol inférieure à 8 mg/dl sont rassemblés et dialysés contre du Dulbecco's PBS* (5 changements) de manière à obtenir une concentration finale de cholestérol inférieure à 5 mg/dl (Goldstein et al., 1983).

2.2.2. Dosage des protéines.

2.2.2.1. Principe.

Le dosage se base sur la réaction des groupements tyrosine et tryptophane des protéines, dénaturées au préalable par la soude caustique, avec le réactif de Folin Ciocalteu (méthode de Lowry, 1951)

2.2.2.2. Protocole.

On dilue 50 x, 50 µl de chaque aliquot. La lecture colorimétrique s'effectue à 540 nm. La quantité de protéines est exprimée en mg/ml.

2.3. VALIDITE DES LDL.

Les aliquots correspondant aux LDL sont rassemblés et dialysés* (5 changements).

Les LDL sont ensuite filtrées sur un millex 0.22 µm; leur concentration en protéines est à nouveau déterminée. Leur validité se maintient pendant 3 semaines à 1 mois à 4 °C.

* voir ANNEXE.

3. COUPLAGE DES LDL A L'OR COLLOÏDAL.

3.1. PREPARATION DE L'OR COLLOÏDAL.

L'or colloïdal est préparé selon la méthode de Frens par la méthode du citrate (Frens, 1973).

- Une solution stock de tétrachlorure d'or (HAuCl_4) 1 % dans H_2O bidistillée est dissoute 100 X dans de l'eau bidistillée, et chauffée avec agitation jusqu'à ébullition.
- On ajoute 1.6 ml de citrate de sodium 1 % (poids/volume) par 50 ml de solution.
- Après 5 minutes d'ébullition, la solution devient rouge vif et contient environ 1×10^{12} particules/ml d'un diamètre de $\pm 16.5 \pm 1.1$ nm.
- La solution est mise à 4 °C après 10 minutes d'ébullition et reste valable 1 à 2 mois à cette température.

3.2. PREPARATION DU CONJUGUE.

Le conjugué est préparé selon la modification apportée par Robenek et al. (1982) à la méthode décrite par Handley et al. (1981).

- Les LDL dialysées présentant une concentration en protéines d'environ 8 mg/ml sont diluées dans de l'eau bidistillée de manière à obtenir une concentration de 2 mg de protéines/ml.
- 50 μl de cette solution sont portés à 500 μl avec de l'eau bidistillée dans plusieurs tubes à essai.
- 5 ml d'or colloïdal sont ajoutés à chacun des tubes en un jet rapide.
- Le contenu de 3 tubes à essai est rassemblé après 5 minutes dans un tube corex® abondamment rincé à l'eau bidistillée, en dessous duquel on introduit 5 ml de saccharose 35 % au moyen d'une seringue et d'un fin tuyau de plastique.

Toutes ces opérations se font à 0 °C.

- Les tubes sont centrifugés 30 minutes, à 7500 tours/minutes à 4 °C dans une centrifugeuse Beckman J21.
- Après la centrifugation, on obtient un précipité rougeâtre.
- Après un repos de 30 minutes à 4 °C, le surnageant et le saccharose sont

enlevés, on resuspend alors le conjugué dans quelques gouttes de Dulbecco's PBS, de manière à obtenir environ 1 ml de conjugué.

- Le conjugué est dialysé pendant une nuit contre ce tampon (2 changements) afin d'enlever le saccharose.
- Le conjugué reste stable 24 heures à 4 °C.

3.3. MESURE DU DIAMETRE DES PARTICULES D'OR COLLOIDAL.

La solution d'or colloïdal est déposée sur une grille de cuivre HR 24.200 mesh et photographiée au microscope électronique à transmission (TEM). Le diamètre des particules est mesuré sur les photos (grossissement final = 60000 X) au moyen d'une loupe munie d'une règle graduée en dixièmes de mm.

3.4. ETUDE DU CONJUGUE PAR COLORATION NEGATIVE.

3.4.1. Principe.

Une solution de métal lourd est déposée sur une grille préalablement traitée avec la solution de particules à étudier.

Une goutte de colorant est déposée sur la grille; elle se réduit par la suite en une mince couche se solidifiant en un fin film vitreux. Ce colorant entoure les particules et pénètre les irrégularités présentes à leur surface (Johnson and Horne, 1970).

3.4.2. Protocole.

- Des grilles de formvar sont carbonées dans un évaporateur "clean vacuum" (Edwards) juste avant les opérations suivantes.
- Plusieurs dilutions de conjugué sont effectuées à 4 °C.
- Une goutte de chaque dilution est posée sur la grille au moyen d'une pipette Pasteur (méthode de la goutte); après 20 à 30 secondes, le surplus est absorbé avec du papier Joseph.
- Une goutte d'acétate d'uranyle 1 %, pH 6.3, (colorant) est immédiatement appliqué de la même manière.
- Un chronométrage est effectué à partir de ce moment. Lorsque le temps choisi est écoulé, le surplus de colorant est absorbé en plaçant le papier Joseph à côté de la grille. Il ne reste qu'une mince couche qui sèche

rapidement.

Toutes ces opérations se réalisent à température de la pièce.

- Les observations s'effectuent au TEM Philips EM 301 le plus rapidement possible (les échantillons ne peuvent être observés qu'une seule fois).
- Les zones choisies sont photographiées sur des films 35 mm au grossissement 10000.
- L'examen des particules se fait sur des photos (gross. final = 60000 x)

4. INCUBATION DU CONJUGUE AVEC LES CELLULES ENDOTHELIALES.

4.1. PREINCUBATION DES CELLULES ENDOTHELIALES A CONFLUENCE AVEC DU LPDS.

Les CE confluentes sont incubées 18 heures avec du milieu M199 contenant 10 % de LPDS.

4.2. INCUBATION DES CELLULES ENDOTHELIALES AVEC LES LDL.

- Après dialyse du conjugué, celui-ci est filtré sur un millex 0.22 μ m et la quantité de protéines est déterminée par la méthode de Lowry.
- Refroidir les boîtes 30 minutes à 4 °C.
- Rincer les cellules deux fois avec du milieu de rinçage à 4 °C.
- Incuber les cellules pendant 1 heure à 4 °C.

Pour chaque expérience, nous avons une série de boîtes "contrôle" et une série de boîtes "test".

Dans les boîtes "test", nous incubons les cellules avec une quantité de conjugué inférieure à 50 μ g protéines/ml.

Dans les boîtes "contrôle", nous incubons les cellules avec la même quantité de conjugué que les boîtes "test" et un excès important (500 μ g protéines/ml) de LDL non liées à l'or (=LDL natives).

Le milieu d'incubation de chacune des boîtes est complété avec du M199 + LPDS 10 % jusqu'à atteindre 1 ml et est maintenu à 4 °C avant l'incubation.

- Après l'incubation, suivre l'un des deux traitements suivants :

(*) Pour l'étude de la liaison des LDL aux cellules,

rincer deux fois avec du PBS + albumine 0.2 % à 4 °C, puis fixer dans une solution de glutaraldéhyde 2.5 % dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4 pendant deux heures.

(*) Pour l'étude de l'endocytose,

rincer deux fois avec du PBS + albumine 0.2 % à 37 °C, incuber dans ce milieu, à la même température pendant 2 minutes puis fixer dans la solution de glutaraldéhyde 2.5 % dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4 pendant deux heures.

5. PREPARATION POUR L'ETUDE DES CELLULES ENDOTHELIALES EN TEM.

Nous étudions parallèlement les CE incubées avec du conjugué, sur des sections sagittales ultrafines et sur des répliques.

Les boîtes fixées avec de la glutaraldéhyde 2.5 % dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4 sont coupées en deux avant les étapes suivantes.

5.1. PREPARATION DES SECTIONS ULTRAFINES.

5.1.2. Postfixation, déshydratation et enrobage.

- Rincer les cellules 3 X 1 minute à 0 °C avec du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4 additionné de saccharose 5 %.
- Postfixer à 0 °C pendant 1 heure à l'obscurité avec du tétr oxyde d'osmium (JMC) 0.5 % dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4.
- Rincer 3 X 1 minute à 0 °C avec du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4 additionné de saccharose 5 %.
- Déshydrater les cellules de la manière suivante :
 - 3 X 1 à 2 minutes à 0 °C dans de l'éthanol 70°.
 - 3 X 1 à 2 minutes à 0 °C dans de l'éthanol 92°.
 - 3 X 10 minutes à température ambiante dans de l'éthanol 100°.
- Rincer avec de l'épon pendant 10 minutes à température ambiante.
- Couler l'épon définitif.
- Polymériser -une nuit à 37°C.
 - 3 jours à 60°C.

5.2.2. Coupes et colorations.

Les coupes ultrafines sont obtenues avec un couteau de diamant à l'ultramicrotome (Ultratome III LKB), puis contrastées avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyl 1%, suivie de citrate de plomb selon la technique de Reynolds pendant 10 minutes.

Les grilles sont examinées au microscope électronique à transmission Philips EM 301.

5.2 PREPARATION DES REPLIQUES.

5.2.1. Rincage et déshydratation.

- Rincer les cellules 3 X 1 minute à 0 °C avec du tampon cacodylate de Na 0.1 M pH 7.4 additionné de saccharose 5 %.
- Déshydrater les cellules de la manière suivante :
 - 3 X 1 à 2 minutes à 0 °C dans de l'éthanol 70°.
 - 3 X 1 à 2 minutes à 0 °C dans de l'éthanol 92°.
 - 3 X 10 minutes à température ambiante dans de l'éthanol 100°.(°)

5.2.2. Préparation des cellules endothéliales pour l'utilisation de la technique de point critique.

5.2.2.1. Principe.

Cette technique, introduite par Anderson en 1951, consiste à remplacer l'éthanol du tissu par du dioxyde de Carbone liquide qui passera en phase gazeuse en augmentant la température et la pression jusqu'à une valeur excédant le point critique où la distinction entre les différentes phases n'est plus possible.

A ce stade, l'interface qui existe entre un liquide et sa vapeur sous des conditions normales de température et de pression disparaît.

5.2.2.2. Protocole.

- Après le dernier bain dans l'éthanol (°), couper le fond des boîtes et les placer sur des supports perforés de manière à permettre la circulation d'éthanol et de CO₂ à travers ceux-ci.
- Empiler ces supports dans l'enceinte préalablement refroidie (15 °C) de l'installation utilisée pour la technique du point critique.
- Effectuer plusieurs lavages avec du CO₂ jusqu'à disparition complète de l'éthanol.

- Augmenter la température de l'enceinte à ce moment. L'augmentation de la pression peut être suivie. A une température dépassant 40° C et à une pression supérieure à 75 kg/cm², le point critique est dépassé.
- A ce moment, réduire lentement la pression.
- Retirer les boîtes de l'enceinte et les conserver à l'abri des poussières.

5.2.3. Formation de la réplique.

5.2.3.1. Principe.

Les répliques sont de fins films de matériel transparent aux électrons correspondant à la structure de la surface du spécimen examiné (Anderson., 1972).

5.2.3.2. Protocole.

Les répliques sont obtenues en ombrant la surface des cellules séchées par la méthode du point critique avec du Platine, sous un angle de 38°, et consolidées avec du Carbone vaporisé sous un angle de 90°.

Ces opérations se réalisent sous vide dans un appareil Balzers conçu pour le freeze-etching.

5.2.4. Récupération de la réplique.

- Les fragments des boîtes ainsi traitées sont alors incisés avec une lame de scalpel et placés dans une solution aqueuse de NaClO 1 %.
- Lorsque les répliques se détachent, elles sont rincées dans trois bains d'eau bidistillée au moyen d'une "loop" de platine, et repêchées sur des grilles de formvar.
- Elles sont séchées délicatement au moyen de papier Joseph.
- Elles sont observées au TEM (Philips EM 301).

6. ETUDE DE L'EFFET DE LA LIAISON DES LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES.

6.1. ETUDE DES SECTIONS ULTRAFINES.

Des coupes sagittales de 400 Å sont étalées sur des grilles de formvar et observées au TEM Philips EM 301.

6.2. ETUDE DES REPLIQUES DE SURFACE.

6.2.1. Observation au TEM.

- Les observations s'effectuent également au TEM Philips 301.
 - La procédure suivante est suivie pour analyser les répliques:
 - les répliques sont examinées à faible grossissement (550), afin de déterminer une zone propre et intacte.
 - A plus fort grossissement (3300), nous déterminons la zone périphérique des cellules.
 - La mise au point s'effectue sur les particules d'or. Nous prenons ensuite 12 photos juxtaposées dans cette zone sur des films de 35 mm, pour chaque expérience.
- Pour chaque expérience, nous travaillons sur 12 photos pour les " " et 9 photos pour les "contrôles".

6.2.2. Observation et comptage des particules sur les photos.

- Les négatifs sont agrandis 6 x et donnent un grossissement final de 19800.
- Une surface de 15 x 15 cm² (soit une surface de 57.4 μm²) est délimitée sur chaque photo.
- Les photos sont examinées sous un binoculaire (American Optical) et les particules sont ensuite comptées.
- Le comptage a pour but d'étudier:
 - l'effet de la concentration en conjugué sur le nombre total de particules liées à une surface de 688.8 μm².
 - l'effet de la concentration en conjugué sur la taille des amas.

RESULTATS

1. CULTURE DE CELLULES ENDOTHELIALES.

1.1. MISE EN CULTURE.

-Après 6 heures:

Les cellules adhèrent à la gélatine. Elles sont petites et polyédriques, isolées ou en amas de petite taille; des globules rouges persistent encore après le premier changement de milieu. (Figure 11)

-Après 24 heures:

Les cellules sont plus allongées, leur noyau contient un ou deux nucléoles. On note l'hétérogénéité de forme et de taille des cellules. (Figure 12)

-Au premier jour de confluence ou "stade de subconfluence" (\pm 4 à 5 jours plus tard):

Les cellules fusiformes présentent encore une hétérogénéité de taille. Elles couvrent pratiquement toute la surface de la boîte, sauf aux endroits de mitose. A ce niveau, les cellules se détachent du fond donnant deux masses globulaires réfringentes.

Les cellules sont limitées par un espace clair correspondant à la zone de contact entre deux cellules voisines; cette zone correspond aux prolongements cellulaires. (Figure 13)

-Au deuxième jour de confluence:

Les cellules ont pris un aspect polyédrique caractéristique; leur taille est homogène; le noyau et les nucléoles sont toujours visibles. (Figure 14)

1.2. CARACTERISATION EN MICROSCOPIE OPTIQUE.

1.2.1. Microscopie optique à contraste de phase.

L'organisation cellulaire ne devient visible qu'après 24 heures. On peut alors observer le noyau et son (ou ses) nucléole(s); et le cytoplasme. Celui-ci présente parfois quelques vacuoles.

Après 24 heures, la culture est également le siège de nombreuses mitoses. On observe des modifications de forme dans les cellules; elles présentent des prolongements, lorsqu'elles sont en croissance et deviennent plus régulières à confluence.

1.2.1. Microscopie optique à fluorescence.

Les cellules sont photographiées à confluence. La fluorescence est répartie uniformément dans tout le cytoplasme. Certains endroits montrent

PLANCHE I:

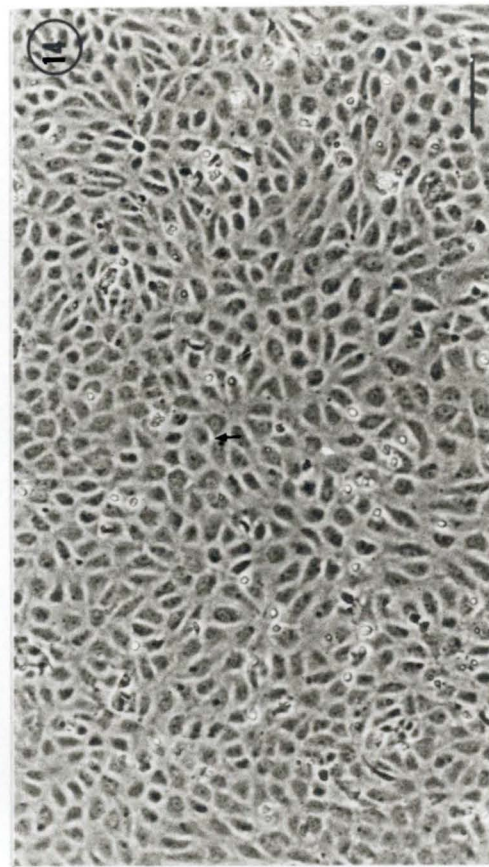
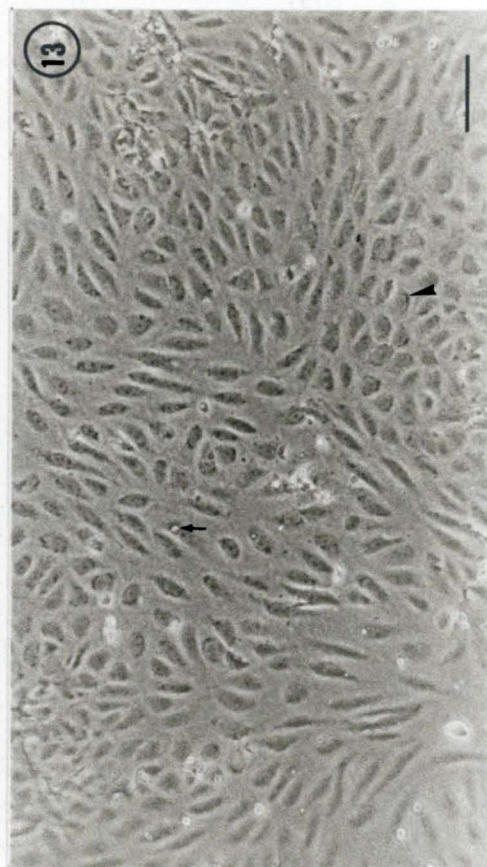
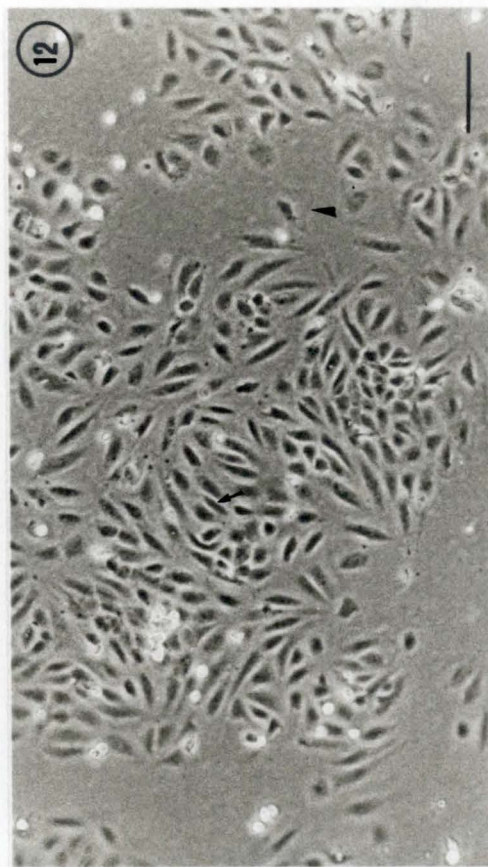
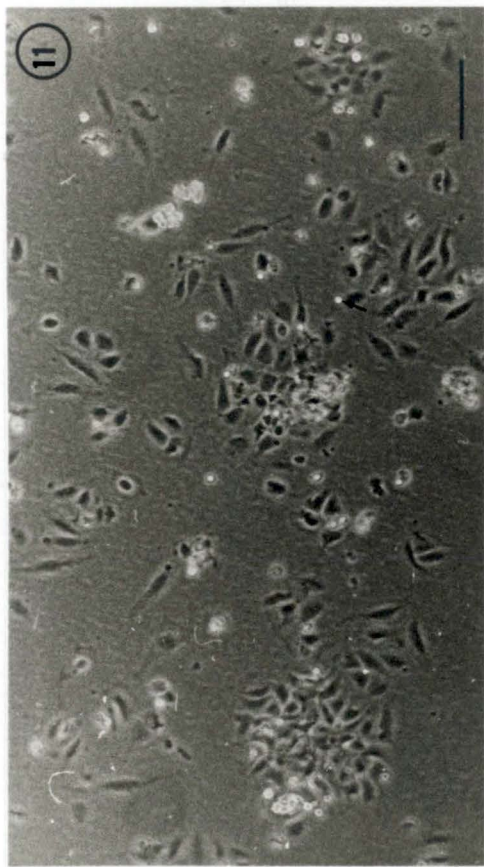
Caractérisation des cellules endothéliales en microscopie à contraste de phase.

Figure 11. Aspect des cellules après 6 heures de culture.
Noter les globules rouges plus réfringents (flèche). Les amas cellulaires sont petits et nombreux; quelques cellules sont isolées .

Figure 12. Aspect des cellules après 24 heures de culture.
La taille des amas augmente; les cellules centrales sont fusiformes et régulière (flèche); en périphérie, elles ont tendance à s'étaler et à perdre leur régularité (tête de flèche).

Figure 13. Aspect des cellules au premier jour de confluence.
Les cellules forment une monocouche presque parfaite.
Noter la présence de vésicules claires (flèche) et sombres (tête de flèche) dans le cytoplasme. Dans la zone de contact, les prolongements cellulaires peuvent être observés. La réfringence intense à certains endroits correspond à des cellules mortes.

Figure 14. Aspect des cellules au deuxième jour de confluence.
Remarquer l'aspect polyédrique et l'homogénéité de taille et de forme des cellules. La zone de contact est toujours visible (flèche).



une fluorescence plus importante. Les noyaux ne sont pas marqués.
(Figure 15 et 16)

1.3. CARACTERISATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

1.3.1. Section transversale .

-La chromatine périnucléaire est d'abondance variable, mais le plus souvent peu importante. Les nucléoles se présentent sous forme de masses rondes. Le noyau est parfois échancré.

-Le cytoplasme est caractérisé par une densité très élevée en organites ceinturant le noyau.

Du noyau vers la périphérie, on note:

*un appareil de Golgi très étendu et extrêmement vésiculeux. Il est constitué de plusieurs dictyosomes, formés eux-mêmes d'un empilement de 2 à 5 saccules, et encercle généralement le noyau. (Figure 17)

*les mitochondries sont allongées, les crêtes bien visibles, la matrice dense. (Figure 18)

Quelques mitochondries en dégénérescence peuvent être observées.

*le réticulum endoplasmique lisse est rare, voir absent.

*le réticulum endoplasmique rugueux (RER) est légèrement dilaté, sa disposition change selon sa situation dans la cellule: (Figure 20)

-en périphérie du noyau, il est disposé en citerne.

-plus distalement, il se dilate en réseau et on note une diminution des ribosomes à sa surface.

-en périphérie de la cellule, le RER a disparu et les ribosomes sont libres ou associés en polysomes.

*Les lysosomes sont peu abondants.

*De nombreuses vésicules se rencontrent dans le cytoplasme.

Les vésicules lisses sont plus nombreuses que les vésicules "coatées"; elles sont attachées à la membrane ou situées dans la région sous-jacente, associées ou non à des éléments du cytosquelette; elles peuvent également fusionner.

On note la présence de corps multivésiculaires prolongés ou non par un appendice.

*Les corps de Weibel-Palade sont présents, mais leur nombre et leur localisation varient selon les cellules. (Figure 19)

PLANCHE II:

Caractérisation des cellules endothéliales en microscopie à fluorescence.

Figure 15 Cellules provenant d'une seconde sous-culture. La fluorescence est plutôt concentrée dans la région périnucléaire. x 2200.

Figure16 L'expérience contrôle ne montre qu'un très faible marquage non spécifique. x 2200.

