



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

*UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I*

*FACULTE DE MEDECINE DE NANCY*

Laboratoire : Rigidité - Fibrose et risque cardiovasculaire

**THESE**

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I

Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement

Spécialité : Biologie Moléculaire

présentée et soutenue publiquement

par

Gaëlle BELLO

Le 5 novembre 2008

**Etude des effets de la protéine C-réactive sur  
certains aspects de la biologie des cellules  
mononucléées circulantes et des monocytes  
humains. Implications pour la physiopathologie  
des maladies cardiovasculaires.**

Directeurs de thèse :

Professeur Dan Longrois

Docteur Armelle Ropars

JURY

Rapporteurs : V. Witko-Sarsat, Directeur de Recherche à l'Hôpital Necker, Paris

S. Germain, Docteur en Sciences à l'Université Paris VI, Paris

Examineurs : J. Bénæssiano, MCU-PH à l'Hôpital Bichat, Paris

F. Zannad, Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy I

D. Longrois, Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy I

A. Ropars, MCU à l'Université Henri Poincaré, Nancy I

# **Remerciements**

J'adresse mes remerciements au Professeur Dan Longrois qui m'a encadré tout au long de cette thèse. Je voudrais saluer l'engagement et la disponibilité dont il a fait preuve tout au long de mon doctorat et qui m'ont permis d'avancer plus efficacement dans mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier très sincèrement le Docteur Armelle Ropars dont l'implication est allée bien au-delà de sa fonction de co-encadrante. Je la remercie pour son humanité et son soutien, technique et psychologique, dont elle a su me faire profiter tout au long de ce doctorat.

Je remercie le Professeur Faiez Zannad qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui m'a permis de débiter mes travaux au sein de l'EA3447, ainsi que son successeur, le Docteur Patrick Lacolley, qui m'a permis de les terminer, au sein de l'unité mixte UHP-INSERM U684.

Je remercie le Docteur Véronique Witko-Sarsat et le Docteur Stéphane Germain d'avoir examiné mon travail en la qualité de rapporteurs.

Je remercie également le Docteur Joëlle Bénæssiano et le Professeur Faiez Zannad pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

Un grand merci au Docteur Ketsia Hess pour sa grande disponibilité, pour son aide "biochimique" et le partage de ses connaissances.

Je remercie le Docteur Sandrine Grosjean et le Docteur Véronique Latger-Cannard pour leur collaboration à ces travaux.

Je tiens également à remercier le Professeur Jean-Louis Guéant qui nous a ouvert son laboratoire, notamment pour les expériences de PCR quantitative.

Je remercie également le Docteur Brigitte Dousset qui nous a permis d'effectuer les dosages immunométriques dans son laboratoire.

Merci également aux "anciens" du laboratoire EA3447 : Audrey, Fatiha, Gaël, Rosine, Jean-Marc, Patrick mais aussi aux derniers arrivés de l'U684 : Huguette, Carlos, Frédéric, Yvan et Carole.

Merci aussi à toute ma famille qui m'a toujours soutenu, même si les détails de mes travaux leur échappaient parfois, avec un coup de chapeau spécial à ma maman qui a su répondre présente dans toutes les situations. J'espère seulement avoir été à la hauteur de leurs espérances.

Un grand merci, enfin, à tous mes amis biochimistes "de l'autre côté de la rue" : Céline, Sonia, Romain, Sandrine, Sergio, Mimilie, Alex, Isabelle, Nathalie et Sylvie... pour votre disponibilité mais également pour tous les bons moments passés ensemble.

## **Liste des publications**

**Hanriot D. and Bello G., Ropars A., Seguin-Devaux C., Poitevin G., Grosjean S., Latger-Cannard V., Devaux Y., Zannad F., Regnault V., Lacolley P., Mertes P.M., Hess K., Longrois D.**

C-reactive protein induces pro- and anti-inflammatory effects, including activation of the liver X receptor alpha, on human monocytes.