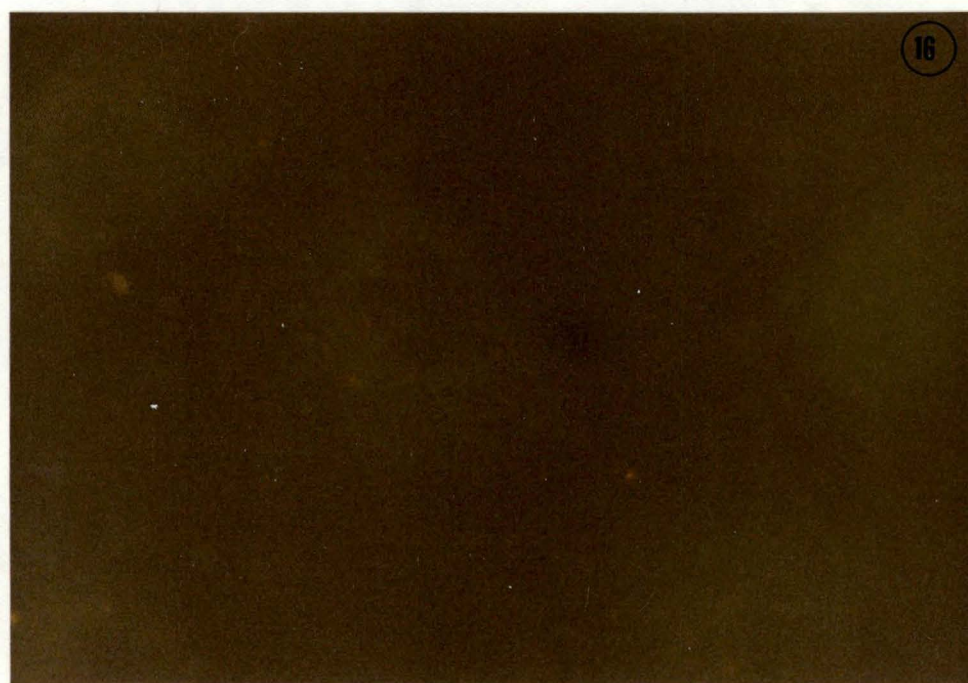
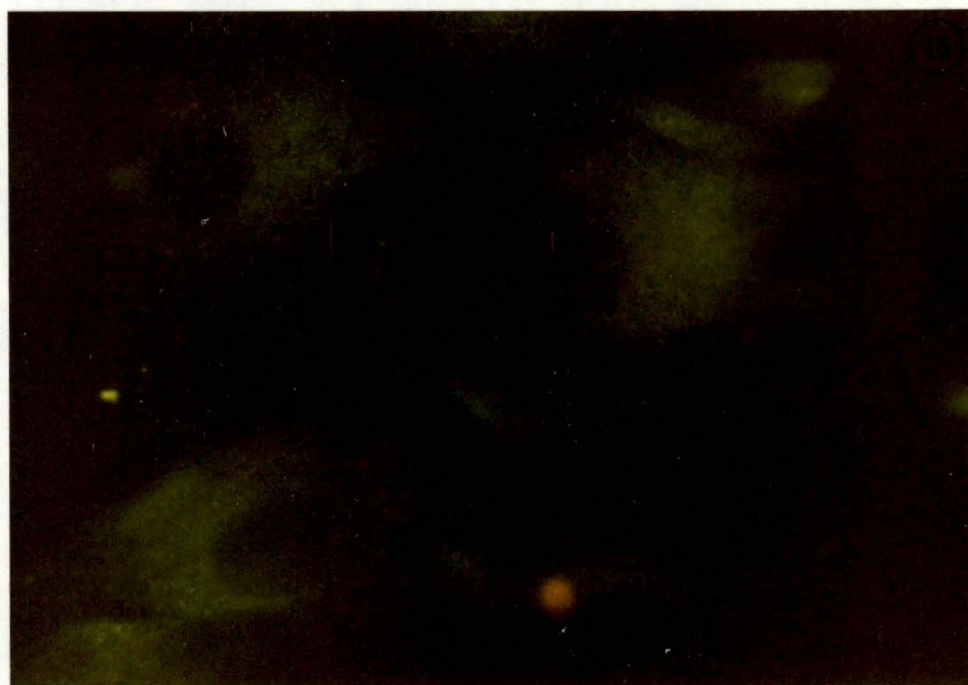


PLANCHE III:

Caractérisation des cellules endothéliales en microscopie électronique à transmission.

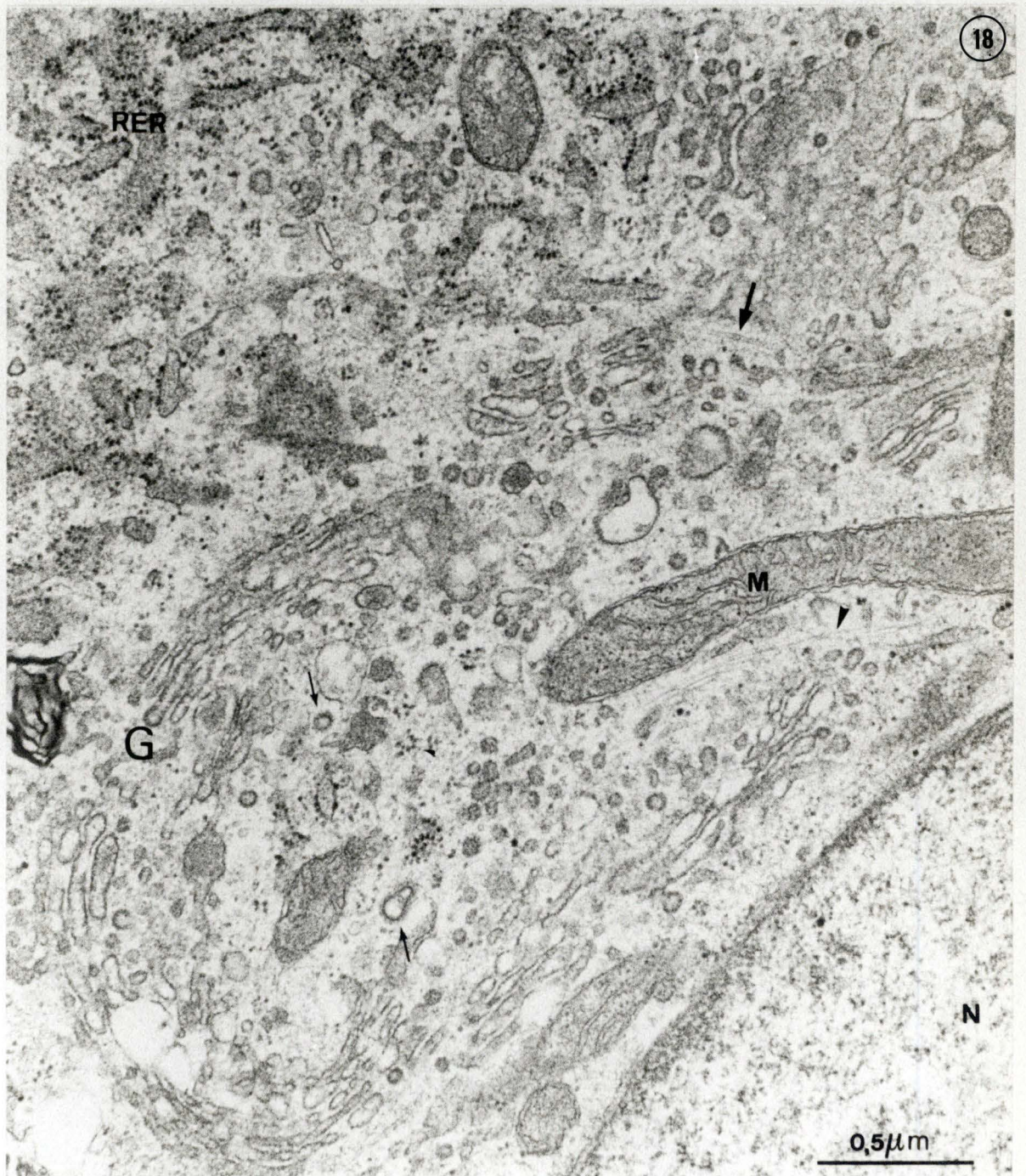
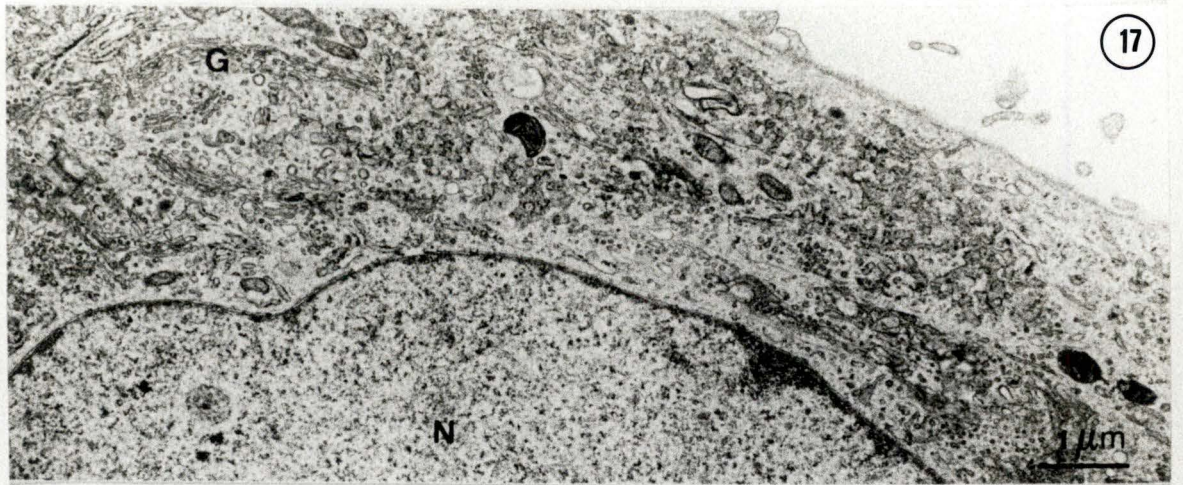
Figure 17: L'appareil de Golgi (G) est situé à proximité du noyau (N).
Noter la présence de plusieurs dictyosomes contenant chacun un empilement de 4 à 5 saccules.

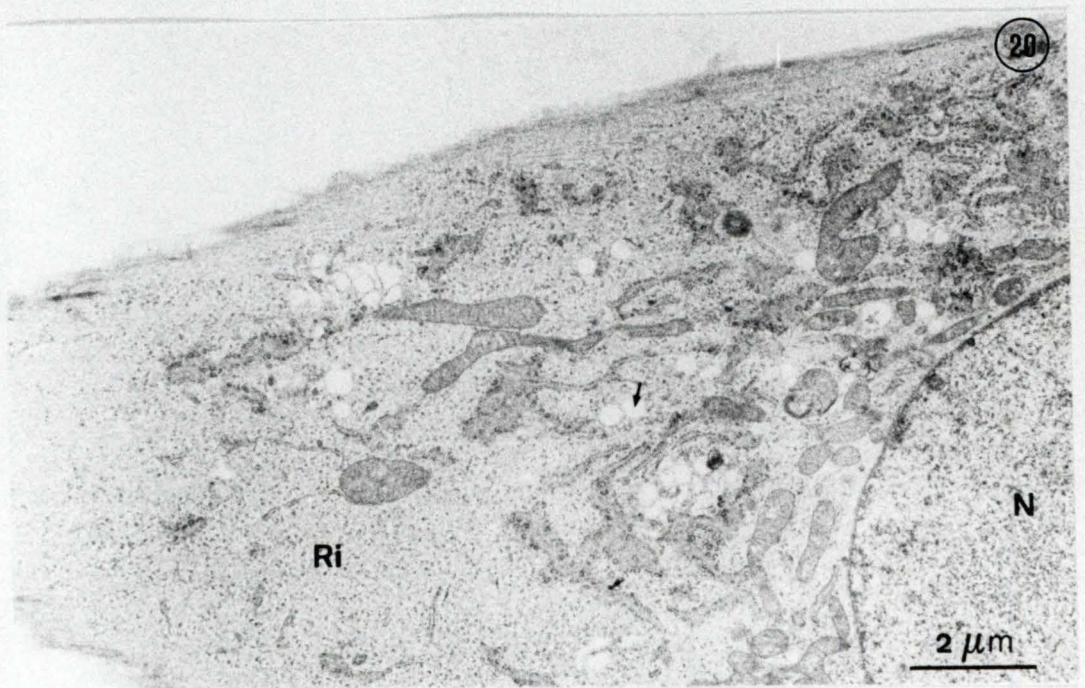
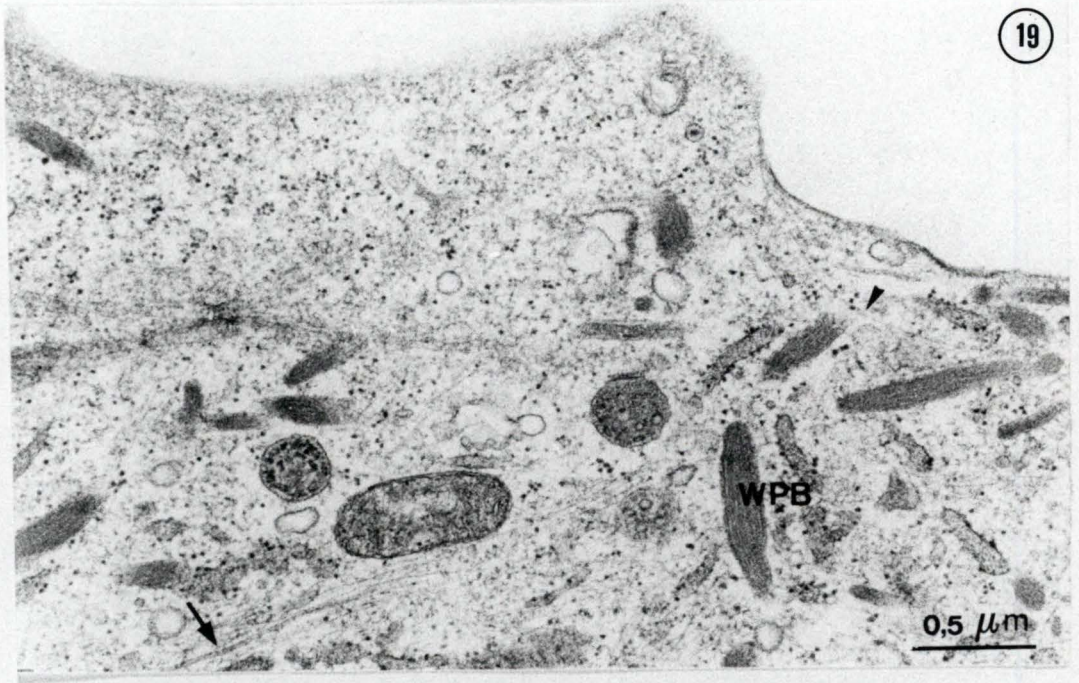
Figure 18: Au niveau de la face de maturation de l'appareil de Golgi (G), remarquer la présence de petites vésicules "coatées" (petite flèche). Noter la présence de mitochondries (M) allongées. Les microtubules (grosse flèche) et les filaments intermédiaires (tête de flèche) semblent dispersés librement dans le cytoplasme. Le réticulum endoplasmique rugueux (RER) est très peu dilaté.

Figure 19: Les corps de Weibel-Palade (WPB) sont situés en périphérie cellulaire. Noter la présence de microtubules (flèche) et de microfilaments (tête de flèche).

Figure 20: La figure illustre bien l'abondance des ribosomes libres (Ri) en périphérie cellulaire. Noter la présence de vacuoles claires (flèche).

N = noyau.





-Entre la zone dense en organites et la périphérie cellulaire, on observe différentes vacuoles. Elles ne présentent pas d'association particulière avec les autres organites de la cellule, si ce n'est, par endroits, la présence de ribosomes libres.

Leur nombre et leur situation sont variables selon les cellules.

On distingue: - des vacuoles denses à différents stades d'autophagie.

- des vacuoles peu denses contenant des débris membranaires.
- des vacuoles claires aux limites souvent discontinues et dont le contenu refoule parfois des débris peu denses en un amas localisé.

Ces deux derniers types de vacuoles sont souvent associés.

-Les éléments du cytosquelette présentent l'organisation suivante:

*les câbles d'actine sont peu nombreux et situés en périphérie cellulaire sous la membrane; ils présentent un aspect condensé à certains endroits;

*les tubules et les filaments intermédiaires traversent le cytoplasme.

Les filaments intermédiaires s'entrelacent entre les mitochondries, les vacuoles et les vésicules.

Le cytosquelette est surtout abondant au niveau basal.

1.3.2. Sections sagittales.

Les caractéristiques sont identiques à celles énoncées ci-dessus.

-Le RER est présent sous forme de citernes dans la région nucléaire; à la périphérie cellulaire, on ne voit plus que les ribosomes libres. (Figure 21)

-Les différents types de vacuoles sont également visibles.

-Les WPB sont observés en section transversale et longitudinale. (Figure 22)

-Le nombre et la disposition des éléments du cytosquelette sont variables.

Ces éléments apparaissent préférentiellement à la périphérie cellulaire.

Au niveau du noyau, les filaments se retrouvent plus fréquemment à la face supérieure; la plupart des cellules ne présentent pas de filaments du côté basal à ce niveau.

Nous n'avons pas mis en évidence de lame basale.

-C'est dans la périphérie cellulaire que le système vésiculaire est le plus développé; il présente divers aspects (vésicules attachées à la MP, fusion de vésicules, citernes vésiculaires, canaux aux extrémités non définies).

(Figure 23)

Les vésicules "coatées" sont présentes autour de l'appareil de Golgi et en

PLANCHE IV: caractérisation des cellules endothéliales en microscopie électronique - coupe sagittale.

Figure 21: Au niveau du noyau (N), remarquer l'appareil de Golgi très vésiculeux.(G).

A ce niveau, le reticulum endoplasmique rugueux (RER) est organisé en citernes.

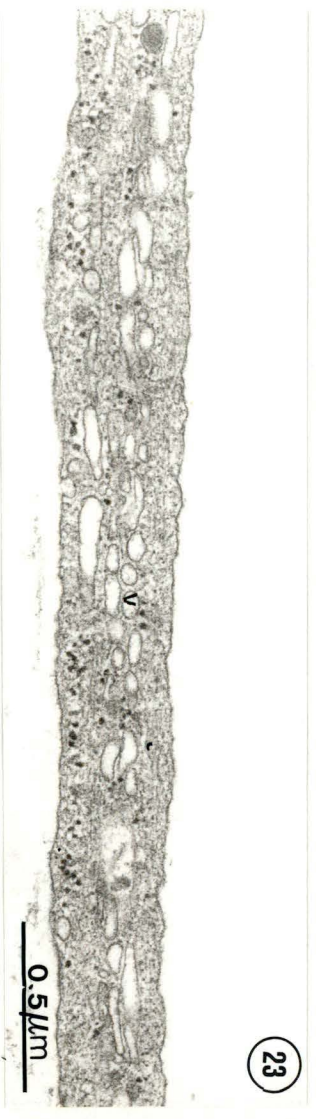
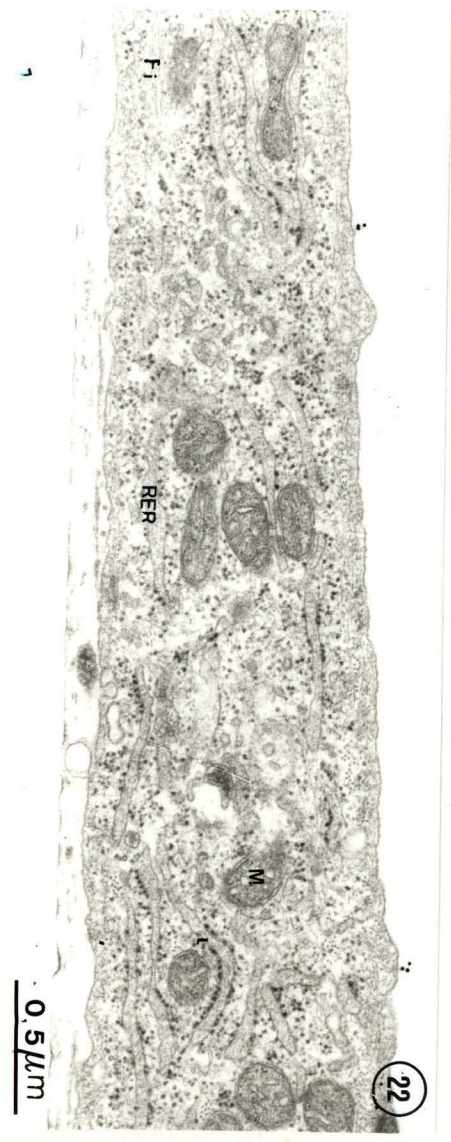
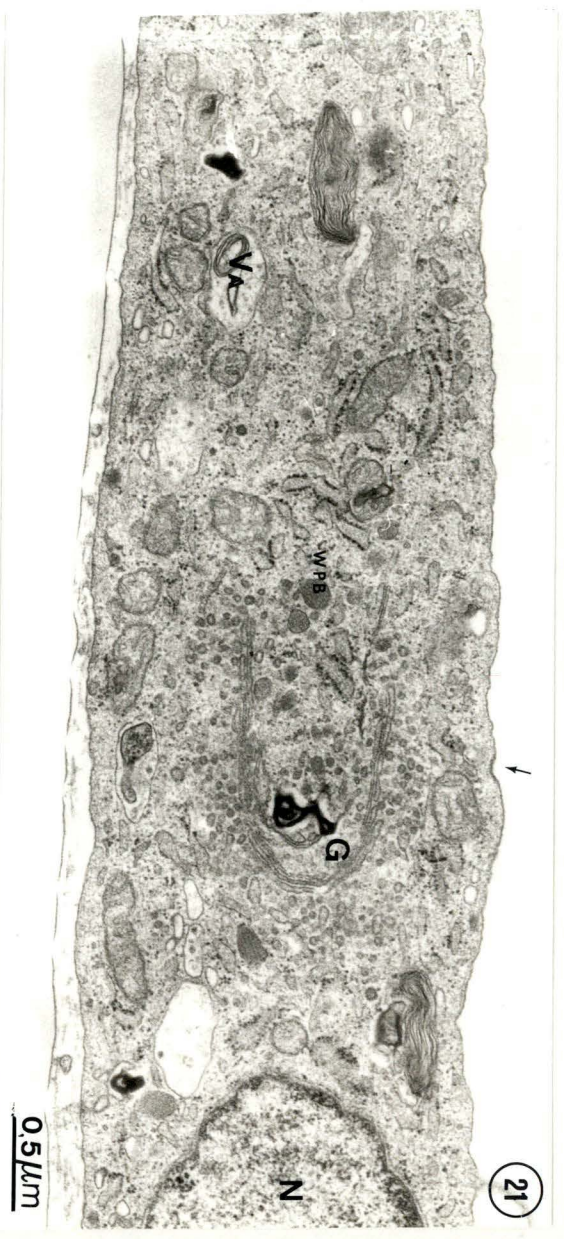
Noter les corps de Weibel-Palade (WPB), en coupe longitudinale et transversale.

A la surface cellulaire, on note des vésicules.

Figure 22: En périphérie du noyau, le réticulum endoplasmique rugueux est organisé en citerne; cependant, le cytoplasme contient un plus grand nombre de ribosomes libres.

Des éléments du cytosquelette , les filaments intermédiaires (Fi) traversent le cytoplasme .

Figure 23: la périphérie cellulaire est essentiellement caractérisée par son système vésiculeux très développé et par un cytosquelette plus ou moins développé.



périphérie.

Le nombre de WPB et de vésicules "coatées" au niveau de la membrane varie selon les endroits de la cellule. Ces dernières s'ouvrent fréquemment à la face cellulaire inférieure.

1.3.3. CARACTERISATION DES REPLIQUES.

1.3.3.1. Aspect des cellules fixées sans tétr oxyde d' osmium.

Du centre vers la périphérie, nous observons trois zones:

- la zone du noyau, lisse avec un ou plusieurs nucléoles proéminents.
- une zone intermédiaire présentant des cavités plus ou moins prononcées.
- une zone périphérique caractérisée par des structures filamenteuses orientées. Cette zone s'étend par de fins prolongements cytoplasmiques de longueur variable.

Les zones de contact entre les cellules sont de 2 ordres.

- Parfois les cellules sont si imbriquées les unes dans les autres que leurs limites ne sont plus visibles.
- D'autres cellules peuvent émettre des prolongements plus ou moins longs pour établir des ponts intercellulaires.

1.3.3.2. Aspect des cellules postfixées avec du tétr oxyde d'osmium.

Les trois zones décrites ci-dessus sont plus homogènes et plus lisses.

- le noyau et les nucléoles sont plus rarement visibles.
- la zone des "cavités" est observée moins fréquemment.
- la zone périphérique présente le même aspect mais les structures filamenteuses orientées sont également moins visibles.

2. LES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE.

2.1. LE GRADIENT DE DENSITE.

La première étape de la centrifugation permet d'obtenir une bande de LP bien séparée des autres protéines du sérum.

Le prélèvement rapide des LP après cette étape a contribué à améliorer la qualité des LDL en diminuant la quantité de VLDL et de chylomicrons; en effet, ceux-ci ont tendance à s'adsorber sur la paroi interne du tube pendant une centrifugation dans un rotor vertical, leur réorientation dans le tube en

fin de centrifugation sera donc nettement plus lente que celle des autres lipoprotéines. Cependant, leur présence constitue un problème important dans la préparation du LPDS; c'est pourquoi, en laissant reposer le tube délipoprotéiné, 1 heure à 4°C, les VLDL et les chylomicrons peuvent remonter à la surface et donc ainsi, améliorer la qualité et la quantité de LPDS.