Thromb Haemost. 2008 Mar;99(3):558-69

**Bello G. and Cailotto F., Hanriot D., Kolopp-Sarda M.N, Latger-cannard V., Maillot M.C., Hess K., Zannad F., Longrois D., Ropars A.**

C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells via a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway.

Atherosclerosis. 2008 Oct;200(2):286-293

**Dewachter P., Jouan-Hureaux V., Lartaud I., Bello G., de Talancé N., Longrois D., Mertes P.M.**

A comparison of arginine vasopressin, terlipressin or epinephrine to correct arterial hypotension in a model of anaphylactic shock in anesthetized Brown Norway rats.

Anesthesiology. 2006 Apr;104(4):734-741

**Bello G., Hanriot D., Hess K., Dousset B., Grosjean S., Mertes P.M., Zannad F., Ropars A., Longrois D.**

C-Reactive Protein increases chemokine expression and modulates matrix metalloproteases expression and activity in cultured human peripheral blood mononuclear cells (en rédaction).

## **Communication orale**

**Hanriot D. and Bello G., Ropars A., Seguin-Devaux C., Poitevin G., Grosjean S., Latger-Cannard V., Devaux Y., Zannad F., Mertes P.M., Hess K., Longrois D.**

Une analyse par puces à oligonucléotides révèle des effets pro et anti-inflammatoires de la protéine C-réactive sur les monocytes humains.

2è congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose – Biarritz, France, 9-11 juin 2005.

## Posters

**Bello G., Cailotto F., Hanriot D., Hess K., Nzietchueng R., Maillot M.C., Latger-Cannard V., Zannad F., Longrois D., Ropars A.**

Induction de l'expression du VEGF par la CRP dans les cellules monocytaires

- 22<sup>e</sup> congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire - Strasbourg, France, 20-22 avril 2005
- 2<sup>e</sup> congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose – Biarritz, France, 9-11 juin 2005

**Hanriot D., Bello G., Ropars A., Poitevin G., Grosjean S., Latger-Cannard V., Devaux Y., Zannad F., Mertes P.M., Lacolley P., Hess K., Longrois D., Seguin-Devaux C.**

Une analyse par puces à oligonucléotides révèle des effets pro- et anti-inflammatoires de la protéine C-réactive sur les monocytes humains.

- 22<sup>e</sup> congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire - Strasbourg, France, 20-22 avril 2005.
- 2<sup>e</sup> congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose – Biarritz, France, 9-11 juin 2005.

**Hanriot D., Bello G., Grosjean S., Hess K., Dousset B., Ropars A., Zannad F., Mertes P.M., Longrois D.**

Effets de la protéine C-réactive sur les cellules mononucléaires du sang périphérique : influence du sérum autologue

- 1<sup>er</sup> congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose – Biarritz, France, 10-12 juin 2004.

**Bello G., Hanriot D., Grosjean S., Hess K., Latger-Cannard V., Ropars A., Zannad F., Lacolley P., Mertes P.M., Longrois D.**

Effets de la protéine C-réactive sur certains aspects de la biologie du monocyte humain. Approche méthodologique basée sur les puces à oligonucléotides et sur les puces à protéines.

- *European Society of Cardiology congress – Munich, Allemagne, 28 août – 1er septembre 2004.*
- 1<sup>er</sup> congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose – Biarritz, France, 10-12 juin 2004.
- 21<sup>e</sup> congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire – La Baule, France, 22-23 avril 2004.

**Bello G., Hanriot D., Grosjean S., Hess K., Zannad F., Longrois D.**

Etude *in vivo* des mécanismes responsables du "priming" lymphocytaire induit par l'acide rétinoïque, le métabolite actif de la vitamine A.