La deuxième étape de centrifugation nous permet d'obtenir trois bandes de LP de couleurs différentes: les VLDL sont blanchâtres, les LDL orangées et les HDL, jaunâtres. (Figure 25)

2.2. LES DOSAGES DE PROTEINES ET DE CHOLESTEROL.

Les distributions des protéines et du cholestérol total sur le gradient montre une séparation effective entre les VLDL, LDL et HDL.

Dans le fond du gradient, se trouvent des contaminants différents des LP: ce sont probablement des protéines du sérum habituellement adsorbées sur les LP. Elles sont responsables de la concentration élevée en protéines observée dans les dernières fractions. (Figure 24)

2.3. OBSERVATION DES LDL EN COLORATION NEGATIVE.

Nous notons une hétérogénéité de taille demeurant dans les limites acceptables: (Figures 26 et 27)

taille moyenne des LDL = $21,2 \pm 2,4$ nm (60 mesures)

remarque: les mesures comparent les tailles des LDL dans cet échantillon, mais ne prétendent pas les comparer aux valeurs exactes, car nous ne possédions pas de grille de contrôle lors de la photographie au TEM.

3. LA SOLUTION D'OR COLLOIDAL.

3.1. MESURE DE LA TAILLE DES PARTICULE D'OR.

la taille des particules est assez homogène:

taille moyenne: 13.31 ± 1.26 nm (63 mesures)

remarque: les mesures comparent les tailles des particules d'or dans cet

FIGURE 24:

Distribution du cholestérol total et des protéines dans les fractions du gradient après ultracentrifugation

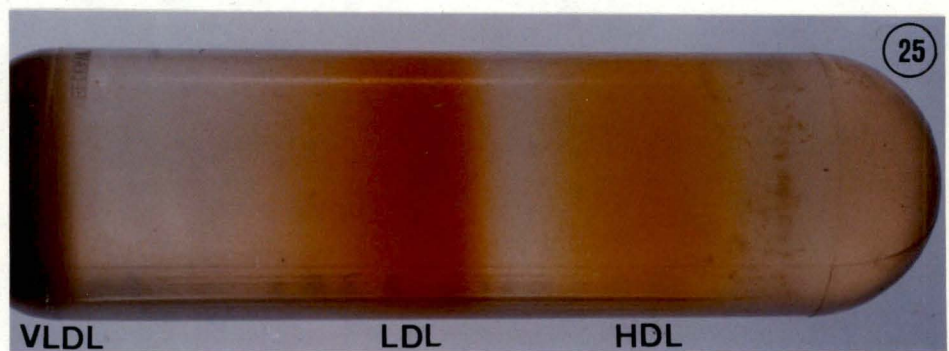
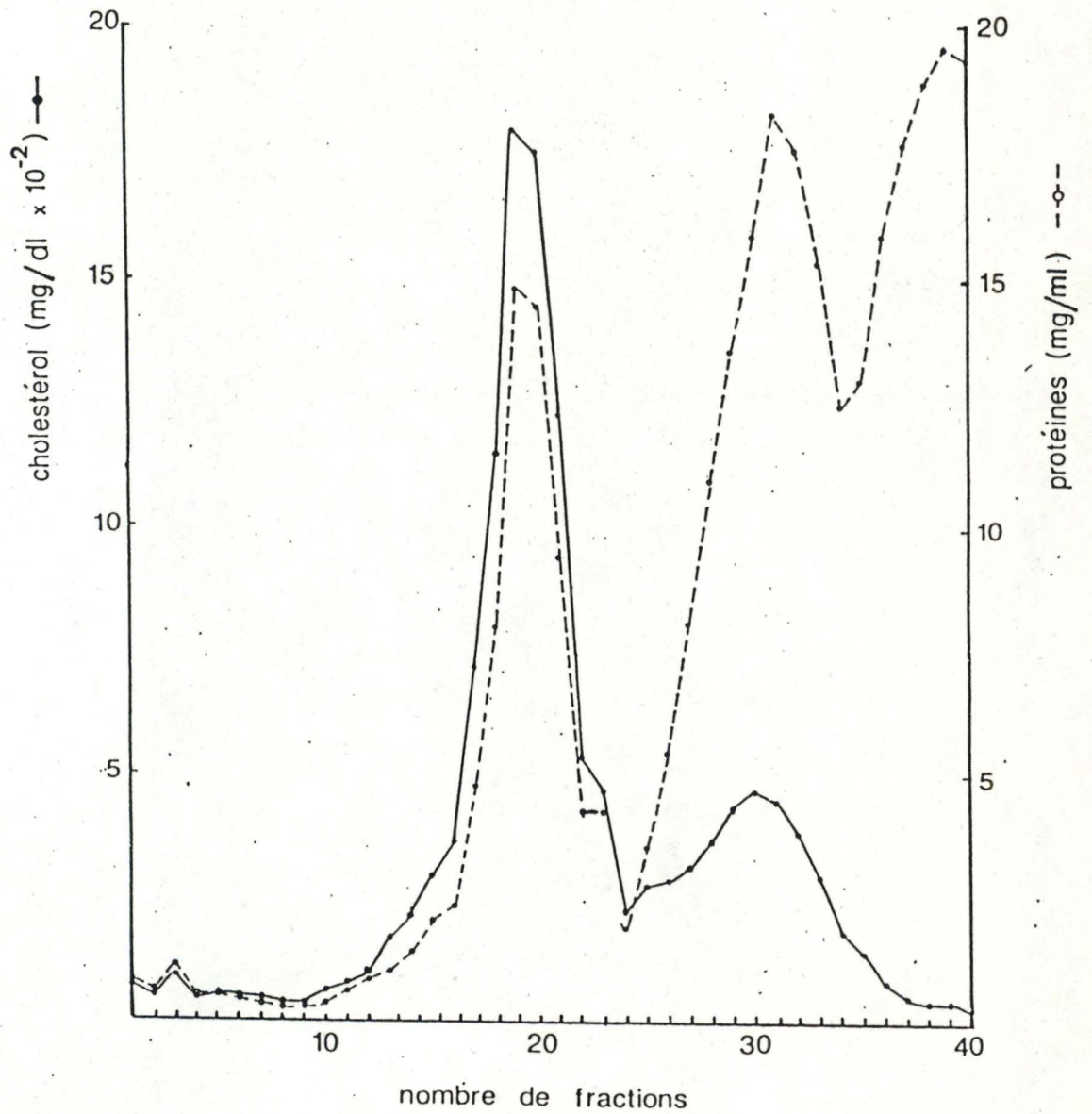
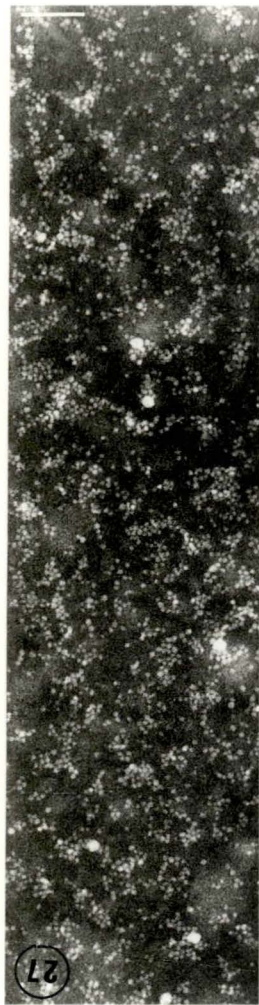


PLANCHE V: Coloration négative des LDL.

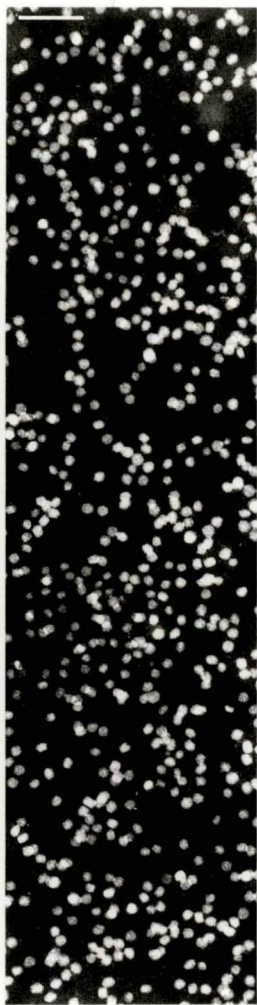
Figure 26: Les LDL mises en évidence par une coloration négative présentent une hétérogénéité de taille et de forme dans les limites acceptables.

Figure 27: La coloration négative des 3 classes de lipoprotéines obtenues après ultracentrifugation (Poumay and Ronveaux-Dupal) permet d'authentifier les LDL obtenues par la même technique.

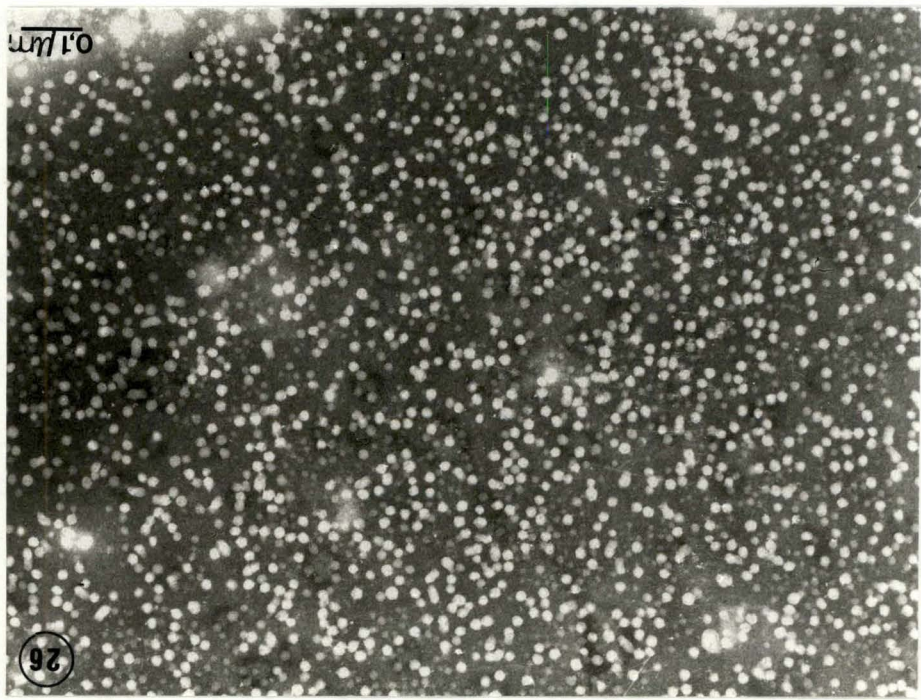
C



B



A



échantillon, mais ne prétendent pas les comparer aux valeurs exactes, car nous ne possédons pas de grille de contrôle lors de la photographie au TEM..

4. LE CONJUGUE LDL-OR.

4.1. DOSAGE DES PROTEINES DU CONJUGUE.

N° expérience	conc. prot. LDL ($\mu\text{g/ml} \times 10^{-2}$)	conc. prot. conj. ($\mu\text{g/ml}$)	conc. en conj. incubé. ($\mu\text{g/ml}$)	remarques
6	6	13	2.5	conjugaison T°labo
23	8.26	199		conjugaison 0°C
2	9.16	84	5	conjugaison T°labo
24	8.26	199		conj. 0°C, centr. <4°C
7	6	80	10	conj. T°labo
8	6	70		conj. T°labo
19	8.26	144	15	conj. 0°C, centr. 4°C
20	8.26	144		même jour
21	8.26	242	20	conj. 0°C, centr. <4°C
25	8.26	199		conj. 0°C, centr. <4°C
13	8.60	230	30	conj. 0°C, centr. <4°C
22	9.86	324	40	conj. 0°C, centr. <4°C
11	8.6	188	50	conj. 0°C, centr. <4°C

5. LIAISON DU CONJUGUE A LA SURFACE CELLULAIRE.

5.1. OBSERVATION DES SECTIONS SAGITTALES EN TEM.

Les LDL visualisées par les particules d'or peuvent se retrouver en deux domaines de la membrane: (Figures 28 à 32)

- soit au niveau des "coated-pits", la région cytoplasmique sous-jacente présentant ou non des filaments.
- soit en dehors des "coated-pits", la région cytoplasmique sous-jacente présentant ou non des filaments.

PLANCHE VI: Aspects morphologiques de la liaison du conjugué à la membrane cellulaire en section sagittale.

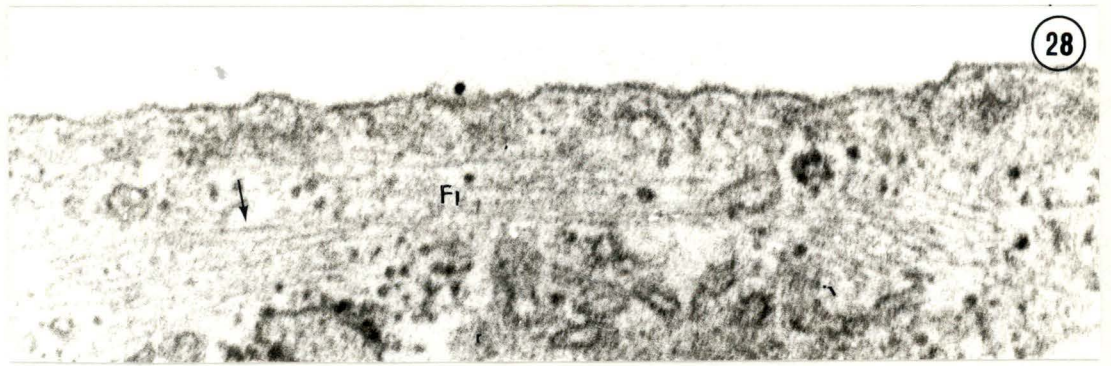
Figure 28: Liaison d'une particule au niveau d'un "coated-pit", noter la présence de microtubules (flèche) sous le "domaine" de liaison.

Figure 29: Liaison des particules au niveau d'un "coated-pit": noter la distance séparant les particules d'or de la membrane. On note un deuxième amas lié en dehors d'un "coated-pit".

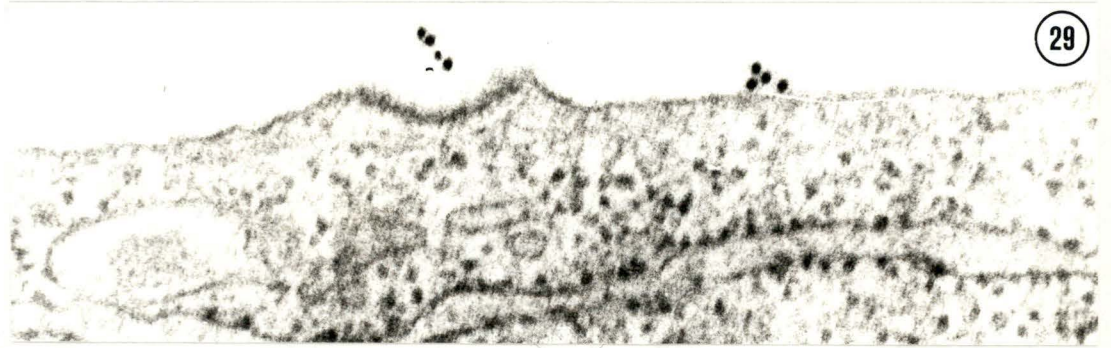
Figure 30: Liaison du conjugué dans une région particulièrement riche en filaments intermédiaires (Fi) disposés en tous sens. Noter l'aspect particulièrement condensé du cytosquelette au niveau du site de liaison

Figure 31: Liaison du conjugué dans une partie de la cellule dépourvue en éléments du cytosquelette.

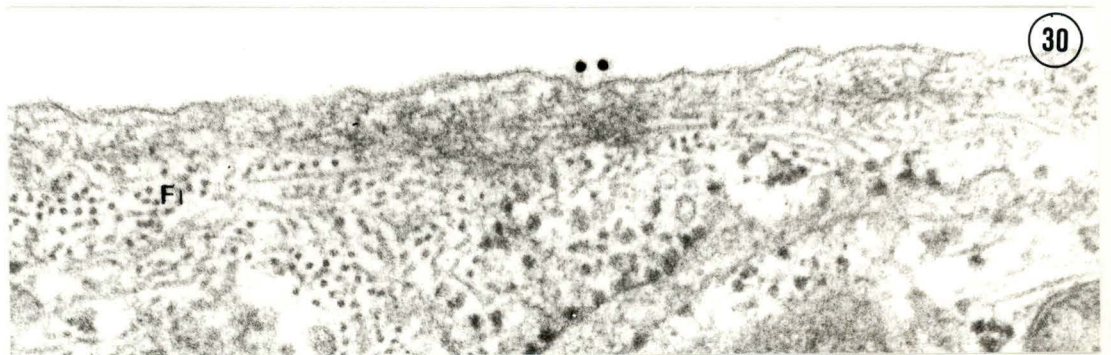
Figure 32: L'identification d'un "coated pit" (CP) dans le domaine situé sous les particules est difficile. Noter l'abondance de microfilaments (MF) au niveau des membranes.



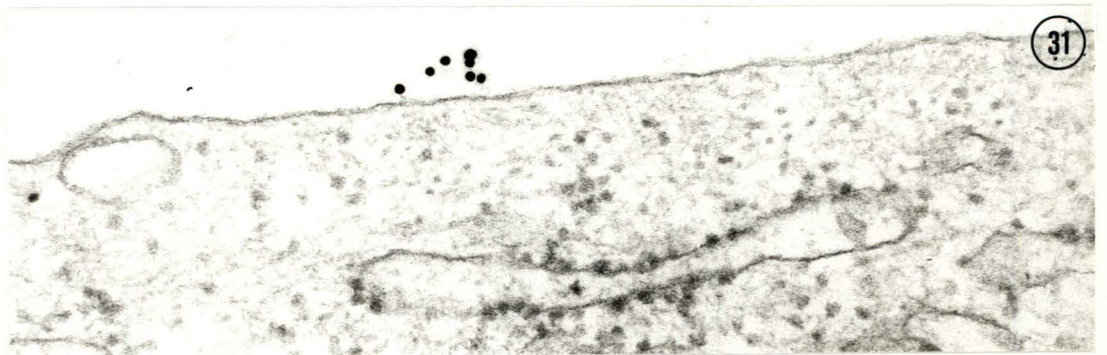
28



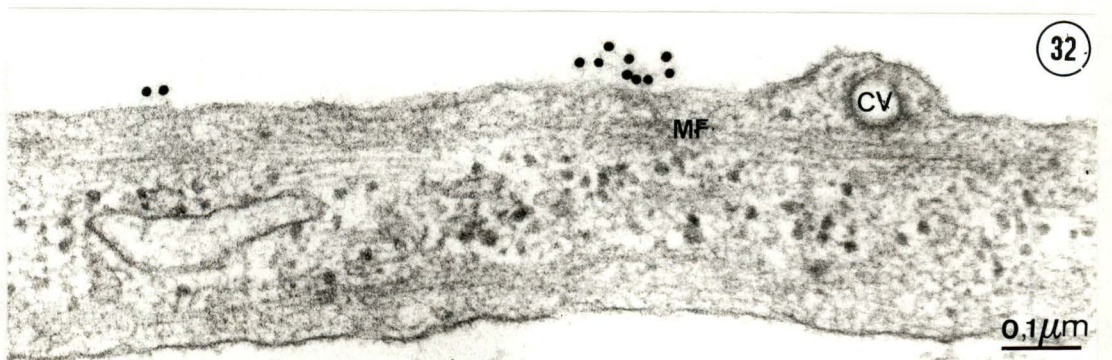
29



30



31



32

0.1 μm

Nos sections sagittales présentaient très peu de particules d'or liées à leur surface.

Toutefois, nous pouvons faire les constatations suivantes:

- Les particules d'or sont généralement séparées de la MP par un espace.
- Leur nombre est variable au niveau des sites de fixation.
- Les "coated-pits" ne représentent qu'une faible proportion de la MP, ils ne semblent pas contenir un nombre plus élevé de particules que les régions non "coatées" et plusieurs sont inoccupés.

5.2. OBSERVATION DES REPLIQUES.

5.2.1. Aspect morphologique.

Aspects morphologiques de la liaison en périphérie cellulaire.

A un grossissement important (60000 x), nous pouvons discerner différents aspects morphologiques de la liaison des particules d'or, via les LDL, à la surface membranaire.

*Certaines particules sont fixées sur des régions contrastant avec le reste de la membrane; le relief de ces régions ne permet la vaporisation de platine que d'un seul côté, la zone protégée apparaît blanchâtre et détermine l'orientation à donner à la réplique.

- La configuration de ces régions est variable. Elles peuvent être arrondies, étirées ou irrégulières. (Figure 33)
- Les particules fixées à ce niveau occupent généralement tout l'espace disponible observé.

Ces particules sont plus ou moins amassées et peuvent déterminer des "sous-amas" à l'intérieur de ces amas. (Figure 35)

-Trois dispositions particulières sont moins fréquemment observées:

- + *une disposition en croissant*: la distribution des particules délimite une zone plus lisse située plus bas que le reste de la membrane; la disposition des particules est très variable: elles peuvent être disposées les unes à la suite des autres, former au contraire des amas. De plus, dans ces deux cas, la distance entre les particules peut varier. (Figures 36 et 37)
- + *une disposition linéaire*: cette disposition ne semble pas suivre la direction des éléments filamenteux sous-jacents. Les particules disposées l'une à la suite de l'autre, ou en amas localisés ou non, déterminent une droite parfaite. (Figure 38)

PLANCHE VII: Aspects morphologiques de la liaison du conjugué observé en réplique de surface.

Figure 33: Noter 3 configurations d'amas différentes: arrondi, étiré, irrégulier.

Les particules occupent tout l'espace disponible observé.

33



0.25 μ m

Les particules d'une même droite sont parfois équidistantes.

remarque: la distance séparant les particules d'or du reste de la membrane est supérieure à la profondeur de champ, et la mise au point sur les particules ne permet pas une vision nette de la membrane.

*Certaines particules sont situées dans le même plan que la membrane (la zone blanchâtre observée précédemment n'apparaît pas).

Ces particules sont généralement isolées les unes des autres et occupent une partie plus ou moins grande de la surface. Elles peuvent se rassembler par endroits. On peut également les observer à proximité d'amas surélevés. (Figure 34)

*Des particules isolées et surélevées sont situées sur une structure d'un diamètre légèrement supérieur au leur. (Figure 35)

Au grossissement utilisé pour l'étude de l'effet de la concentration des LDL sur leur liaison aux CE, nous n'avons pu discerner de manière suffisamment rigoureuse ces différents aspects morphologiques.

Nous avons cependant observé une différence majeure entre les répliques de cellules fixées après une incubation, avec les LDL conjuguées, d'1 heure à 4°C, et les répliques des cellules fixées après cette même incubation à 4°C prolongée par une incubation de 2 minutes à 37°C.

A 37°C, les cellules présentent une surface granuleuse et régulière, sauf en certains endroits où l'on observe des zones plus lisses, assez sphériques et de taille allant de 150 nm à 450 nm (avec les réserves faites au § 4.2.). L'étude du conjugué pour ces répliques n'a pas révélé de liaison particulière dans ces domaines. (Figure 40)

A 4°C, les cellules présentent également des zones plus lisses, mais plus grandes et plus fragiles que les zones observées à 37°C, et d'une taille allant de 450 à 600 nm (avec les réserves faites au § 4.2.). (Figure 39)

Etude de la configuration du conjugué à la surface cellulaire.

-Les particules ont été photographiées en périphérie cellulaire. Nous pouvons distinguer la périphérie cellulaire et la limite cellulaire elle-même.

Dans ces deux espaces, nous avons pu observer, ensemble ou séparément, des particules isolées ou en amas. (Figures 41 et 42)

-En bordure cellulaire, nous observons des zones lisses et d'autres au relief

PLANCHE VIII: Aspects morphologiques de la liaison du conjugué observé en réplique de surface.

Figure 34: Les particules peuvent être isolées sur la surface membranaire. La plupart des particules représentées ici sont dans le même plan que la membrane; noter cependant une particule isolée avec son cône d'ombrage.(flèche)

Figure 35: Les amas de particules peuvent être décomposés en "sous-amas". Noter, dans la partie supérieure de la photo, une structure plus lisse présentant des particules ombrées et non ombrées.



PLANCHE IX: Disposition particulière des particules à la surface.

Figure 36-37: Les particules semblent entourer une région plus lisse de la membrane.

Figure 38: Un amas de quatre particules qui se succèdent (tête de flèche)

5?

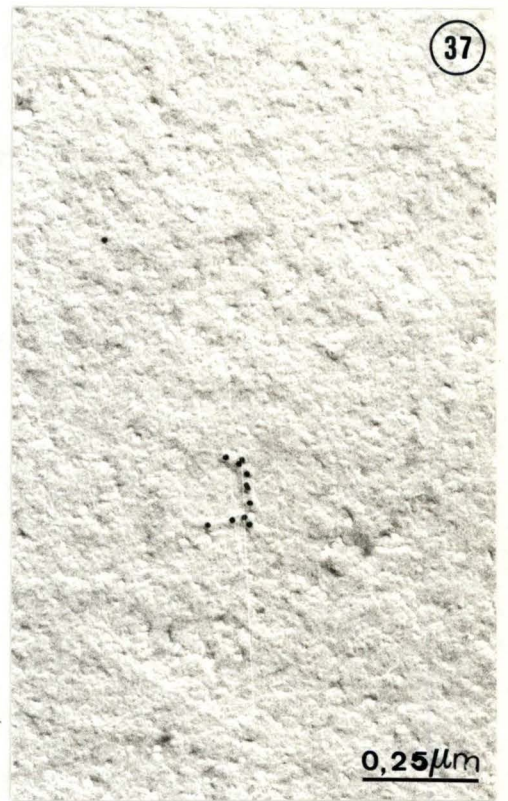


PLANCHE X: Aspects de la membrane cellulaire à 4°C et à 37°C.

Figure 39: A 4°C, la surface est homogène.

Figure 40: A 37°C, on observe des domaines plus lisses de 150 à 450 nm. (flèche) sur un "fond" de même aspect que celui observé à 4°C.



PLANCHE XI: Caractérisation de la répartition topographique du conjugué à la surface cellulaire.

Figure 41: Observer un amas de particules regroupées en périphérie sur une structure membranaire.

Figure 42: Particules isolées en périphérie cellulaire. Noter la présence de particules sur les interdigitations (flèche) de la membrane.



Planche XII : Aspects membranaires particuliers.

Figure 43-44, les particules semblent se lier aussi bien dans des régions plus lisses que dans des régions moins régulières.

Figure 45 Noter la présence de particules sur des prolongements filiformes extracellulaires. Ces particules sont regroupées en amas et présentent une zone d'ombrage.



PLANCHE XIII: Répartition topographique à la surface cellulaire.

- Figure 46:
- La flèche donne l'orientation de l'ombrage, on observe le noyau plus lisse avec son nucléole proéminent; la zone intermédiaire des cavités; la zone périphérique et ses prolongements.
 - Les cercles indiquent la présence de particules.
 - Les têtes de flèche indique les amas de plus de quatre particules.

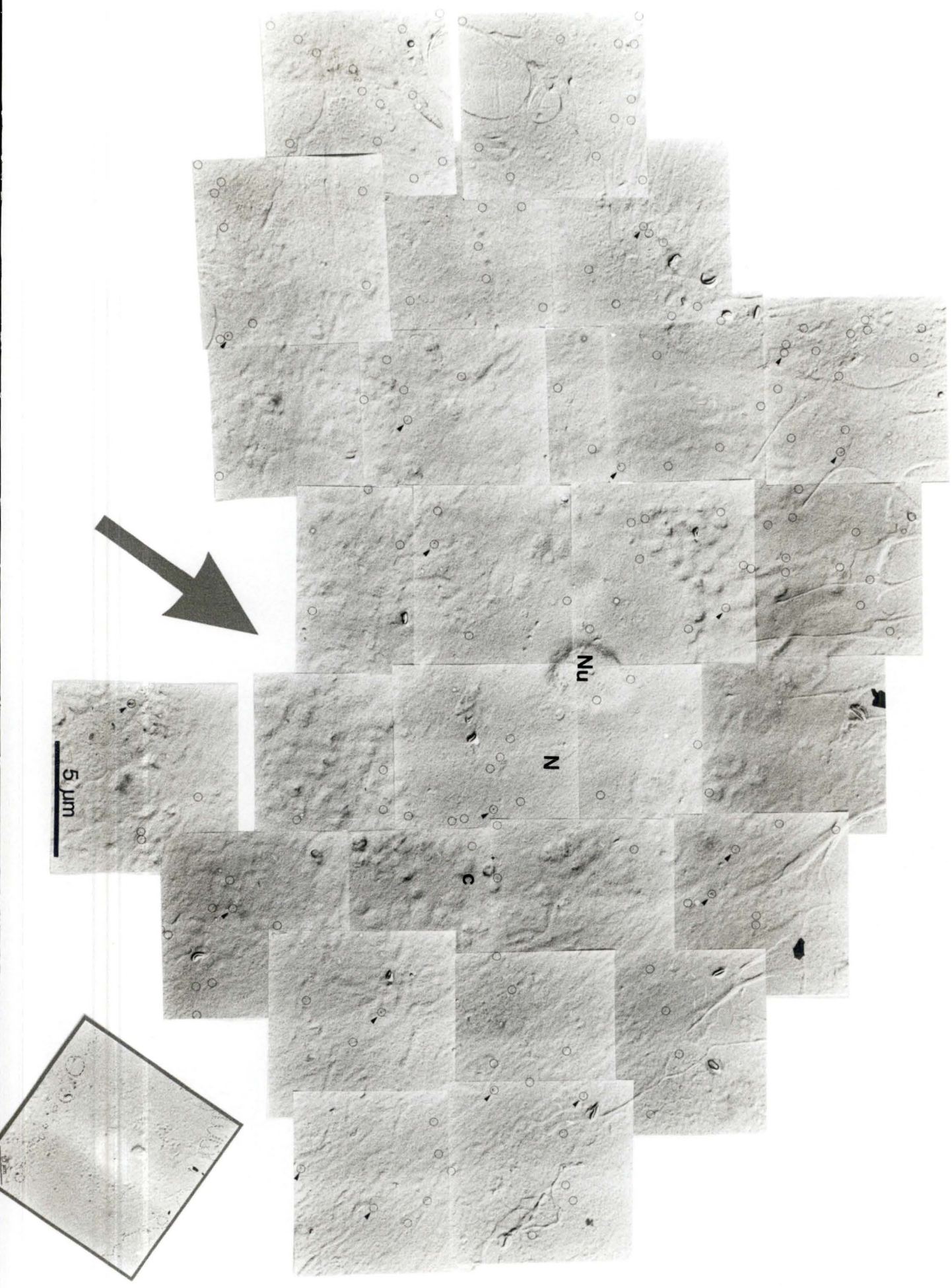


PLANCHE XIV :

Figure 47: Surface étudiée pour le comptage des particules.

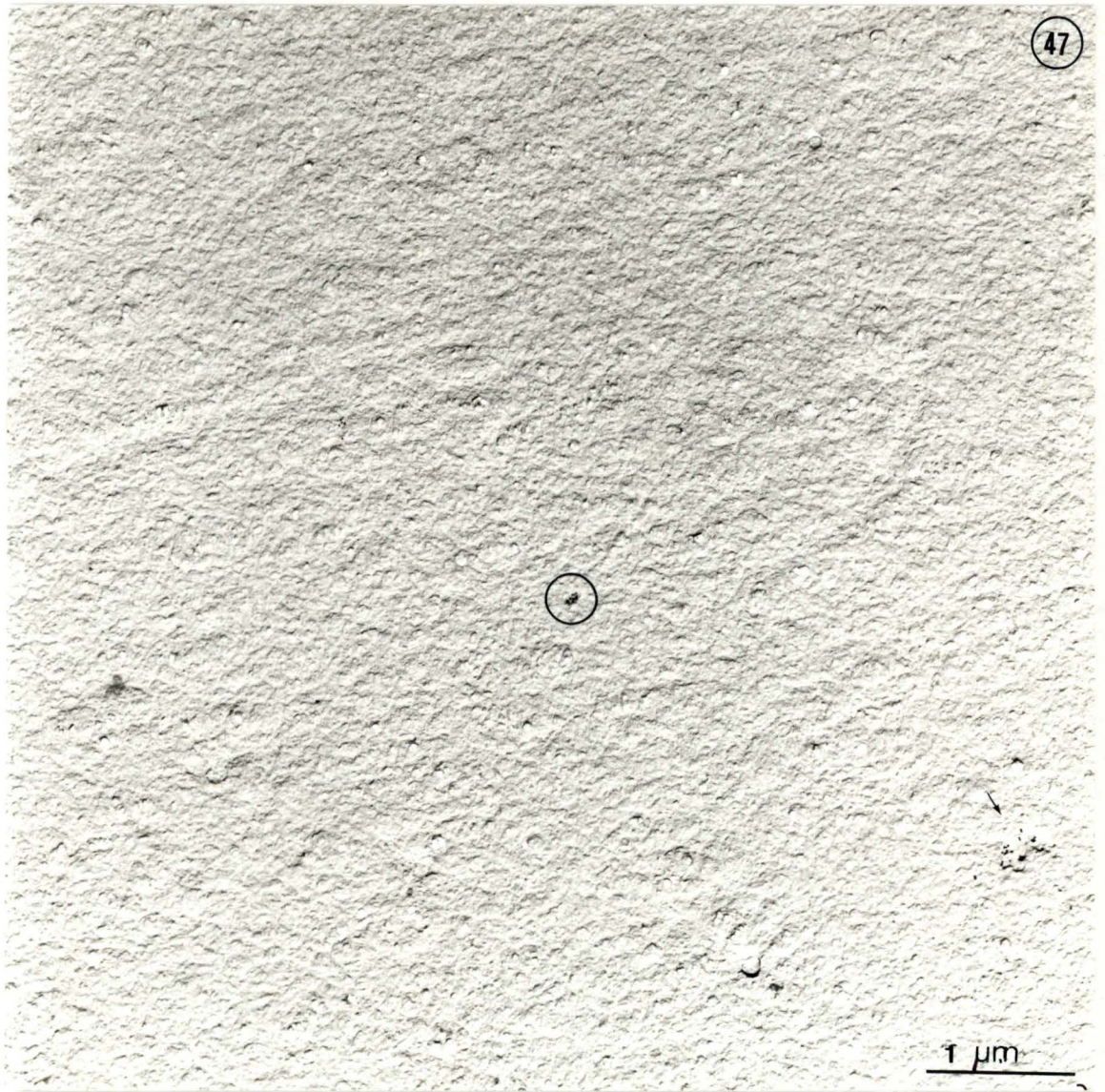


TABLEAU II:

Effet de la concentration en conjugué (ug/ml) sur la taille des amas. (résultats des "tests")

CONCENTRATIONS en conjugué (ug/ml)		.2,5		5		10		15		20		30	40	50
N° Expérience		6T4	23T4	2T4	24T4	7T4	8T4	19T4	20T4	21T4	25T4	13T4	22T4	11T4
Nombre total de particules		493	307	336	356	929	1140	932	329	454	814	1400	1280	1164
TAILLE DES AMAS (nombre de particules/amas).	1	139	73	82	79	135	247	125	107	91	164	184	245	59
	2	53	24	17	21	57	124	29	18	16	50	55	50	21
	3	26	8	11	13	31	53	18	4	6	19	28	22	10
	4	16	4	5	5	8	17	16	7	6	15	18	5	3
	5	5	3	4	3	10	16	6	1	8	8	10	7	3
	6	4	3	4	6	8	8	9	2	3	2	3	4	1
	7		1		2	9	7	6		2	3	6	4	2
	8			2	1	8	10	3		2	2	3	1	3
	9	3	3	1		4	3	6		1	2	1	7	5
	10					3	1	3		2	3			5
	11		1	3	1	2	2	3	2	1	1	5	3	1
	12			1		2		1	2	1	1	3	7	1
	13	1			1	3	1	3	1	1	1	2	2	2
	14		1			1	1	1				2	2	2
	15					3	1	3	1			3	2	1
	16					2	1	1		1		2	3	2
	17	1				2	1	2	1	2	1	1	1	1
	18					1		1		1		3	3	
	19				1	2		1		1	1	1	1	2
	20					2		2		2		1	2	1
	21					1		2		2		2	2	2
	22											2	2	1
	23			1									1	1
	24					1		3			1		1	1
	25											2	1	1
	26				1					1				1
	27				1		1	1				2		1
	28											2		1
	29								1					1
	30													1
	31			1							1			2
	32													2
	33												2	
	34												1	
	35												1	
	36											2		1
	37											1		2
	38									1				1
	39													
	40								1					
	41													
	42													
	43											1		1
	44													
	45													
	46													
	47													1
	48													
	49											1		2
	50													
	51													
	52													
	53													
	54													1
	55											1		
	56											1		
	57													
	58													
	59													1
	60					1								
	61													
	62													
	63													
	64													
	65													
	66										1			
	67													
	68													
	69												1	
	70													
													110	88

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CONJUGUE ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
SUR LE NOMBRE DE PARTICULES LIEES A LA SURFACE CELLULAIRE

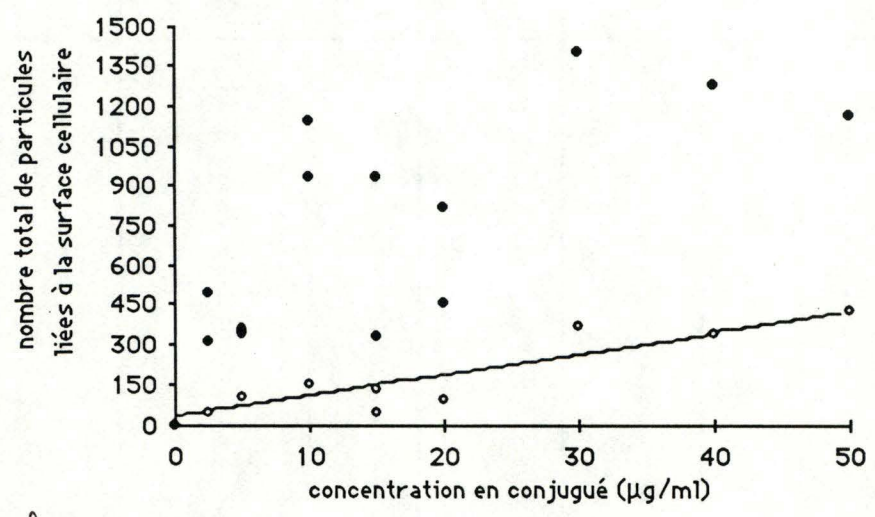
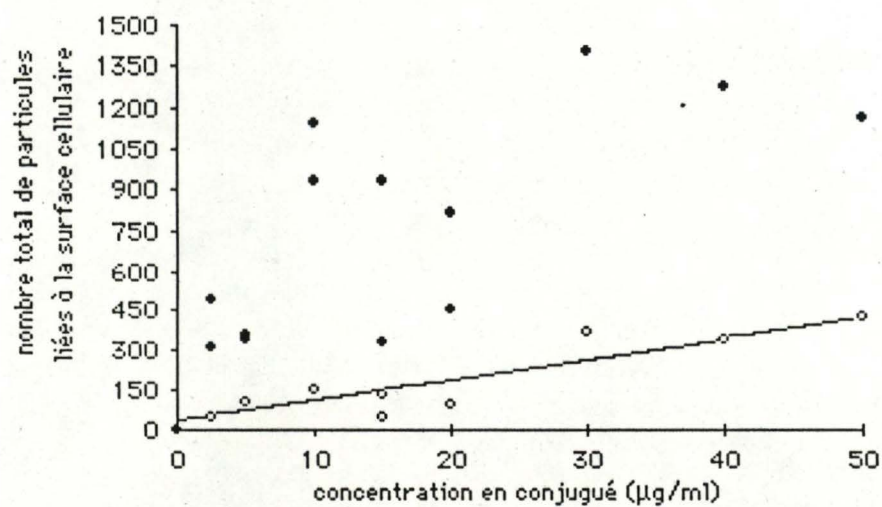


figure 47

- liaison totale (test)
- liaison non spécifique (contrôle)

NOMBRE TOTAL DE PARTICULES LIEES

A LA SURFACE CELLULAIRE



- exprime la liaison totale (comptage sur les tests)
- exprime la liaison non spécifique (comptage sur les contrôles)

le comptage est effectué sur 12 photos de 15×15 cm, soit, au grossissement utilisé $12 \times 57.4 \mu\text{m}^2$.

Les particules sont donc comptées sur une surface de $688.8 \mu\text{m}^2$.

Figure 47: Influence de la concentration en conjugué ($\mu\text{g/ml}$) sur le nombre de particules liées à la surface cellulaire

plus marqué; les particules ne semblent pas interagir préférentiellement avec l'une de ces deux zones. (Figures 43 et 44)

-Des particules peuvent être présentes sur des prolongements filiformes extracellulaires (à ce niveau, elles sont généralement regroupées en amas proéminents) (Figure 45) et sur les ponts intercellulaires.

5.2.2. Etude de la répartition des amas à la surface cellulaire.

La surface de toute une cellule a été reconstituée à partir de photos prises à un grossissement initial de 3300 x (grossissement final = 19800 x). (Figure 46)

Répartition des amas à la surface cellulaire.

Nous avons essayé de déterminer la répartition des amas -sans tenir compte de leur taille - à la surface de cette cellule.

amas = groupe de particules.

taille de l'amas = nombre de particules dans un amas.

Un test de Poisson, visant à déterminer le type de distribution des particules, n'a pu être effectué. C'est de manière intuitive, par conséquent, que nous avons assimilé cette répartition à une répartition homogène.

Localisation des amas de particules à la surface cellulaire.

Nous remarquons que les amas de particules se lient dans les trois zones décrites au § 1.3.3.1.

5.3. ETUDE DE LA LIAISON DES LDL AUX CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CONJUGUE.

5.3.1. Influence de la concentration en conjugué sur le nombre de particules d'or liées à la surface cellulaire.

Pour chaque expérience, nous avons dénombré les particules d'or présentes sur 12 photos, que ce soit pour les tests, ou pour les contrôles.

test = x µg protéines/ml de conjugué.

contrôle = x µg protéines/ml de conjugué + 500 µg protéines/ml de LDL non conjuguées.

La surface étudiée vaut 688.8 µm², soit un carré de 15 cm x 15 cm.

(Figure 47)

5.3.2. Influence de la concentration en conjugué sur la taille des amas.

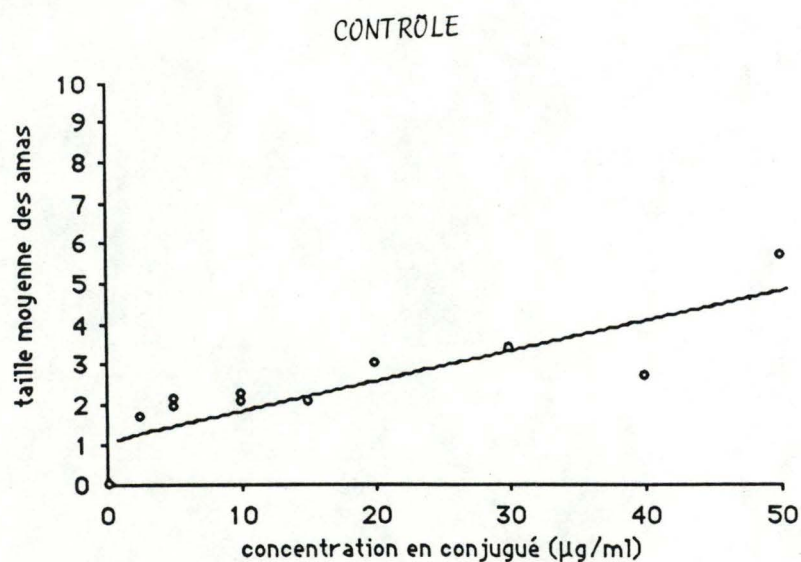
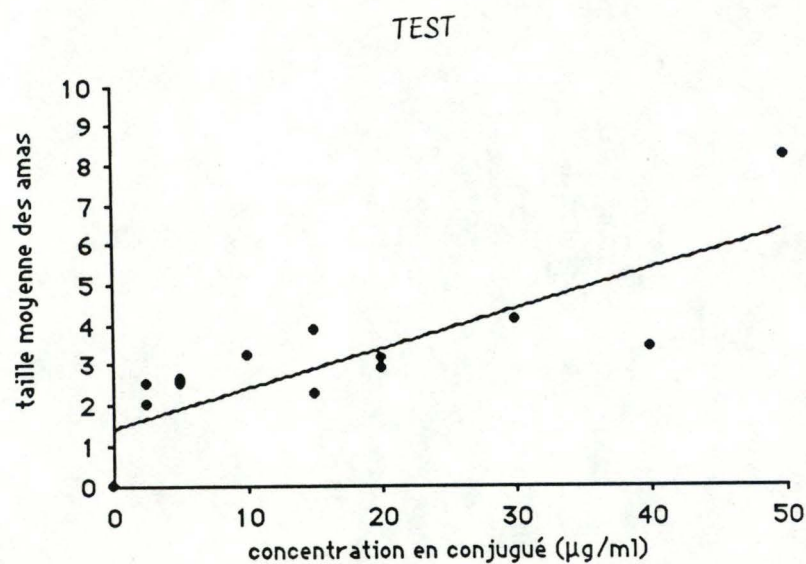
Etude de la taille des amas dans les expériences "tests" et "contrôles".

-Nous avons exprimé les résultats de nos comptage sous forme de tableaux (tableaux I et II). Pour chaque expérience, nous donnons la fréquence observée pour chaque taille d'amas.

fréquence = nombre de fois que l'on observe un amas d'une taille déterminée.

Evolution de la taille moyenne des amas dans les expérience "tests" et "contrôles"

-Nous avons également déterminé l'évolution de la taille moyenne des amas en fonction de la concentration en conjugué. Pour chaque concentration, la moyenne est obtenue en divisant le nombre total de particules par le nombre total d'amas (figures 48 et 49).



DISCUSSION

1. CULTURE DE CELLULES ENDOTHELIALES.

1.1.MISE EN CULTURE.

Certaines conditions doivent être remplies pour la réussite des cultures de cellules endothéliales humaines.

-La densité cellulaire à l'ensemencement doit être supérieure à 1.2×10^4 cellules /cm² (Gimbrone et al., 1974).

-Un délai de 8 à 24 heures permet d'augmenter le pourcentage de succès de la mise en culture de 40% à environ 80 à 90% respectivement (Balconi et al., 1983).

Un délai de 18 heures environ a été respecté pour nos mises en culture; nous estimons nos pourcentages de réussite à 80%.

-La densité cellulaire à l'ensemencement est de l'ordre de 1×10^4 cellules/cm², et à confluence de 4×10^4 cellules/cm².

-L'utilisation d'un substrat de gélatine permet d'accroître l'efficacité de l'ensemencement. Sur le substrat, les cellules présentent un taux d'adhésion supérieur, ainsi qu'un étalement favorable à la prolifération.

Jaffe avait signalé le rôle favorisant de la gélatine pour l'adhésion des cellules au substrat de la culture sans en donner la moindre explication (Jaffe, 1980).

Lors de précédentes études sur des CE d'aorte bovines, Matagne avait supposé que la gélatine agissait grâce à sa structure présentant des sites d'attache pour les protéines membranaires (Matagne, 1984).

-L'addition du sérum dans le milieu de culture permet un apport important de facteurs de croissance

1.2. CARACTERISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN MICROSCOPIE

OPTIQUE

1.2.1. Microscopie optique à contraste de phase.

Nos observations correspondent à celles décrites dans la littérature par Haudenschild (Haudenschild, 1976; Haudenschild, 1984) et Jaffe (Jaffe, 1984).

- Nous avons constaté que la croissance cellulaire était plus rapide si lors de la mise en culture, les cellules étaient groupées en petits amas.
- Après 24 heures, nous avons pu caractériser l'organisation d'un amas: les cellules centrales sont fusiformes et régulières, elles s'étalent à la périphérie où elles tendent à perdre leur régularité.
- En culture post-confluente, nous avons également observé des zones de "sprouting", c'est à dire de prolifération cellulaire sous la monocouche. Ce phénomène constitue une exception à l'inhibition de contact.

In vivo, on ne connaît pas cette particularité qui pourrait être due aux conditions suboptimales de culture; il est également possible que le "sprouting" représente une variation de disposition de l'endothélium (Haudenschild, 1984).

1.2.2. Microscopie optique à fluorescence.

L'antigène d'un des deux constituants du complexe du facteur VIII de la coagulation, le facteur de Von Willebrand (VIII:R), est reconnu comme marqueur spécifique des CE. Celles-ci constituent, en effet, le seul type cellulaire responsable de sa synthèse. Sa présence peut être démontrée par immunofluorescence indirecte.

Le facteur de Von Willebrand participe à l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène de la membrane basale. C'est un complexe glycoprotéique synthétisé au niveau des CE.

Récemment Wagner et al. (1982) ont démontré la localisation de ce facteur principalement dans les corps de Weibel-Palade, attribuant par conséquent un rôle de stockage du facteur à ces organelles resté longtemps énigmatiques.

dans

1.3. CARACTERISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN MICROSCOPIE

ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.

1.3.1. Section transversale.

L'aspect des cellules et de leurs organites nous semble correspondre à celui qui a été décrit par plusieurs auteurs.

Mais les observations les plus frappantes sont sans nul doute:

- le nombre impressionnant de vésicules d'endocytose en périphérie cellulaire.
- la présence de ribosomes libres en amas.
- l'abondance des éléments du cytosquelette.
- la présence des corps de Weibel-Palade.

1.3.2. Section sagittale.

Les aspects les plus marquants sont:

- la variabilité dans la disposition et le nombre de microfilaments
 - le RER plus haut que large.
 - la présence de vésicules d'endocytose au niveau des prolongements.
- Ceux-ci s'ouvrent sur les deux faces de la cellule.

1.3.3. Caractérisation des répliques.

Nous avons été frappés par la présence systématique d'une zone intermédiaire de "cavités" ceinturant le noyau.

Cette zone intermédiaire a été décrite par Robenek sur des macrophages en culture; il y notait une distribution spécifique de LDL acétylées conjuguées à l'or (Robenek, 1986).

Nous nous sommes interrogés sur l'origine de ces cavités: ne pouvaient-elles pas être artéfactuelles?

Nous avons émis trois hypothèses:

- a. La fixation sans passer par le tétr oxyde d'osmium altère les membranes.
 - b. Le passage par le point critique fragilise la membrane et les éléments sous-jacents.
 - c. Un mauvais étalement de la réplique sur la grille entraîne sa rétraction.
- a. Suite à des expériences déjà réalisées au laboratoire, il ressortait que les répliques post-fixées au tétr oxyde d'osmium se détachaient beaucoup plus lentement: après 7 ou 8 jours dans le NaClO 1%, alors que les répliques non post-fixées se détachaient après 2 ou 3 jours.

Comme d'autre part, l'analyse des photos ne peut se faire, pour des raisons pratiques, qu'environ 15 jours après les expériences, il était important de gagner le maximum de temps.

C'est pourquoi, nous avons tenté de visualiser l'effet du tétr oxyde d'osmium sur les cellules: 4 boîtes de cellules à confluence, issues d'un premier repiquage, ont été traitées de la manière suivante:

- 2 boîtes ont subi une fixation avec de l' OsO_4 , une pour l'observation des répliques, l'autre pour l'observation en section transversale.
- 2 boîtes ont subi une fixation sans OsO_4 suivie des mêmes observations.

Nous avons pu en déduire les considérations suivantes:

*L'observation des répliques nous confirme que la fixation sans OsO_4 est responsable de l'apparition ou de l'amplification des cavités ceinturant le noyau.

Il ne semble pas y avoir de modifications dans la zone périphérique.

Par contre, nous avons noté l'apparition d'un nombre assez important de cellules présentant des "microvillosités" (Briffeuil, 1985). Celles-ci semblaient plus abondantes au niveau du noyau, qui est par ailleurs moins marqué lorsqu'il y a eu post-fixation.

La post-fixation à l' OsO_4 diminue le contraste des différentes structures.

*L'observation des sections transversales nous permet de conclure que la cellule, en général, ne montre pas de signes de souffrance (Figure 50). Cependant, dans certaines cellules, nous avons observé que:

- les cables d'actine sous-tendant la membrane ont tendance à disparaître et donnent à cette dernière un aspect alvéolé.
- le cytoplasme et ses organites sont atteints à des degrés divers.
- l'examen des vacuoles nous montre que les vacuoles claires aux électrons ont disparu, des vacuoles "réfringentes" foncées apparaissent dans le cytoplasme ou dans des vacuoles peu denses.

Il est donc clair qu'une fixation sans OsO_4 n'est peut-être pas le meilleur choix pour l'observation des répliques cellulaires. Cependant, elle n'est pas non plus tout à fait mauvaise.

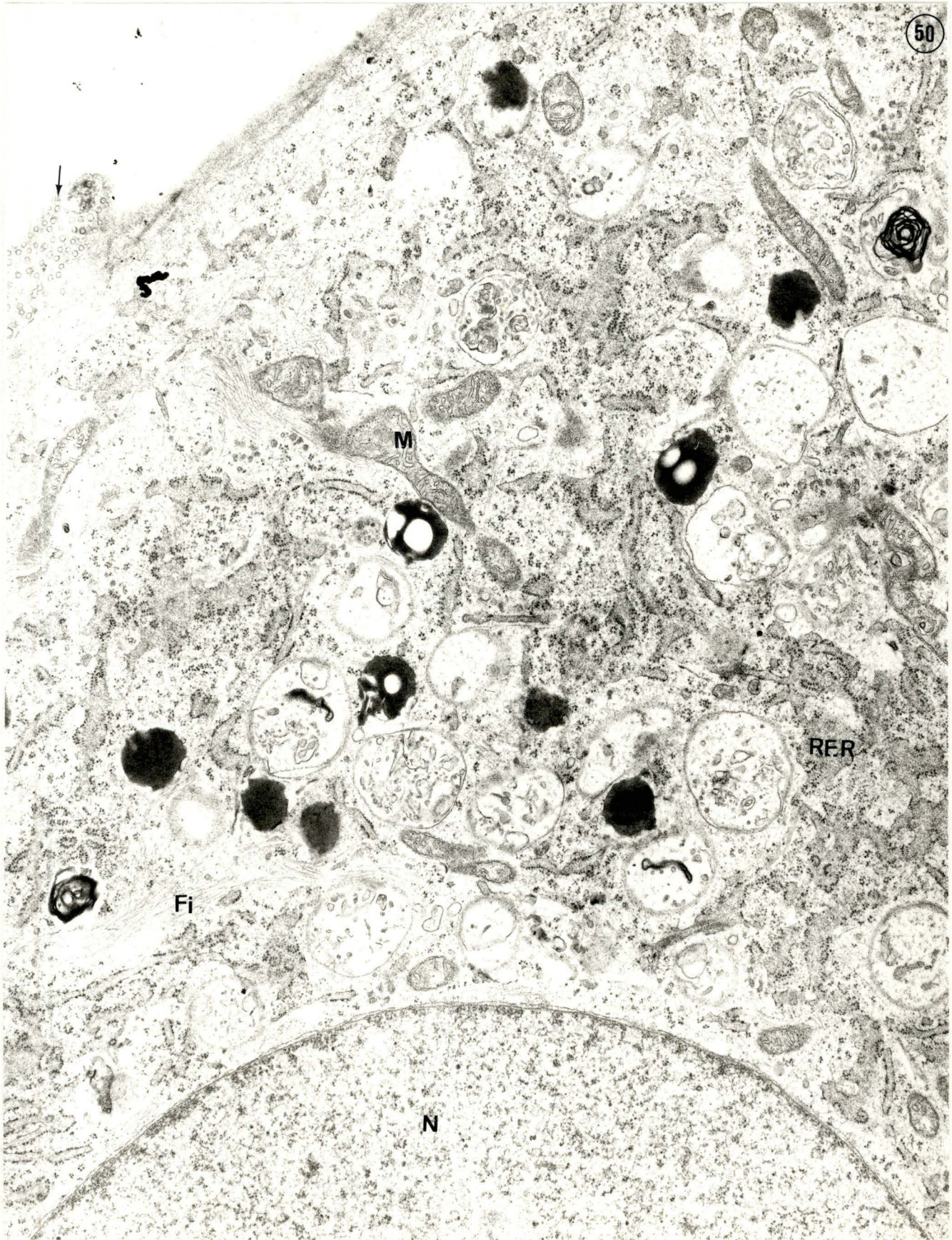
La disposition des cavités autour du noyau nous amène à supposer qu'il pourrait s'agir de vacuoles; mais, de plus amples informations seraient nécessaires pour confirmer, infirmer ou nuancer cette hypothèse.

Notamment, ^{grâce à une} l'étude ^{comparative} spécifique des relations de structures cellulaires observées en répliques et en sections ultrafines.

Nous remarquons également, dans les cellules endothéliales, que la

PLANCHE XV : Fixation d'une cellule endothéliale sans tétr oxyde d'osmium

Figure 50: La cellule apparaît bien préservée.
Les doubles membranes nucléaires et mitochondriales sont bien visibles.
Noter les filaments intermédiaires (Fi) qui parcourent le cytoplasme.
Le réseau de réticulum endoplasmique rugueux (RER) perd progressivement ses ribosomes.
Noter les vacuoles à contenu lipidique.
Remarquer l'importance du système vésiculaire (flèche).



M

RER

Fi

N

disposition des organites est périnucléaire; en périphérie, on trouve des ribosomes libres et des éléments du cytosquelette; ceci pourrait également expliquer la formation des cavités.

b. Afin de voir si le passage par le point critique fragilisait davantage les cellules, un séchage à l'air a été effectué en parallèle avec des cellules séchées par le point critique (ces cellules proviennent d'une même boîte coupée en deux après les bains d'alcool).(Figures 51 et 52)

Bien que nous n'ayons réalisé qu'un test, l'aspect de la surface des cellules de ces deux expériences ne semble pas différent.

Le même test sur des cellules post-fixées à l' OSO_4 n'a pas été effectué.

c. Il est certain qu'un mauvais étalement sur les grilles est à l'origine de plissements de la réplique ayant pour effet d'en augmenter les reliefs: ceci est également observé lorsqu'une réplique se rétracte lors de l'observation au microscope .

Néanmoins, ces rétractions ne sont qu'accidentelles et la description des trois zones de la cellule s'est retrouvée lors de chaque expérience.

2.LES LIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE.

2.1. LE GRADIENT DE DENSITE.

Depuis les premières études *in vitro* sur la liaison et la dégradation des LDL sur les cellules en culture, de nombreux auteurs ont isolé des lipoprotéines en vue d'étudier leur métabolisme dans différents tissus.

Les méthodes utilisées jusqu'alors, flottaison séquentielle (Havel et al., 1955) et ultracentrifugation en gradient de densité (Redgrave, 1975; Chapman et al., 1981), présentaient des inconvénients majeurs: d'une part, le volume de plasma était limité, et d'autre part, le temps de centrifugation nécessaire pour obtenir une séparation suffisante des lipoprotéines était de 24 à 48 heures; on pouvait alors craindre un détérioration des LDL.

Chung a développé une méthode rapide utilisant un gradient de densité discontinu dans un rotor vertical (Chung et al., 1980). En dépit de la rapidité de la séparation, cette méthode permettait seulement de préparer de petites quantités de lipoprotéines qu'il fallait reconcentrer par la suite.

PLANCHE XVI: Aspect des cellules séchées au point critique et à l'alcool.

Figure 51: Les cellules séchées par la méthode du point critique présentent 3 zones caractéristiques: région nucléaire, région intermédiaire des cavités et région périphérique filamenteuse.

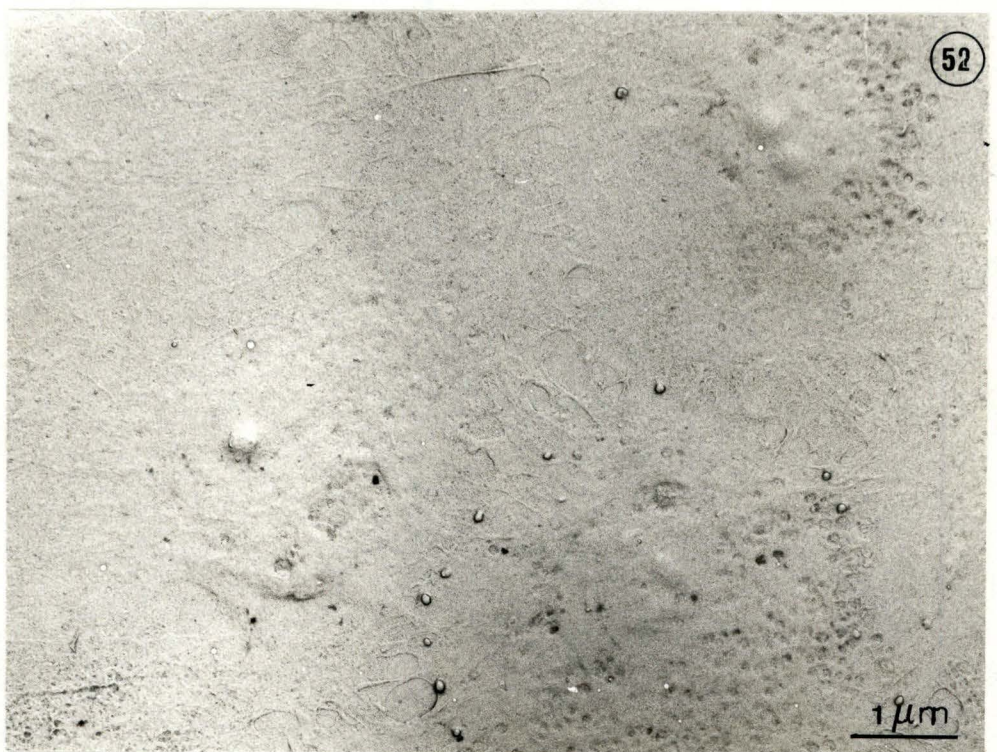
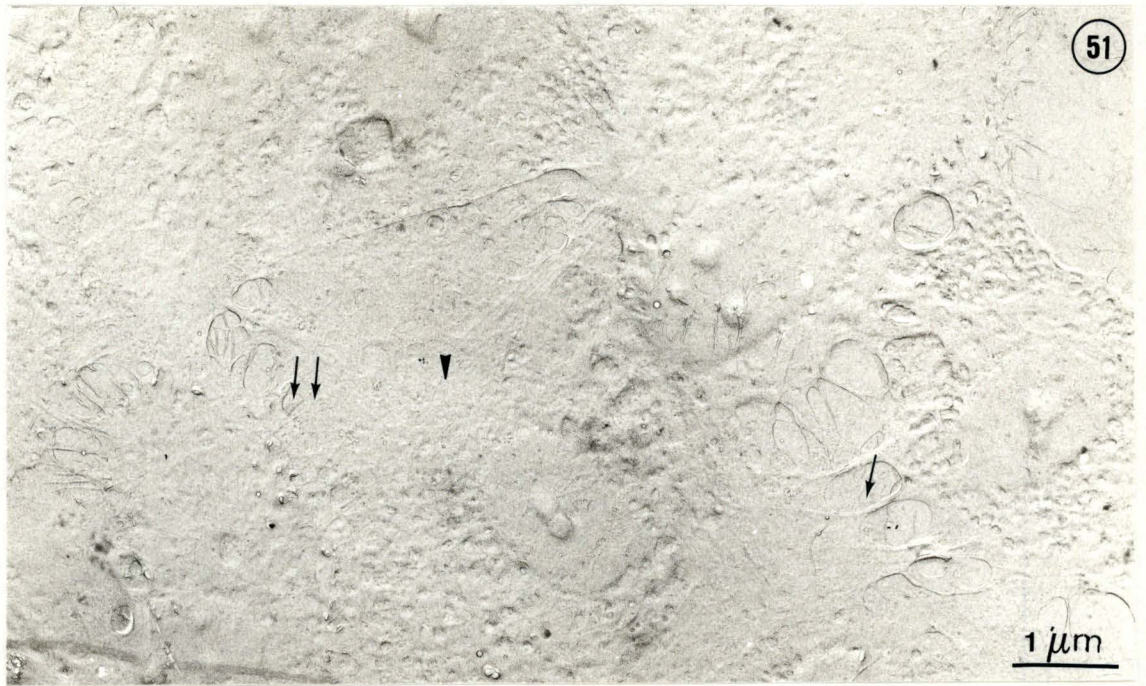
Les zones de contact entre les cellules sont variables:

parfois les prolongements sont visibles (flèche)

parfois les cellules sont très interdigitées. (double flèche)

parfois les limites entre les cellules sont à peine discernables.(tête de flèche)

Figure 52: Les cellules séchées à l'alcool présentent des caractéristiques similaires.



Nous avons appliqué les modifications apportées à cette méthode au laboratoire (Poumay and Ronveaux-Dupal, 1985). Ces modifications ont permis d'une part, de préparer en 24 heures des volumes plus intéressants de LDL concentrées, et d'autre part, d'obtenir du sérum déficient en lipoprotéines (LPDS) que nous avons utilisé en préincubation, pour stimuler les cellules à produire des récepteurs.

L'aspect de nos préparations est conforme à la description mentionnée

2.2. DOSAGE DU CHOLESTEROL ET DES PROTEINES.

En ce qui concerne la distribution de la concentration en protéine et en cholestérol dans les différentes fractions du gradient, nous remarquons que les pics de ces deux substances se superposent.

Ces pics correspondent aux 3 classes de lipoprotéines retrouvées dans le gradient, leur caractéristiques correspondent à celles décrites dans la littérature (Assmann, 1982):

- fractions 2 à 4 :VLDL, la quantité de protéines est égale à celle de cholestérol.
- fractions 16 à 21: LDL, la quantité de protéines est inférieure à celle de cholestérol.
- fractions 26 à 33: HDL, la quantité de protéines est supérieure à celle de cholestérol.

De plus, nous remarquons une forte augmentation de la concentration en protéines dans les dernières fractions; celles-ci sont probablement des protéines contaminantes du plasma, type albumine.

2.3. OBSERVATION DES LDL EN COLORATION NEGATIVE.

Cette méthode nous permet d'apprécier le degré de purification des LDL. Elle est basée sur un critère de taille. La photo montre que les 3 classes de LP sont significativement différentes (Poumay and Ronveaux-Dupal, 1985). Dans les LDL, on peut remarquer une légère hétérogénéité au niveau de la taille. En effet, le diamètre moyen des LDL varie fortement d'un individu à l'autre, et de plus, les LDL présentent une polydispersion dans leur taille (Forte and Nordhausen, 1986). De récentes études basées sur la taille et la densité en ultracentrifugation verticale ont révélé l'existence d'au moins 6

sous-espèces de LDL (Krauss and Burke, 1982).

La coloration négative permet également d'observer la forme des LDL. Il est généralement admis qu'elles présentent une morphologie proche de la sphéricité. Cependant certains laboratoires ont souligné que les particules n'étaient pas toujours sphériques .

Le degré d'hydratation ainsi qu'un certain degré d'aplatissement, survenant ou non durant la coloration négative, peuvent mener à une surestimation du diamètre.

2.4. INFLUENCE DE L'ULTRACENTRIFUGATION SUR LES PROPRIETES DES LDL.

L'association des lipides et des protéines constituant les LP est dépendante d'un grand nombre d'interactions non covalentes de faible énergie.

Bien que les forces de cisaillement auxquelles sont soumises les LP durant l'ultracentrifugation ne sont pas plus importantes que celles dues à la diffusion, les forces ioniques et la pression élevée qui s'exercent sur elles peuvent cependant les altérer (ceci a surtout été montré pour les apo-E et les apo-A et -I). Les modifications pouvant altérer les propriétés des LDL sont d'ordre physique et chimique (Kane, 1986)

3. LA SOLUTION D'OR COLLOIDAL

3.1. MESURE DE LA TAILLE DES PARTICULES.

La taille des particules d'or est déterminée par la concentration en réducteur, c'est à dire dans la méthode suivie, le citrate de sodium.

Selon cette méthode, des particules d'or de 16 à 150 nm ont été obtenues en diminuant la concentration en citrate de Na (Frens, 1973).

Les solutions d'or colloïdal obtenues par cette méthode présentent des colorations différentes s'étalant de l'orange (Au_{16}) au rouge (Au_{25-71}) et au violet (Au_{98-147}).

L'addition de 1.6 ml de citrate de Na 1% donne des particules de 16 ± 1.1 nm (Frens, 1973).

Les tailles obtenues (13.31 ± 1.7 nm) sont donc inférieures à celles prédites et d'autre part, notre solution d'or colloïdal est rouge alors que l'on

s'attendrait à une coloration orangée pour les particules de cette taille.

Nous pensons à quelques explications plausibles:

- Ne disposant pas de grille standard, nous avons effectué les mesures avec une loupe graduée au dixième de mm sur des photos agrandies 60000 x. Ces deux facteurs ne peuvent expliquer une si grande différence; en effet, au TEM Philips 301, les variations seraient de l'ordre de 6%, c'est à dire comparables aux erreurs de mesures elles-mêmes.
- La propreté de la vaisselle pourrait être un des facteurs responsables de cette divergence. En effet, de petites quantités de contaminants peuvent interférer avec la formation, sur la vaisselle, de particules d'or d'une taille donnée (Horisberger, 1977). Certains auteurs préconisent de siliconer les tubes (Goeghegan, 1975), d'autres estiment cette précaution inutile si la vaisselle est rincée abondamment avec de l'eau bidistillée. La reproductibilité des résultats est améliorée si la même vaisselle est utilisée (Horisberger,

3.2. PROPRIETES ET CARACTERISTIQUES DE L'OR COLLOÏDAL.

L'or colloïdal est un colloïde lipophile consistant en un centre d'or, la particule elle-même entourée par une série de couches d'ions adsorbés, et dont la présence est considérée comme étant responsable de la charge négative et de la stabilité du colloïde.

Ces ions créent un potentiel responsable de la répulsion électrostatique qui existe lorsque deux couches de deux particules se recouvrent. Lorsqu'on ajoute suffisamment d'électrolytes, la couche autour du noyau est comprimée et permet aux deux particules de se rapprocher; si elles s'approchent au-delà d'un point critique, il y a cohésion et flocculation des particules.

4. LE CONJUGUE LDL-OR

4.1. DOSAGE DES PROTEINES DU CONJUGUE.

Remarque: l'hétérogénéité de la concentration des protéines des LDL provient uniquement de la manière dont les LP ont été fractionnées en aliquots et rassemblées par la suite.

Nous remarquons une très grande hétérogénéité de la concentration en protéines dans le conjugué. Nous avons essayé d'établir les causes possibles de variations; deux paramètres ont été étudiés:

- La température de centrifugation*: nous remarquons qu'aux températures les plus froides, nous avons les concentrations en protéines les plus élevées.
- L'âge des LP et celui de la solution d'or colloïdal*: pour nos expériences, ce facteur ne semble pas avoir eu d'influence.

Un des paramètres non mesuré est la taille des particules d'or colloïdal. Elle peut intervenir pour des questions d'encombrements stérique.

4.2. OBSERVATION DU CONJUGUE EN COLORATION NEGATIVE.

L'image caractéristique des LDL réparties autour d'une particule d'or telle qu'elle a été décrite par Handley (Handley et al, 1981) n'apparaît pas sur ces

photos.

Différentes questions peuvent se poser:

- 1° Est-ce dû à la conjugaison des LDL avec l'or, et, dans cette hypothèse, y a-t-il une relation entre la concentration en protéine du conjugué?
- 2° Est-ce dû à la technique de la coloration négative?

Pour répondre à ces questions, nous voudrions soulever quelques aspects de la nature des interactions entre les LDL et les particules d'or.

Les LDL s'adsorbent sur l'or en une couche, probablement par des forces de Van der Waals, résultant en la formation de complexes stables; elles ne présentent pas de changement apparents dans leur activité (Horisberger, 1981; Goeghegan and Ackerman, 1977).

Les LDL protègent l'or colloïdal des effets d'une augmentation en électrolytes. En effet, elles empêchent la cohésion des particules et convertissent la solution d'or colloïdal lipophile en une solution lipophile qui prend la plupart des caractéristiques de la protéine.

Différents facteurs influencent l'adsorption des protéines sur les particules d'or: la taille de la particule, les concentrations ioniques, la concentration en protéines, le poids moléculaire de la protéine et le pH de la solution.

-Une concentration ionique inférieure à 10 mM est souhaitée(De Mey, 1983).

C'est une des raisons pour lesquelles nous dialysons abondamment les LDL.

-Selon Frens, la stabilité de l'or colloïdal contre la flocculation diminue lorsque la taille des particules augmente (Frens, 1973); cependant, la taille des particules d'or peut interférer de manière plus ou moins importante avec le mécanisme physiologique étudié.

-Il y a une quantité optimale en protéines en fonction du pH (Horisberger, 1981).

Handley donne une concentration optimale de 3 µg de protéine /ml au pH 5.5. (Handley et al., 1981).

L'excès de protéines peut être enlevé lors de la centrifugation du conjugué.

-Le pH optimal pour la conjugaison des LDL à l'or colloïdal est de 5.5, il correspond au PI de la protéine la plus basique (De Mey, 1983).

Le conjugué présente également ses propres caractéristiques:

- une stabilité de \pm 24 heures.
- une stabilité à des pH extrêmes de 4 à 9.
- une stabilité à des expositions de NaCl 600 milliosmoles.

1° Peut-il y avoir une relation entre la concentration en protéines et le nombre de LDL liées à l'or?

Oui, il est d'ailleurs possible par l'emploi de protéines marquées radioactivement, d'analyser le recouvrement de l'or et des protéines à chaque instant de la préparation.

Cependant, il n'est pas possible d'observer cette relation en coloration négative; la grande hétérogénéité de la quantité de LDL liées à une particule d'or peut être à l'origine d'une mauvaise estimation du nombre moyen de LDL liées à cette particule.

Autrement dit, nous ne pouvons affirmer de manière absolue qu'une diminution de la concentration en protéines exprime une diminution du nombre de particules liées à une particule.

2° La technique et les réactifs employés dans la coloration négative peuvent-ils influencer la structure du conjugué?

Nous nous sommes posés cette question en observant des LDL isolées sur les photos, ce fait résulte peut-être d'un détachement de la LDL du conjugué. La solution de KPT présente une osmolalité de 22 mosm. elle ne devrait donc pas entraîner de déstabilisation du conjugué.

5. LIAISON DU CONJUGUE A LA SURFACE CELLULAIRE.

5.1. OBSERVATION DE LA LIAISON EN SECTION SAGITTALE.

-Le nombre de particules observées à la surface membranaire des sections sagittales est peu important. Ceci peut se comprendre si l'on sait que la largeur d'une CE est d'environ 35 à 40 μm et que l'épaisseur des coupes est de 400Å; il faudrait donc 1000 à 1200 coupes sériées pour pouvoir étudier l'entièreté de la surface cellulaire. Par ailleurs, la reconstitution de la cellule en réplique de surface nous montre la répartition du conjugué: la probabilité qu'une section sagittale passe au niveau du conjugué n'est pas très élevée. /t

-La présence de filaments sous la membrane est parfois difficile à voir; en effet, les filaments peuvent être disposés perpendiculairement à la section et d'autre part, la résolution n'est pas toujours suffisante que pour les distinguer clairement (Figures 29 et 31).

-L'espace observé séparant le conjugué de la membrane correspond en principe au diamètre de la LDL (Handley et al., 1981).

Nous observons parfois des conjugués plus éloignés de la membrane plasmique.

Nous pensons qu'il peut y avoir plusieurs explications:

*puisque le diamètre du conjugué (60 nm) est plus large que l'épaisseur de la section (40 nm), on peut se retrouver dans une situation où le conjugué apparaît très éloigné de la membrane, ou au contraire, étroitement accolé à celle-ci.

*les LDL peuvent être liées sur les bords d'une région "coatée" ou non "coatée" qui n'apparaissent pas sur la coupe.

*nous pouvons également envisager des interactions LDL-or-LDL-or... comme semble le montrer certaines images du conjugué obtenues en coloration négative.

-La variabilité du nombre de particules liées à la MP dépend de la section, par conséquent, l'étude en section sagittale, de l'effet de la concentration en conjugué sur la liaison des LDL est difficilement interprétable. Une telle étude requiert des coupes sériées et une analyse tridimensionnelle.

-L'étude des "coated-pits" à la surface membranaire nous indique que leur nombre est peu élevé; on sait, du reste, qu'il représente chez les fibroblastes et les cellules endothéliales environ 2% de la surface cellulaire (Anderson et al., 1978).

En ce qui concerne la répartition des récepteurs à la surface cellulaire, Anderson signale que 35% des récepteurs (*in situ*) sont situés dans les "coated-pits" et 65% sont répartis au hasard dans la membrane. (Mommaes et al., 1984)

La répartition du conjugué dans des régions non "coatées" nous est apparue plus importante que celle dans des régions "coatées". Toutefois, les restrictions énoncées ci-dessus ne nous permettent pas de quantifier, sur coupe sagittale, le nombre de particules d'or liées à la membrane, et d'autre part, les "coat" ne sont pas toujours clairement identifiables.

Le conjugué peut se retrouver en deux domaines de la membrane.

-1° Au niveau de "coated-pits":

Le conjugué est alors lié par l'intermédiaire d'une LDL à un récepteur (ou

plus précisément à un des 4 sites du récepteurs) situé dans le CP.

Lorsque plusieurs conjugués sont présents dans un même CP, les LDL sont liées à des récepteurs ou aux sites d'un même récepteur rassemblés au niveau de ce CP.

Le rassemblement des récepteurs au niveau du CP peut s'être produit de deux manières:

-lors du recyclage des récepteurs vers la surface membranaire, ceux-ci resteraient groupés de telle sorte qu'ils pourraient être rapidement incorporés dans des CP nouvellement formés (Robenek and Hesz., 1983).

-lors de l'incubation à 4°C, les récepteurs peuvent migrer vers les "coated-pits"; bien qu'à cette température, les mouvements latéraux des récepteurs soient généralement inhibés, les récepteurs des LDL peuvent se déplacer (Myant 1984; Goldstein and Brown, 1984).

-2° en dehors des "coated-pits":

Nous pensons pouvoir faire intervenir deux types de liaison:

*Les LDL sont liées à des récepteurs qui ne sont pas intégrés dans un "coated-pit"; il s'agit d'une liaison spécifique entre les LDL et les récepteurs. Une particule d'or pourrait donc indiquer la présence d'un récepteur, plusieurs particules d'or dans un domaine particulier pourraient indiquer un rassemblement de récepteurs à cet endroit. Cette étape pourrait précéder une migration éventuelle des récepteurs vers une région "coatée" en vue de l'internalisation.

*Les LDL sont liées à des sites de la membrane; il s'agit d'une liaison non spécifique entre les LDL et des sites de faible affinité répartis dans la membrane.

Il faut souligner que l'emploi d'un marqueur permettant de visualiser une molécule en vue de son étude peut perturber les relations que cette molécule entretient avec son environnement.

-Vasile soulignait l'importance de la sonde utilisée pour visualiser les LDL. En effet, des sondes comme l'or colloïdal augmentent le diamètre des LDL. De plus, les LDL interagissent avec les cellules cibles comme des complexes macromoléculaires et non plus comme des particules de LDL (Vasile et al., 1983).

-Handley observe occasionnellement sur des fibroblastes en culture des conjugués séparés de la MP d'une distance supérieure à 30 nm. Le diamètre du conjugué (60 nm) limite sérieusement l'endocytose fluide par les vésicules pinocytotiques (70 nm); il y a en effet des empêchements

stériques au niveau du "nid vésiculaire" (25 nm).

Par contre, le diamètre du conjugué ne semble pas limiter l'endocytose au niveau des "coated-pit" (150 à 450 nm) (Handley et al., 1981; Robenek et al., 1983). Nous pensons que ceci peut se vérifier dans certaines limites de concentration en conjugué.

5.2. OBSERVATION DES REPLIQUES.

5.2.1. Aspects morphologiques.

Nous avons discerné différents aspects morphologiques de la liaison du conjugué à la surface cellulaire.

Robenek et son équipe ont étudié la liaison et l'endocytose des LDL liées à l'or sur des fibroblastes en culture par des techniques de répliques de surface, de cryo-fracture et de cryo-décapage conjuguées ou non à des traitements à la filipine.

La filipine permet d'augmenter le contraste entre la surface lisse des "coated-pits" et la surface plus irrégulière de la membrane; elle permet de ce fait, de déterminer avec précision la distribution topographique des conjugués à la surface cellulaire.

En répliques de surface, il n'est pas toujours aisé de reconnaître clairement la structure des "coated-pits" du reste de la membrane. Ceci est particulièrement difficile dans le cas de "coated-pits" naissants. Par contre, dans la plupart des cas, on peut distinguer les aspects des autres stades par lesquels les "coated-pits" passent, du reste de la membrane. De plus, ces zones lisses présentent de légères indentations - comparables à celles observées en section sagittales - si bien que l'ombrage peut, dans des conditions favorables aider à leur identification.

Toutefois, de telles observations ne peuvent s'effectuer qu'à des grossissements importants; en effet, à faible grossissement, on peut difficilement visualiser l'ultrastructure de la surface, soit parce que le contraste entre la structure et le fond est trop faible, soit parce que les conjugués masquent la structure sous-jacente (Robenek et al., 1982).

Chez les fibroblastes, Robenek et son équipe montrent qu'après une incubation d'1 heure à 4 °C, la majorité des conjugués sont regroupés en amas, des particules en dehors de ces amas sont observés occasionnellement.

Les conjugués observés en réplique de surface non traitées à la filipine se retrouvent également préférentiellement regroupés dans des zones contrastées et des particules isolées sont rarement observées.

La distribution des particules d'or observée sur des répliques de surface semble correspondre avec la distribution des "coated-pits" observée sur des répliques et en cryo-décapage traitées avec la filipine.

Dans leurs travaux, l'équipe de Robenek n'a pu établir la présence de récepteurs pour les LDL en dehors des "coated-pits".

Une autre équipe a également étudié la liaison et l'endocytose des LDL liées à l'or, à la surface de fibroblastes en culture: Goldstein et son équipe ont, par contre observé un grand nombre de particules isolées, en dehors de zones contrastées (Goldstein et al., 1979).

La distribution des récepteurs des LDL à la surface cellulaire n'est pas encore établie.

Les idées qui se dégagent de ces deux grands groupes de recherche seraient les suivantes:

Pour le groupe de Robenek, les récepteurs apparaissent primitivement au niveau d'une région particulière de la membrane plasmique suscitant la formation d'un "coated-pit". Les récepteurs migrent ensuite dans la région centrale du "coated-pit" où ils seront endocytés. Il n'est pas possible d'établir si les récepteurs de LDL sont présents en dehors des "coated-pits"; si ces récepteurs existent, les résultats obtenus indiquent qu'ils ont une capacité très faible de liaison pour les LDL et que par conséquent, seuls les récepteurs situés au niveau des "coated-pits" peuvent lier les LDL.

Il subsiste malgré tout un certain nombre de questions:

On ignore ce qui cause précisément l'incorporation des récepteurs de LDL dans une région particulière.

-On sait que les CP sont des régions particulières à contenu en stérol peu important responsable de changements localisés dans la fluidité de la membrane et intervenant probablement dans les processus d'endocytose (Robenek et al., 1983).

-Orci a par ailleurs observé que les nouveaux CP sont formés préférentiellement dans des zone de haute activité endocytotique indiquant un couplage entre l'internalisation et le procesus de régénération (Orci et al., 1978).

- On sait également que les stérols interagissent de manière différente avec les phospholipides. Les CP pourraient donc avoir une composition différente en phospholipides du reste de la membrane.
- Les stérols peuvent interagir avec les protéines et en altérer le fonctionnement.

L'absence de stérol au niveau des CP serait importante non seulement pour le processus d'endocytose, mais elle serait probablement un prérequis pour la fonction des récepteurs.

Les récepteurs localisés en dehors des CP pourraient être inactifs du fait de leur interaction avec des zones de la membrane plasmique riches en stérol. (Robenek et al., 1982).

Pour le groupe de Goldstein, les récepteurs des LDL sont incorporés au hasard dans la membrane plasmique, puis se déplacent dans les "coated-pits" où ils se concentrent (Goldstein and Brown.).

Il est à remarquer que la liaison des LDL aux récepteurs n'est pas obligatoire pour leur déplacement vers les CP (Pearse et al., 1978).

Nos observations sur les répliques de cellules endothéliales, nous ont permis de mettre en évidence, à fort grossissement, différentes configurations des amas de particules d'or.

Un des aspects marquant est la forme de ces amas:

Si ces régions correspondent à des CP, nous sommes étonnés de ne pas toujours observer de structure arrondie. Nous pouvons supposer que

- les particules occupent toute la surface du CP et celui-ci ne présente pas une forme arrondie constante.
- les particules n'occupent qu'une petite partie du CP et le contraste est trop faible pour permettre une observation du reste de la structure.

La partie occupée pourrait être un microdomaine du CP où les récepteurs se rassemblent en vue de leur internalisation (Figure 33) ou, au contraire, des zones d'émergence de récepteurs avant leur rassemblement au centre de la structure (Figure 36).

Le comptage des particules sur nos répliques a révélé un grand nombre de particules isolées; d'autre part, à un grossissement important, ces

particules isolées sont situées soit sur de légères indentations laissant apparaître derrière elles un cône blanchâtre, soit dans le même plan que la membrane.

Le signification de l'interaction des particules avec la membrane peut être multiple.

Nous pensons que les conjugués situés sur les indentations sont probablement liés à des récepteurs isolés sur la membrane.

Nous pensons également que les particules situées dans le même plan que la membrane peuvent traduire trois types d'interactions des LDL avec la membrane plasmique:

- il pourrait s'agir d'une interaction non spécifique au niveau de sites anioniques répartis en divers endroits de la surface membranaire.
- il pourrait également s'agir d'une adsorption des conjugués sur la surface membranaire résultant d'un mauvais rinçage.
- enfin, il pourrait s'agir d'une réadsorption des conjugués sur le feuillet interne de la membrane plasmique.

Les répliques de CE observées présentent donc les deux types de répartition expliquées ci-dessus: d'une part des amas dans lesquels les particules sont plus ou moins rassemblées, d'autre part, des particules isolées.

Certaines particules isolées et ombrées semblent se condenser autour d'un amas. Il est possible que cela représente un processus de rassemblement des récepteurs vers les "coated-pits".

Rappelons qu'à 4°C les mouvements latéraux sont possibles pour les récepteurs de LDL (Myant, 1984; Goldstein, 1985).

5.2.2. Etude de la répartition des amas à la surface cellulaire.

Cette étude préliminaire était indispensable pour nous permettre de déterminer la zone cellulaire qui serait délimitée en vue de l'étude de l'effet de la concentration en conjugué sur la liaison des LDL à la membrane cellulaire. L'étude de la distribution des amas à la surface cellulaire par un test ajusté à la loi de Poisson n'a pu être effectuée pour plusieurs raisons.

taille = nombre de particules d'or observées dans un amas.

fréquence = nombre de fois qu'un amas d'une taille donnée est observé.

-Le nombre de quadrats est insuffisant: 1 quadrat = 1 photo = 57.4 μm^2

-La fréquence des amas observés est trop faible, et donne des fréquences théoriques inférieures à 5; ceci nécessite un cumul de classes. Le nombre de quadrats étant trop faible, le cumul de classes réduisait celles-ci à un nombre trop peu élevé (2 ou 3) et rendait le test peu puissant.

-Par ailleurs, l'augmentation du nombre de quadrats ($10 \mu\text{m}^2$) nous permettait d'accepter l'hypothèse nulle (H_0 = les amas sont répartis de manière homogène à la surface cellulaire) mais également avec une puissance infime.

C'est donc de manière intuitive que nous avons assimilé la répartition des amas à la surface cellulaire à une répartition homogène.

Nous pouvons encore signaler que l'étude de la répartition s'effectue en deux dimensions, or la surface cellulaire présente un certain relief; deux amas séparés d'une certaine distance peuvent l'être, en réalité, d'une distance plus ou moins grande.

La littérature a étudié la répartition de sites membranaires à la surface cellulaire ainsi que les relations que ces sites entretiennent avec les structures cytoplasmiques sous-jacentes.

Simionescu et son équipe ont mis en évidence la présence de microdomaines au niveau de la membrane plasmique d'endothélium de capillaires murins (Simionescu et al., 1981).

Ces microdomaines ont pour conséquence une distribution inégale de sites anioniques; les CP présentent la concentration la plus élevée, le plasmalemma, une concentration moindre; enfin, les vésicules et les canaux transendothéliaux en sont dépourvus.

Il est par ailleurs important de souligner que l'existence de ces microdomaines ne résultent pas d'un regroupement induit par le ligand puisqu'un marquage en post-fixation donne les mêmes résultats.

Plusieurs auteurs signalent en outre, que la cellule doit posséder un moyen qui lui permette de maintenir ces domaines et d'empêcher leur dispersion (Simionescu et al., 1981; Robenek et al., 1983).

D'autre part, il apparaît que ces sites ne sont pas distribués au hasard; en effet, ils restent confinés aux endroits favorables pour l'endocytose, probablement en relation avec des structures cytoplasmiques sous-jacentes.

5.2.3. Localisation des amas à la surface cellulaire.

Nous n'avons pas mis en évidence de domaines préférentiels pour la

liaison des LDL à la surface des cellules endothéliales en culture.

Robenek a signalé les différentes localisations pour des récepteurs différents au niveau de la surface cellulaire (Robenek, 1986).

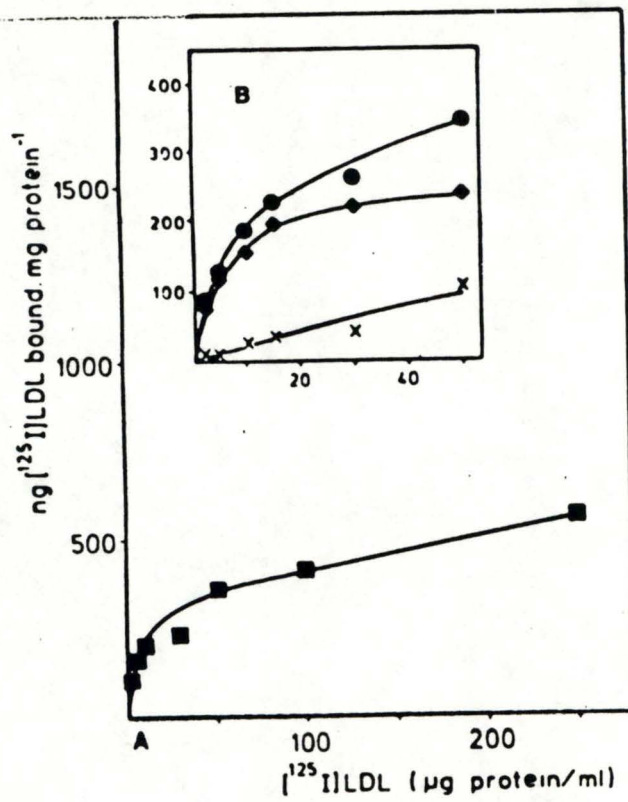


Figure 55 : Incubation de cellules endotheliales avec des LDL.

cadre B

● ^{125}I -LDL traduit la liaison totale.

x I-LDL + LDL (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) traduit la liaison non spécifique.

◆ ● - x exprime la liaison spécifique.

(Van Hinsberg, 1983)

5.3. ETUDE DE LA LIAISON DES LDL A LA SURFACE CELLULAIRE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CONJUGUE.

5.3.1 Effet de la concentration en conjugué sur le nombre de particules d'or liées à la surface cellulaire.

L'effet de la concentration en LDL sur la liaison et l'endocytose de ces lipoprotéines, a été étudié par Van Hinsberg sur des cellules endothéliales issues de l'artère ombilicale humaine. (Van Hinsberg et al., 1983)

L'étude de ces auteurs, a été déterminante dans notre démarche. Leurs expériences mettent en évidence les deux types de mécanisme pour la liaison des LDL à la membrane cellulaire. D'une part, un mécanisme saturable, et d'autre part, un mécanisme insaturable.

Nous avons voulu marquer nos LDL avec de l'or colloïdal afin de pouvoir les suivre en morphologie.

Les principes d'incubation avec les conjugués sont les mêmes que les principes d'incubation avec les ^{125}I -LDL.

La courbe obtenue par Van Hinsberg est donnée à la figure 55.

Comme nous l'avons montré dans nos résultats, nous avons préféré nous abstenir de tracer une relation semblable à celle obtenue par Van Hinsberg. En effet, nos résultats présentent une certaine hétérogénéité.

Nous voyons qu'une augmentation de la concentration en conjugué entraîne une augmentation du nombre de particules liées à la surface et par ailleurs, il semble y avoir une limite dans le nombre de particules liées à la surface, à partir d'une concentration de 30 μg de protéines/ml.

Nous avons essayé de déterminer les raisons éventuelles responsables de l'hétérogénéité observée.

-Le nombre d'échantillons observés en morphologie ne saurait être comparable au matériel dont ont disposé les biochimistes pour effectuer leur étude.

En effet, nous avons étudié environ un tiers de la surface cellulaire, les biochimistes travaillent sur des quantités de cellules.

-Nous avons vu précédemment que l'obtention d'un conjugué n'est pas toujours chose aisée. Pour des raisons techniques et pratiques, nous n'avons pu effectuer de contrôle concernant la qualité du conjugué avant l'incubation.

Nous pensons notamment au contrôle du nombre de LDL autour d'une particule

d'or, bien que nous ignorons dans quelle mesure ce facteur interviendrait dans la liaison de la LDL au récepteur.

De plus, nous ne négligeons pas que certaines erreurs ou imprécisions au cours de la préparation du conjugué et de son incubation avec les cellules endothéliales peuvent s'être produites.

-Pour les raisons énoncées précédemment et confirmées par Robenek (Robenek et al., 1982) concernant l'étude du conjugué en réplique de surface à de faibles grossissements.

En effet, au départ, et appuyés en cela par des études déjà effectuées au laboratoire, nous pensions dénombrer uniquement les particules d'or présentant une cône d'ombrage de manière à mettre en évidence la liaison spécifique des LDL aux récepteurs.

Nous avons dû réorienter notre choix par la suite, en effet, la qualité des répliques, d'une part, et des photos d'autre part, ne nous aurait pas toujours permis d'identifier clairement ces structures. Nous avons donc, en fait comptabiliser toutes les particules d'or présentes à la surface.

Cependant, nous avons remarqué que sur les répliques bien ombrées, le nombre de particules ne présentant pas ce cône d'ombrage était peu élevé.

-La littérature souligne également qu'une hétérogénéité existe au niveau de la configuration des amas ainsi qu'au niveau de leur densité dans une même cellule et de cellule à cellule.

Robenek d'une part, et Goldstein d'autre part, ont fait ces considérations sur les fibroblastes en culture et ont attribué cette hétérogénéité à une répartition différente du contenu en stérol dans la cellule. (Robenek et al., 1982; Goldstein et al., 1983)

Nous pensons que de telles considérations pourraient être appliquées aux cellules endothéliales, issues de la veine ombilicale, en culture.

En effet, nous avons fait ces mêmes observations d'une part sur les photos étudiées pour l'effet de la concentration, et d'autre part lors des observations en microscopie électronique.

Nous avons remarqué cependant que déjà pour de faibles concentrations en conjugués incubés, le nombre de particules liées à la surface cellulaire étudiée est important; en cela, nos résultats correspondent à ceux obtenus par Van Hinsberg.

Le début de la courbe obtenue présente une forte pente ; cette pente illustre

la rapidité du mécanisme de liaison spécifique aux faibles concentrations. En effet, nous voyons que le nombre de particules liées à la surface en présence d'un excès de LDL non conjuguées est nettement plus faible; ceci résulte de la compétition existant entre les LDL native et les LDL conjuguées à l'or et illustre la part de la liaison non spécifique dans le mécanisme de la liaison totale.

Nous remarquons d'autre part que pour des concentrations en conjugué supérieures à 10 μg de protéines/ml, le nombre de particules n'augmenterait plus de manière si rapide.

Nous ne tenons pas à nous prononcer davantage sur l'allure exacte de la relation existant entre la concentration en conjugué incubé et le nombre de particules liées à la surface cellulaire, les résultats présentant de trop grandes imprécisions.

Van Hinsberg remarque, pour sa part que les 90% de la saturation sont obtenus pour des concentrations en conjugué de $\pm 20 \mu\text{g/ml}$.

5.3.2. Influence de la concentration en conjugué sur la taille des amas.

Manière de définir la taille d'un amas:

Un amas se définit comme un ensemble de particules. Nous avons vu précédemment que les amas pouvaient contenir des particules plus ou moins isolées les unes des autres, par conséquent, nous avons pris le critère suivant pour définir la taille des amas:

"des particules font partie d'un même amas si la distance qui les sépare est inférieure au diamètre moyen des particules"; de même, nous avons vu que des sous-amas pouvaient être dénombrés; ici encore nous avons pris comme critère pour définir le nombre de sous-amas dans un amas que "des sous-amas font partie d'un même amas si la distance qui les sépare est inférieure à la dimension moyenne des amas".

Nous avons préféré présenter les résultats obtenus sous forme de tableau. Nous remarquons que la taille des amas a tendance à augmenter avec une augmentation de la concentration en conjugué, ceci pour les tests et pour les contrôles.

Nous remarquons toutefois la présence d'amas de taille importante pour de faibles concentrations en conjugué, nous n'avons pu en déterminer l'origine. Nous énumérons ici quelques points caractéristiques:

-la taille des amas semble avoir certaines limites (pour les concentrations

30 - 40 - 50 $\mu\text{g/ml}$).

-Il semble y avoir une augmentation progressive de la taille et dans la taille des amas.

Notons que dans nos expériences, il ne semble pas y avoir de relation entre le nombre d'amas et la concentration en conjugué incubé.

-Nous remarquons que pour trois expériences (6T4, 2T4, 13T4) faites à des jours différents, la fréquence des groupes de petite taille est semblable; comme par ailleurs ces points ne s'écarteraient pas trop d'une courbe conforme au modèle de Van Hinsberg, nous pensons que cette répartition dans la taille et le nombre des amas doit avoir une signification.

Nous aimerions, à ce niveau, faire quelques considérations sur la taille des amas.

Nous avons vu précédemment, lors de l'étude morphologique du conjugué à la surface cellulaire, que les particules pouvaient être isolées ou regroupées en amas.

Ces amas peuvent eux-mêmes être divisés en sous-amas.

L'observation de ces amas a suscité en nous deux types de questions:

- 1° Une agrégation des particules en amas est-elle toujours (ou encore) compatible avec une interaction des LDL avec les récepteurs? Si oui, quelle est la signification de la taille des amas?
- 2° L'agrégation observée ne peut-elle pas être due à un facteur non impliqué dans le mécanisme de la liaison?

Nous pensons plus particulièrement à des interactions entre les particules d'or, ou entre les particules d'or et les LDL.

Nous aimerions d'abord essayer de répondre à la deuxième question.

Dans ce but, nous avons observé:

- 1° les particules d'or dispersées sur une grille (Figure 53)
- 2° le conjugué, par la technique de coloration négative; cependant, nous avons choisi d'étudier une région où le colorant était trop abondant de sorte que seules les particules d'or du conjugué peuvent être observées. (Figure 54)
- 3° le conjugué lui-même, par la technique de coloration négative. (Figure 55-56-57).

PLANCHEXVII: Observation de l'or colloïdal et du conjugué en coloration négative.

Figure 53: Répartition d'une solution d'or colloïdal sur une grille.
Noter l'homogénéité des tailles.

Figure 54: Répartition du conjugué sur une grille de formvar: l'excès de colorant nous permet d'étudier les particules du conjugué qui interagissent avec les LDL. Noter la distance séparant généralement les particules d'or, elle équivaut au diamètre des LDL.

Figure 55: Mise en évidence du conjugué par la coloration négative.
Cette technique de coloration permet d'expliquer les distances observées entre les particules d'or sur la figure 54.

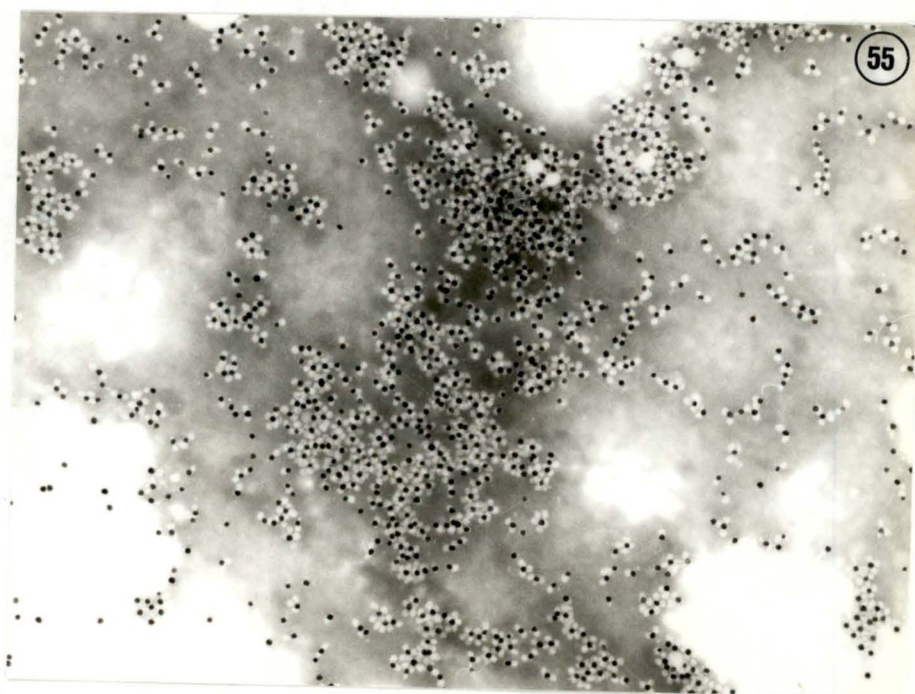
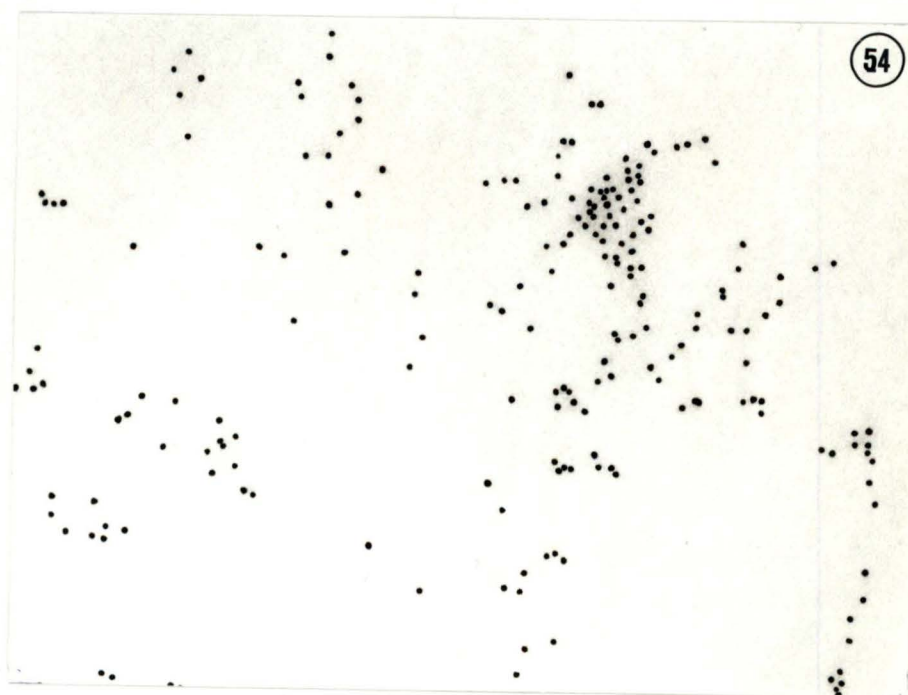
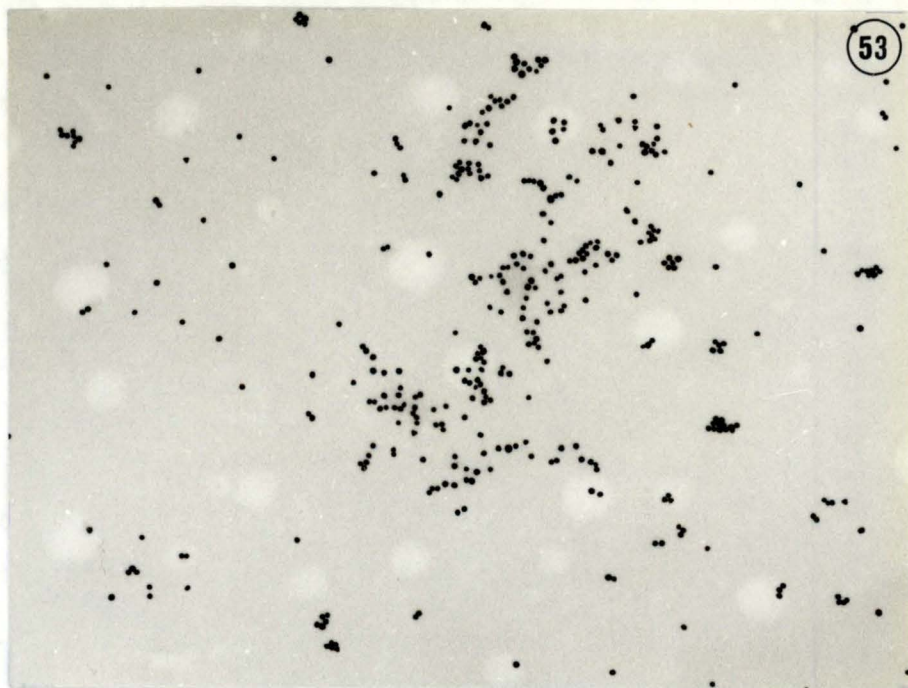


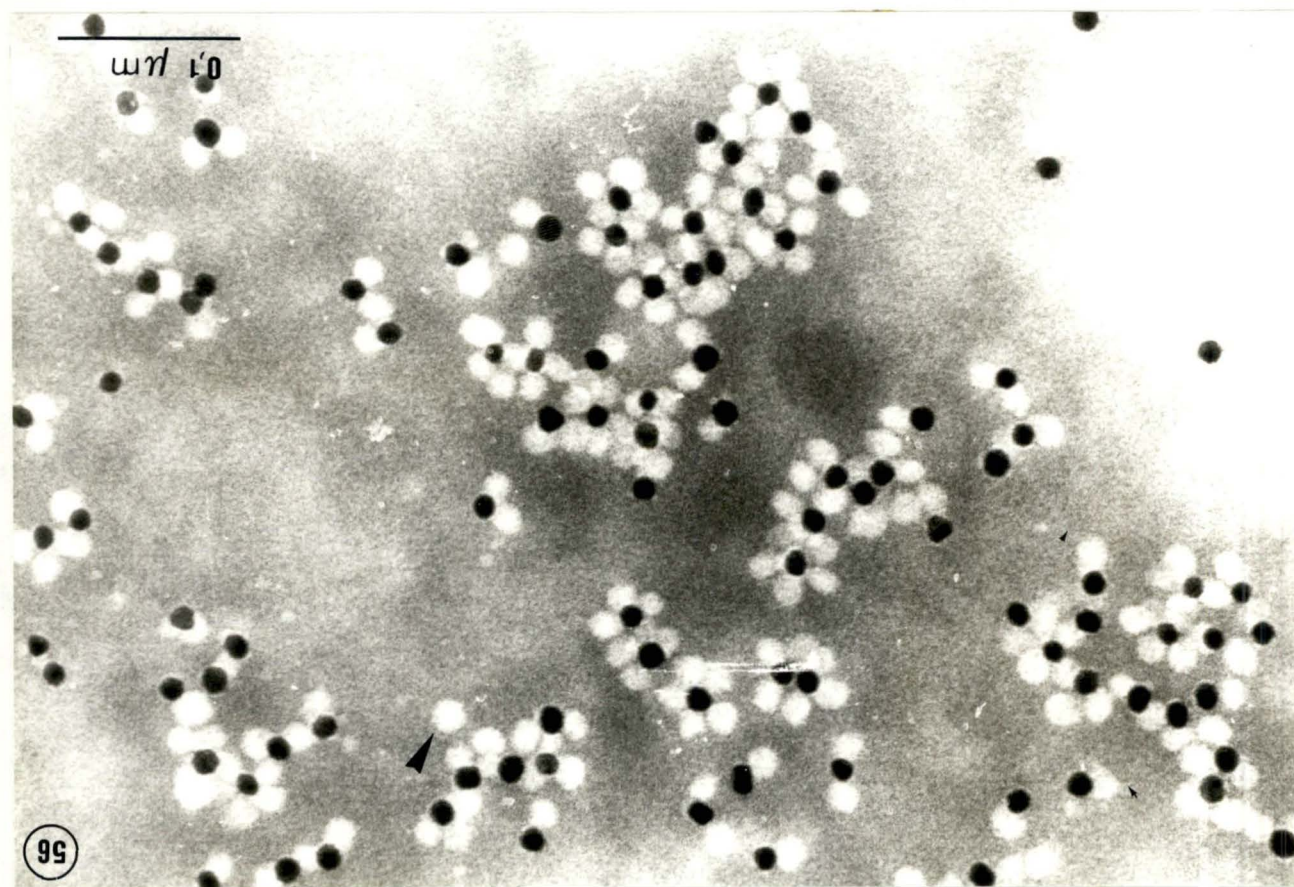
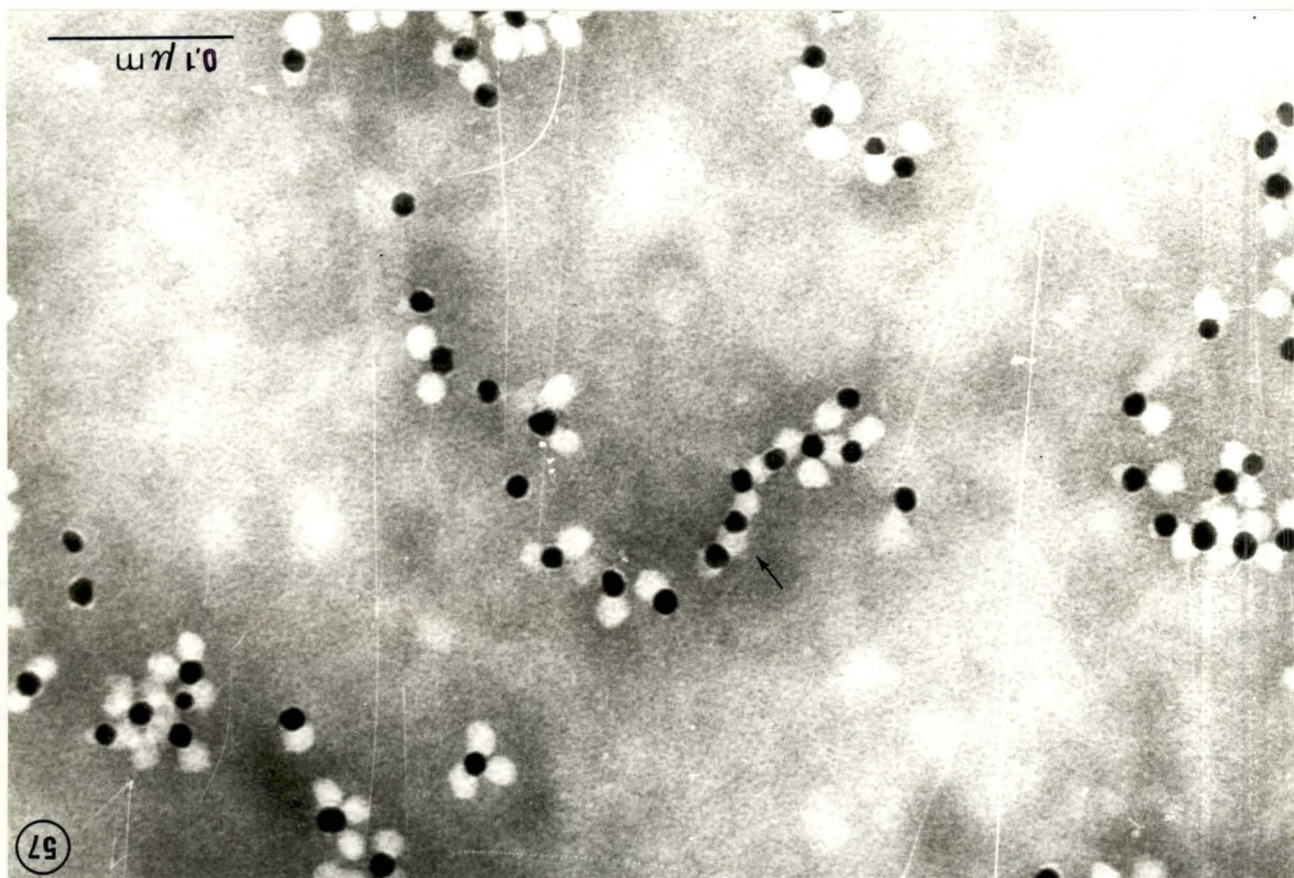
PLANCHE XVIII : Mise en évidence du conjugué par la coloration négative.

Figures 56 : agrandissement de deux régions de la figure 55.

Noter les interactions existant entre les LDL et les particules d'or: le nombre de LDL autour d'une particule d'or est variable.

Remarquer la présence d'une LDL isolée.

Figure 57: Interaction particulière des LDL et de l'or "en chaînette". ↘



Nous pensons qu'il est intéressant de traiter ensemble les résultats de ces trois observations et d'essayer de les corrélérer aux observations du conjugué tel que nous le voyons en réplique de surface.

- 1° il nous est apparu intéressant de montrer cette photographie; en effet, le regroupement des particules reflète assez fréquemment ce que nous observons sur nos répliques. Nous pensons que le regroupement des particules sur la grille est dû à une mauvaise dispersion de la solution d'or colloïdal plutôt qu'à des agrégations du colloïde lui-même.
- 2° l'observation des particules d'or du conjugué nous montre que les particules se répartissent sur une grande surface, elles peuvent être isolées ou regroupées en amas. Cependant, nous notons que lorsqu'elles sont en amas, les particules sont généralement équidistantes les unes des autres, cette distance correspond, en certains endroits au diamètre d'une LDL.
- 3° l'observation du conjugué en coloration négative nous a permis d'émettre des hypothèses quant aux éventuelles interactions entre les LDL et les particules d'or.

Deux aspects particuliers ont retenu notre attention:

- d'une part nous observons des "chaînettes" de particules d'or et de LDL comme si effectivement les deux particules interagissaient entre-elles; cet aspect correspond parfois à des distributions *linéaires* ou en *arc de cercle* mentionnées précédemment.
- d'autre part, nous n'avons pas noté d'importante quantité de conjugués superposés alors que nous observons régulièrement des superpositions (ou du moins ce que nous sommes tentés de définir comme des superpositions de particules) en répliques.

Nous avons entrepris cette étude dans le but de déterminer dans quelles mesures de telles répartitions étaient encore compatibles avec les interactions entre les LDL et les récepteurs.

L'agrégation des particules en amas est-elle encore compatible avec une interaction des LDL avec les récepteurs?

Nous savons que les récepteurs des LDL doivent être suffisamment séparés les uns des autres pour pouvoir se lier avec les LDL, selon ces considérations, nous devrions observer un grand nombre de particules isolées.

D'autre part, le déplacement transversal des récepteurs dans la membrane est possible à 4°C, ceci peut expliquer les amas que nous avons observés.

Il nous a semblé intéressant de signaler la limitation dans la taille des groupes, ceci résulte peut-être d'encombrements stériques au niveau des sites de fixation.

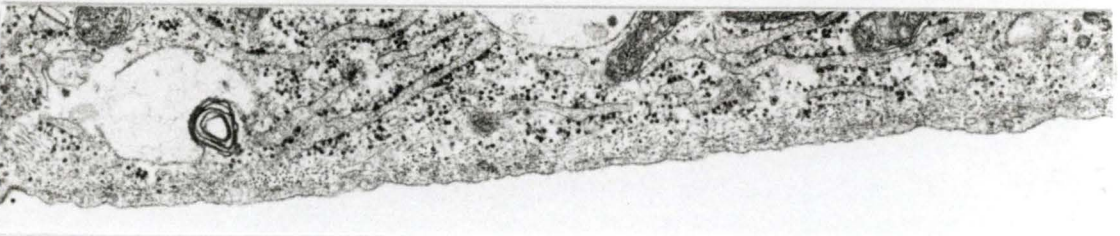
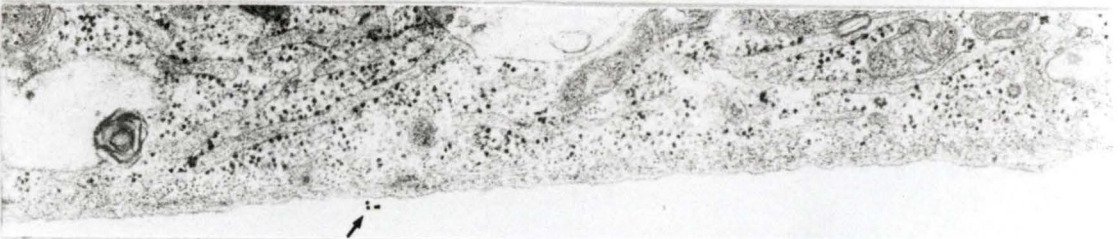
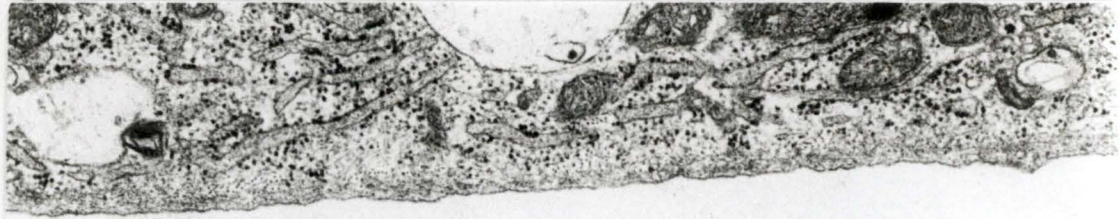
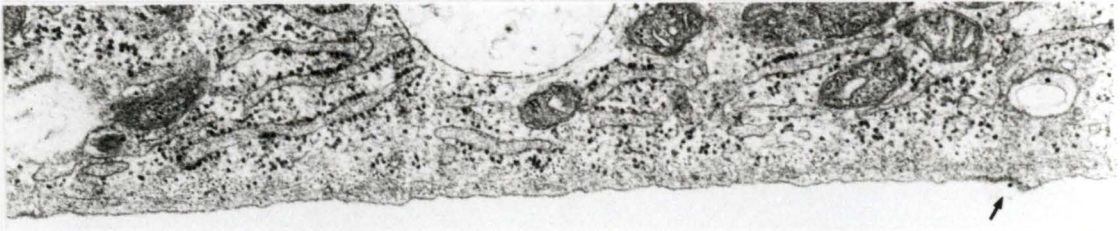
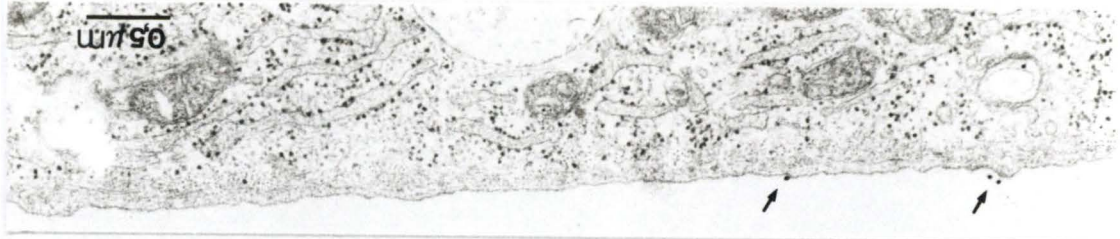
Nous ne pouvons déterminer si les amas de particules observés à faibles grossissements résultent du rassemblement des récepteurs avant ou pendant l'incubation, ou même s'il s'agit bien de récepteurs à ces endroits.

Il est certain que les critères définis ci-dessus et concernant la "définition de la taille de l'amas" ne sont pas des plus rigoureux, cependant, une analyse de groupe (cluster analysis) n'a pu être envisagée vu la quantité de données à traiter. Nous nous sommes efforcés, tout au long de ces comptages d'être le plus rigoureux possible.

Il est certain qu'une analyse de groupe, établie avec des critères géométriques et mathématiques constitue une des approches les plus rigoureuses dans ce type d'analyse; cependant, dans le contexte de la liaison de LDL avec des récepteurs ou des sites spécifiques de la membrane, on peut se demander si certains critères morphologiques ne doivent pas être prépondérants.

En effet, il est peut-être plus intéressant de considérer comme critère de taille le "coated-pit" (taille pris au sens de dimension de la surface étudiée). L'étude des coupes sériées à 37°C* reflète ce problème: en effet, nous voyons que les particules n'apparaissent pas sur toutes les sections, elles semblent par contre être liées à une même structure (CP). Ceci nous amène à supposer qu'une telle disposition pourrait correspondre à plusieurs sous-amas d'un même amas; cependant nous pensons que d'un point de vue physiologique, l'intérêt à accorder au CP lui-même est peut-être plus important. (*figure 52*)

* Nous avons effectué des coupes sériées à 4°C et à 37°C. Nous n'avons trouvé de conjugué à la surface cellulaire que pour des cellules incubées pendant 2 minutes à 37°C, cependant, nous pensons que les considérations énoncées ci-dessus, s'appliquent également aux cellules fixées à 4°C.



CONCLUSIONS

Le but de ce travail était de réaliser une étude qualitative et quantitative de la liaison des LDL à la membrane des CE humaines en fonction de différentes concentrations en LDL, à 4°C.

Pour cette étude, nous avons conjugué les LDL avec de l'or colloïdal de manière à pouvoir les observer en réplique de surface à différents grossissements, ainsi qu'en section sagittale.

L'étude qualitative nous a permis de caractériser la forme des amas ainsi que la disposition des particules qu'ils contiennent.

Ces amas peuvent être situés sur des structures contrastées du fond, que nous avons identifié à des "coated-pits".

Nous nous sommes attachés à la signification de ces différents aspects dans le cadre de la liaison des LDL à la membrane cellulaire.

Nos observations nous amènent à penser que pour les cellules endothéliales, les récepteurs sont dispersés au hasard à la surface membranaire et se rassemblent au niveau des "coated-pits" en vue de leur internalisation.

Nous pensons que l'aspect des ces différentes structures représente des stades différents dans la liaison et le déplacement du complexe "conjugué-récepteur" à la surface membranaire à 4°C.

Innerrarity, en 1978, a signalé que pour se lier avec les LDL, les récepteurs devaient être suffisamment distants pour éviter tout encombrement stérique (Innerrarity et al.; 1978).

Tout au long de notre étude, nous nous sommes demandés dans quelle mesure le conjugué interférait avec la liaison des LDL aux récepteurs. Comme la décrit Innerrarity, le récepteur pour les LDL contient 4 sites de liaison qui lui permet de lier 4 LDL; dès lors, nous avons été étonnés de voir, d'une part, peu d'amas de 3 ou 4 particules, alors que d'autre part, nous avons un nombre impressionnant d'amas dans lesquelles les particules étaient parfois si étroitement accolées qu'il était difficile de les compter.

Puisque les répliques remettent dans un même plan toutes les particules d'or observées, il est difficile d'établir avec exactitude les interactions que celles-ci établissent avec la membrane. C'est pourquoi nous ne savons pas si de tels amas correspondent à des superpositions de particules et dans cette éventualité, nous n'avons pu déterminer, que se soit en coloration négative ou par les études des sections sagittales, s'il sagissait d'interaction entre les LDL et les particules d'or (complexes LDL-or-LDL...) ou d'interactions entre les LDL et différents récepteurs ou sites situés eux-mêmes dans des plans différents de la membrane.

SS

Nous nous sommes demandé^{1/} quelle pouvait être la répercussion d'une telle observation dans l'étude de l'aspect quantitatif de la liaison des LDL à la surface cellulaire. ||

L'étude quantitative de la liaison des LDL à la surface cellulaire en fonction de la concentration a montré une augmentation du nombre total de particules liées. Cependant, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence les deux types de mécanismes, spécifique et non spécifique, intervenant dans la liaison des LDL à la membrane cellulaire, comme l'a fait Van Hinsberg en incubant des cellules endothéliales^a de l'artère ombilicale avec des ¹²⁵I-LDL. ^

Nous avons également noté une augmentation dans la taille et, de la taille des amas. Nous pensons que cette augmentation peut révéler deux types de distributions des récepteurs à la surface membranaire. ?

Aux plus faibles concentrations, les LDL se répartiraient sur toute la surface, soit au niveau de zone particulière (des récepteurs situés dans la membrane ou au niveau de "coated-pit") soit au niveau de sites anioniques répartis sur toute la surface, de manière à interagir le moins possible avec les autres lipoprotéines; ensuite, pour les plus fortes concentrations en conjugué^g incubés, les LDL occuperaient les sites et/ou les récepteurs restants. |

Une autre hypothèse serait que les LDL se lieraient à des récepteurs isolés au hasard dans la membrane, et que cette liaison serait responsable d'un déplacement des complexes vers des zones déterminées. Pour des concentrations importantes en conjugué, l'augmentation de la taille des amas observée résulterait du regroupement d'un plus grand nombre de complexes.

Nous restons cependant conscient de l'insuffisance de nos résultats pour affirmer de telles hypothèses, ainsi que des réserves à accorder quand à l'identification des structures sous-jacentes aux particules, à faible grossissement.

C'est pourquoi, il nous semblerait intéressant d'entreprendre une étude plus détaillée de la distribution des conjugués à la surface des cellules endothéliales et d'en visualiser le rassemblement en agrégats en des domaines distincts. Nous pensons que la technique des répliques de surface et l'utilisation d'or colloïdal comme marqueur peuvent fournir un outil de travail.

L'observation des répliques à un grossissement permettant de reconnaître

les structures décrites contribuerait peut-être à caractériser la distribution des récepteurs dans les "coated-pits" et dans la membrane, à estimer la capacité de liaison de ces récepteurs; elle permettrait également de déterminer la manière dont les récepteurs d'une zone déterminée interagissent avec les LDL liées à l'or, c'est à dire de savoir si la liaison d'une LDL avec un récepteur diminue la probabilité pour un autre récepteur de se lier avec une autre LDL.

Bibliographie

- ALLAIN C. A., ROON L.S., CHAN C.S.G., RICHMOND N., and FU C.F.,
Enzymatic determination of total serum cholesterol
Clin. Chem. 20, 4., 470-475, (1974)
- ANDERSON T.F.,
Techniques for the preservation of three dimensional structure in
preparing specimens for the electron microscope.
Trans. N. Y. Acad. Sci. 13, 130, (1951)
- ANDERSON R.G.W., BROWN M.S., and GOLDSTEIN J.L.,
Role of the coated endocytotic vesicle in the uptake of receptor bound
LDL in human fibroblasts.
Cell 10, 351-364, (1977)
- ANDERSON R.G.W., GOLDSTEIN J.L., and BROWN M.S.,
A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to
localize in coated pits on the cell surface of human fibroblasts.
Nature, 270, 695-699, (1977)
- ANDERSON R.G.W., BROWN M.S., BEISIEGEL U., and GOLDSTEIN J.L.,
Surface distribution and recycling of LDL receptor as visualized
with antireceptor antibodies.
J. Cell Biol., 93, 523, (1982)
- ANDERSON R.G.W., and KAPLAN J.,
Receptor mediated endocytosis.
in Modern Cell Biology, 1, 1-52, (1983)
- ASSMANN G.,
Lipid Métabolism and Atherosclerosis.
ed. Schattauer-Verlag, Germany, pp 246 (1982)
- ATTIE A.D., PITTMAN R.C., WATANABE Y., and STEINBERG D.,
LDL receptors deficiency in cultured hepatocytes of the WHHL
rabbit: further evidence of two pathways for catabolism of
exogenous proteins.
J. Biol. Chem. 256, 9789-9792, (1981)
- BALCONI G., PIETRA A., BUSACCA M., DE GAETANO G. and DEJENA E.,
Success rate of primary human endothelial cell culture from umbilical
cords in influenced by maternal and fetal factors and interval from
delivery.
In Vitro, 19, 807-810, (1983)
- BASU S.K., GOLDSTEIN J.L., and BROWN M.S.,
Characterisation of the LDL receptor in membranes prepared from
human fibroblasts.
J. biol., 253, 11, 3852-3856, (1978)
- BASU S.K., GOLDSTEIN J.L., ANDERSON R.G.W., and BROWN M.S.,
Monensine interrupts the recycling of LDL receptor in human
fibroblast.

- Cell, 24, 493-502, (1981)
- BLOSE S.H.,
In Biology of endothelial cells, chap.14: the endothelial cytoskeleton.
Martinus Nijhoff Publishers, the Hague, (1984)
- BOOYSE F.M., SEDLAK B.J., and RAFELSON M.E.,
Culture of arterial endothelial cell: characterisation and growth of bovine aortic cells.
Thrombosis Diath. Haemorrh., 58, 81-96, (1985)
- BRIFFEUIL P.,
Contribution à l'étude de l'athérogénèse:II prolifération et durée de vie des cellules endothéliales aortiques bovines en culture: aspect morphologique.
Mémoire de licence, FNDP, Namur, (1984-1985)
- BROWN M.S., and GOLDSTEIN J.L.,
The low density lipoprotein pathway in human fibroblasts.
TIBS, 1, 193-195, (1976)
- BROWN M.S., and GOLDSTEIN J.L.,
Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors.
New Engl. J. Med., 305.9, 515-517, (1981)
- BROWN M.S., ANDERSON R.G.W., BASU S.K., and GOLDSTEIN J.L.,
Recycling of cell surface receptor: observation from the LDL receptor system.
Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., 46, 713, (1982)
- BROWN M.S., and GOLDSTEIN J.L.,
How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis.
Scientific American. (1984)
- CHAPMAN M. J., GOLDSTEIN S., LAGRANGE D., LAPLAUD P.M.,
A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum.
J. Lipid Res., 22, 339-358, (1981)
- CHUNG B.H., WILKINSON T., GEER J.C., SEGREST J.P.,
Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins. Rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor.
J. Lipid Res., 21, 284-291, (1980)
- COETZEE G.A., STEIN O., STEIN Y.,
Uptake and degradation of low density lipoproteins (LDL) by confluent, contact-inhibited bovine and human endothelial cells exposed to physiological concentrations of LDL.
Atherosclerosis, 33, 425-431, (1979)
- DAVIES P.F., SYDNEY C., SELDEN III, and SCHWARTZ S.M.,
Enhanced rates of fluid pinocytosis during exponential growth and monolayer regeneration by cultured endothelial cells.
J. Cell. Physiol., 102, 119-127, (1980)

- FIELDING P.E., VLODAVSKY I., GOSPODAROWICZ D., and FIELDING C.J.,
Effect of contact inhibition on the regulation of cholesterol
metabolism in cultured vascular endothelial cells.
J. Biol. Chem. 254, 749-755, (1979)
- FORTE T.M. and NORDHAUSSEM R.W.,
Electron microscopy of negatively stained lipoproteins.
Method in enzymology, 128, 442-456, (1986)
- FRENS G.,
Controlled nucleation for the regulation of the particle size in
monodisperse gold suspensions.
Nat. Phys. Sci., 241, 20-22, (1973)
- FRESHNEY R.I.,
Culture of animal cell.
Alan R. Liss, Inc., New-York, (1983)
- GIMBRONE M.A., COTRAN R.S. and FOLKMAN J.,
Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis.
J. Cell Biol., 60, 673-684, (1974)
- GEOGHEGAN W.D. and ACKERMAN A.,
Adsorption of horseradish peroxydase, ovomucoid and
antiimmunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of
concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human
immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a
new method, theory and application.
J. Histochem Cytochem, 25, 11, 1187-1200, (1977)
- GOLDSTEIN J.L., and BROWN M.S.,
Binding and degradation of LDL by cultured human fibroblasts:
comparison of cells from a normal subject and from a patient with
homozygous familial hypercholesterolemia.
J. Biol. Chem., 249, 5153-5162, (1974)
- GOLDSTEIN J.L., ANDERSON R.W.G., and BROWN M.S.,
Coated pits, coated vesicle and receptor mediated endocytosis.
Nature, 279, 679-685, (1979)
- GOLDSTEIN J.L., ANDERSON R.G.W., BROWN M.S.
Receptor-mediated endocytosis and the cellular uptake of LDL.
In: Membrane recycling, Vol. 92, 77-85, London, (1982)
- GOLDSTEIN J.L., TORUKITA M.D., BROWN M.S.,
Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: lesions from an
animal counterpart of familial hypercholesterolemia.
The New England J. of Med., 309, 5, 288-296, (1983)
- GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S., ANDERSON R.G.W., RUSSEL D.W., and SCHNEIDER,
Receptor-mediated endocytosis : concept emerging from the
LDL-receptor system.
Ann. Rev. Cell. Biol., 1, 1-39, (1985)

- GOSPODAROWICZ D., BROWN K.D., BIRDELL C.R., ZETTER B.R.,
Control of proliferation of human vascular endothelial cells.
J. Cell. Biol., 77, 774-788, (1978)
- HANDLEY D.A., ARBEENY C.M., WITTE L.D., and CHIEN S.,
Colloidal gold-LDL conjugates as membrane receptor probes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 368-371, (1981)
- HANDLEY D.A., ARBEENY C.M., WITTE L.D., DE WITT S.G., and CHIEN S.,
Ultrastructural visualization of LDL during receptor binding and
cellular endocytosis.
Ultrastruct. Res., 83, 43-47, (1983)
- HAVEL R.J., EDER H.A., BRAGDON J.H.,
The distribution and chemical composition of ultracentrifugally
separated lipoproteins in human serum.
J. Clin. Invest., 34, 1345-1353, (1955)
- HAUDENSCHILD C.C., COTRAN R.S., GIMBRONE M.A., FOLKMAN J.R. and
FOLKMAN J.,
Fine structure of vascular endothelium in culture.
Ultrastruct. Res., 50, 22-32, (1975)
- HAUDENSCHILD C.C., ZAHNISER D., FOLKMAN J. and KLAGSBURN M.,
Human vascular endothelial cells in culture.
Exp. Cell. Res., 98, 175-183, (1976)
- HAUDENSCHILD C.C.,

In Biology of endothelial cells, chap.13: morphology of vascular
endothelial cells in culture.
Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, (1984)
- HENRIKSEN T., STEIN A., EVENSEN I.M.D., ELGIO R., FOLLING M.D., and VEFUNY A.
Human fetal endothelial cells in culture.
Scand. J. Haematol., 14, 233-241, (1975)
- HENRIKSEN T., EVENSEN S.A., BLOMTHOFF J.P., TORSIK H., and CARLANDER B.,
The effect of serum lipoprotein on cholesterol content and sterol
exchange in cultured human endothelial cells.
Biochim. Biophys. Acta, 574, 312-330, (1979)
- HESZ A., ROBENECK H., INGOLIC E., ROSCHER A., KREMPLE F., SANDHOPER F.,
and KOSTNER G.M.,
Demonstration of receptor binding of two apo-B containing lipoprotein
by differential labelling with colloidal gold.
Eur. J. Cell Biol., 37, 229-233, (1985)
- HORISBERGER M.
Colloidal gold as a tool in molecular biology.
TIBS, 395-397, (1983)

- INNERARITY T.L., MALHEY R.W.,
Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins.
Biochem., 17, 1440-1447, (1978)
- INNERARITY T.L., PITAS R.E., and MALHEY R.W.,
Receptor binding of cholesterol induced HDL containing predominantly apoprotein E to cultured fibroblasts with mutations at the LDL receptor locus.
Biochemistry, 19, 4359-4365, (1980)
- JAFFE E.A., NACHMAN R.L., BECKER C.G. and MINICK C.H.,
Cells derived from umbilical veins.
J. Clin. Invest., 52, 2745-2756, (1973)
- JAFFE E.A.,
Culture of human endothelial cells.
Transpl. Proc., 12, 3, 29-33, (1980)
- JAFFE E.A.,
in Biology of endothelial cells, chap. I : Culture and identification of large vessel endothelial cells.
pp 1-13. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, (1984)
- JOHNSON M.N. and HORNE R.N.,
Some observations on the relative dehydration rates of negative stains and biological objects.
J. Microscopy, 91, 197, (1970)
- LADURON P.M.,
Criteria for receptor sites in binding sites studies.
Biochem. Pharm., 33, 833-839, (1984)
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., and DANDALL R.J.,
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275, (1951)
- MACIAG T., CERUNADO J., ILSLEY S., KELLEY P.R., FORAND R.,
An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 5674-5678, (1979)
- MAHLEY R.W., and INNERARITY T.L.,
Lipoproteins receptors and cholesterol homeostasis.
Biochim. Biophys. Acta, 737, 197-222, (1983)
- MAJNO G., SHEA S.M., and LEVENTHAL M.,
Endothelial contraction induced by histamine type mediators.
J. Cell. Biol., 42, 647-672, (1969)

MATAGNE A.,

Contribution à l'étude de l'athérogenèse I. Mise en culture de cellules endothéliales aortiques bovines et influence de facteurs de croissance sur leur prolifération .

Mémoire licence zoologie, F.N.D.P., (1984)

MOMMAES-KIENHUIS A.M., KRIJBOLDER L.H., VAN HINSBERG V.W.M., DAEMS W.T., and VERMEER B.J.,

Visualization of binding and receptor-mediated uptake of low density lipoproteins by human endothelial cells.

Eur. J. Cell Biol., 36, 201-208, (1985)

MYANT N.B.,

in : Lysosomes in biology and pathology.

Elsevier Science Publishers BV., pp 261-296, (1984)

The catabolism of LDL by the LDL-receptor-lysosomal system.

OSTLUNG R.E., PFLEGER B., and SCHONFELD G.,

Role of microtubules in LDL processing by cultured cells.

J. Clin. Invest., 63, 75-84, (1979)

PEARSE B.M.F.,

Structure of coated pits and vesicles.

in : Membrane recycling, Ciba Foundation , Symposium, 92, 246-265, (1982)

PITAS R.E., INNERARITY T.L., ARNOLD K.S., and MAHLER R.W.,

Rate and equilibrium constants for binding of apo-E HDLc (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoprotein to human fibroblasts : evidence for multiple receptor binding of apo-E HDLc.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 23311-2315, (1979)

POUMAY Y., and RONVEAUX M.F.,

Rapid preparative isolation of concentrated low density lipoproteins and of lipoprotein deficient serum using vertical rotor gradient ultracentrifugation.

Lipid Res., 24, 1476-1480, (1985)

POUMAY Y., and RONVEAUX M.F.,

Morphological studies of the cellular processing of the low density lipoproteins in endothelium cells.

Arch. Biol., 96, 500, (1985)

REDGRAVE T.G., ROBERTS D.C.K. WEST C.E.,

Separation of plasma lipoproteins by density gradient ultracentrifugation.

Anal. Biochem., 65, 42-49, (1975)

ROBENEK H., RASSAT J., HESZ A., and GRUNWALD J.,

A correlative study on the topographical distribution of the receptor for low density lipoproteins (LDL) conjugated to colloidal gold in culture human thin fibroblasts employing thin section, freeze fracture, deep etching and surface replications techniques.

Eur. J. Cell Biol., 27, 242-250, (1982)

- ROBENEK H., and HESZ A.,
Dynamics of low density lipoprotein receptor in the plasma membrane of cultured human skin fibroblasts as visualized by colloidal gold in conjunction with surface replicas.
Eur. J. Cell Biol., 31, 275, (1983)
- ROBENEK H., HESZ A., and RASSAT J.,
The variability of the topography of low density lipoprotein (LDL) receptors in the plasma membrane of cultured human skin fibroblasts as revealed by gold-LDL conjugates in conjunction with the surface replication technique.
J. Ultrastruct. Res., 82, 143-155, (1983)
- ROBENEK H., SCHIMTZ G., and ASSMAN G.,
Topography and dynamics of receptors for acetylated and malondialdehyde modified LDL in the plasma membrane of mouse peritoneal macrophage as visualized by colloidal gold in conjunction with surfaces replicates.
J. Histochem., 32, 1017-1027, (1984)
- ROBENEK H., and SEVERS N.J.,
Double labelling of lipoprotein receptors in fibroblasts cell surface replicas.
J. Ultrastruct. Res., 87, 149-158, (1984)
- ROBENEK H.,
Receptor domains in the plasma membrane of cultured cells.
Acta biologica hungarica, 33, 100, (1986)
- ROSS R; and GLOMSET J.A.,
Response to injury and atherogenesis.
Am. J. Pathol., 86, 675-684, 1977
- SEVERS N.J., and ROBENEK H.,
Detection of microdomains in biomembranes, an appraisal of recent developments in freeze fracture cytochemistry.
Biochim. Biophys. Acta, 737, 373-408, (1983)
- SIMIONESCU N., SIMIONESCU M., and PALADE G.E.,
Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium.
I. Preferential distribution of anionic sites.
J. Cell Biol., 90, 605-613, (1981)
- SPENGL F.A., and THOMPSON G.R.,
Receptor-mediated low density lipoprotein catabolism.
Klin. Wochenschr., 60, 319, (1982)

- STEIN O., STEIN Y.,
High density lipoproteins reduce the uptake low density lipoprotein by human endothelial cells in culture.
Biochem. Biophys. Acta, 431, 363-368, (1976)
- STEINBERG D.,
Lipoprotein and Atherosclerosis : a look back and a look ahead.
Atherosclerosis, 3,(4), (1983)
- VAN HINSBERG V.W.M., HAVEKES L., EMEIS J.J., VAN KORVEN E., and SCHEFFER M.,
Low density lipoproteins metabolism by endothelial cells from human umbilical cord arteries and veins.
Arteriosclerosis, 3, 547-559, (1983)
- VASILE E., SIMIONESCU M., and SIMIONESCU N.,
Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low density lipoproteins in arterial endothelium in situ.
J. Cell Biol., 96, 1677-1689, (1983)
- VLODASKY I., FIELDING P.E., FIELDING C.J., and GOSPODAROWICZ D.,
Role of contact inhibition in the regulation of receptor-mediated uptake of low density lipoprotein in cultured vascular endothelial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 356-360, (1978)
- WAGNER D.D., OLMSTED J.B., MARDER V.J.,
Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel Palade bodies of human endothelial cells.
J. Cell Biol., 355-360, (1982)
- WEIBEL E.R., and PALADE G.E.,
New cytoplasmic components in arterial endothelium.
Cell. Biol., 23, 101-112, (1964)
- WIKLUND O., CAREW T.E., and STEINBERG D.,
Role of the low density lipoprotein receptor in penetration of low density lipoprotein into rabbit aortic wall.
Arteriosclerosis, 5, (1985)
- YAMAMOTO T., DAVIES C.G., BROWN M.S., SCHNEIDER W.J., CASEY M.L., et al.,
The human LDL receptor : A cysteine-rich protein with multiple alu sequences in its mRNA.
Cell, 39, 27-38, (1984)
-

ANNEXE : MILIEU DE CULTURE M 199

à base de sels de Hanks

Ingredient	mg/litre	Ingredient	mg/litre
L-Alanine	25.00	p-Aminobenzoic acid	0.05
L-Arginine HCl	70.00	Pyridoxal HCl	0.025
L-Aspartic acid	30.00	Pyridoxine HCl	0.025
L-Cysteine HCl	0.0987	Riboflavin	0.01
L-Cystine, disodium salt	23.66	Thiamin HCl	0.01
L-Glutamic acid	66.82	DL- α Tocopherol phosphate, disodium salt	0.01
L-Glutamine	100.0	Vitamin A acetate	0.1147
Glutathione	0.05	CaCl ₂ .2H ₂ O	185.5
Glycine	50.00	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.10
L-Histidine HCl .H ₂ O	21.88	KCl	400.0
L-Hydroxyproline	10.00	KH ₂ PO ₄	60.00
L-Isoleucine	20.00	MgSO ₄ .7H ₂ O	200.0
L-Leucine	60.00	NaCl	8000
L-Lysine HCl	70.00	NaHCO ₃	350.0
L-Methionine	15.00	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	
L-Phenylalanine	25.00	Na ₂ HPO ₄	47.50
L-Proline	40.00	Adenine sulphate	10.00
L-Serine	25.00	5'-AMP	0.20
L-Threonine	30.00	ATP, disodium salt	10.00
L-Tryptophan	10.00	Cholesterol	0.20
L-Tyrosine disodium salt	49.72	2-Deoxyribose	0.50
L-Valine	25.00	D-Glucose	1000
L-Ascorbic acid	0.05	Guanine HCl	0.30
Biotin	0.01	Hypoxanthine	0.30
Calciferol	0.10	D-Ribose	0.50
D-Calcium pantothenate	0.01	Sodium acetate	36.71
Choline chloride	0.50	Phenol red sodium salt	17.00
Folic acid	0.01	Thymine	0.30
D-Inositol	0.05	Tween 80	5.00
Menaphthone sodium bisulphite 3H ₂ O	0.019	Uracil	0.30
Nicotinic acid	0.025	Xanthine	0.30
Nicotinamide	0.025		

ANNEXE: COMPOSITIONS DES MILIEUX UTILISES POUR LES CULTURES DE CELLULES.

CORD BUFFER: Tampon physiologique de rinçage et d'incubation.

composition	concentration
NaCl	0.14 M
KCl	0.004 M
Glucose	0.011 M
Tampon phosphate	0.001 M

pH 7.4

Tampon de rinçage pour les cellules en culture

composition	concentration
NaCl	0.137 M
KCl	0.004 M
Glucose H ₂ O	0.012 M
HEPES	0.010 M

pH 7.4

ANNEXE COMPOSITION DES MILIEUX

PBS

composition	concentration
$\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002 M
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.016 M
NaCl	0.137 M
pH 7.4	

Dulbecco's PBS

composition	concentration
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.001 M
KCl	0.005 M
KH_2PO_4	0.001 M
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.001 M
NaCl	0.137 M
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.010 M
pH 7.4	

Milieu de dialyse pour les LDL

composition	concentration
NaCl	0.137 M
Tris	0.010 M
EDTA	0.01%
BHT	10^{-6} M
pH 7.4	