- *Forum des jeunes chercheurs – Dijon, France, 1-5 juillet 2002.*

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>22</b>
<b>I. Caractères généraux de la CRP</b> .....	<b>23</b>
<b>I.1 Le gène</b> .....	23
I.1.a Localisation .....	23
I.1.b Régulation de l'expression du gène de la CRP .....	23
<b>I.2 La protéine</b> .....	24
I.2.a Historique.....	24
I.2.b Structure de la protéine .....	24
I.2.b.α Structure primaire .....	24
I.2.b.β Structures secondaire et tertiaire .....	24
I.2.b.γ Modifications post-traductionnelles .....	26
I.2.c Formes biologiques de la protéine CRP .....	26
I.2.d Synthèse et localisation.....	27
I.2.e Concentration plasmatique .....	27
I.2.f Récepteurs .....	28
<b>I.3 Fonctions de la CRP</b> .....	29
I.3.a Opsonisation, activation du complément et phagocytose .....	29
I.3.b CRP et cholestérol.....	33
<b>II. La CRP, biomarqueur de risque indépendant de survenue de maladies cardiovasculaires</b> .....	<b>37</b>
<b>III. La CRP, actrice dans la pathologie cardiovasculaire</b> .....	<b>40</b>
<b>III.1 Le processus athéromateux</b> .....	41
III.1.a Les données anatomo-histologiques .....	41
III.1.b Les données moléculaires et cellulaires.....	47
III.1.c Les modèles animaux .....	54
<b>III.2 Implication de la CRP dans la pathologie</b> .....	55
III.2.a CRP et cellules endothéliales.....	56
III.2.b CRP et cellules musculaires lisses.....	57
III.2.c CRP et leucocytes .....	58
<b>III.3 Effets des traitements cardiovasculaires sur les concentrations sériques en hsCRP</b> .....	58
III.3.a Les statines .....	59
III.3.c L'aspirine et agents anti-plaquettaire .....	59
III.3.d Autres inhibiteurs .....	60
III.3.e La perte de poids .....	60
III.3.f Le régime sélectif en acides gras.....	60
<b>OBJECTIF DE L'ETUDE</b> .....	<b>62</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>65</b>
TESTS SUR LES SOLUTIONS DE CRP COMMERCIALES.....	66
<b>I. Analyse de la pureté</b> .....	66
<b>II. Répartition des formes monomériques et pentamériques</b> .....	66
<b>III. Retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP commerciales</b> .....	66
TYPE CELLULAIRE 1 : LES CELLULES MONONUCLEAIRES DU SANG PERIPHERIQUE.....	67
<b>I Origine du matériel</b> .....	67
<b>II Evaluation de l'état de stress cellulaire induit par la purification</b> .....	67
<b>II.1 Etude de l'expression de cytokines pro-inflammatoires</b> .....	67
II.1.a Lyse des cellules et extraction des ARN totaux .....	67
II.1.b Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel.....	67
<b>II.2 Etude de la viabilité cellulaire</b> .....	69
<b>III Influence de la CRP sur les cytokines, chimiokines et les protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire</b> .....	69
<b>III.1 Conditions de culture et traitements :</b> .....	69
<b>III.2 Expression des cytokines, chimiokines et des protéines de la matrice extracellulaire</b> .....	70
III.2.a Analyse transcriptionnelle et protéique .....	70

III.2.b Influence de l'azide de sodium.....	70
TYPE CELLULAIRE 2 : LES MONOCYTES EX VIVO.....	71
<b>I. Obtention des cellules .....</b>	<b>71</b>
<b>II. Evaluation de l'état de stress cellulaire.....</b>	<b>71</b>
<b>III. Influence de la CRP sur l'expression de cytokines et chimiokines .....</b>	<b>71</b>
III.1 Cinétique d'expression de cytokines et chimiokines sous l'action de la CRP .....	71
III.2 Influence de l'azide de sodium .....	72
<b>IV. CRP et biologie de certaines enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire dans les monocytes .....</b>	<b>72</b>
<b>V. Approche globale par puces à protéines .....</b>	<b>72</b>
V.1 Puces à protéines.....	72
V.2 Confirmation des résultats observés par les puces à protéines .....	73
V.2.a Dosage du VEGF dans les milieux de culture .....	73
V.2.b Suivi de l'expression en ARNm du VEGF .....	73
TYPE CELLULAIRE 3 : LES CELLULES THP-1.....	75
<b>I. Origine du matériel.....</b>	<b>75</b>
<b>II. CRP et cytokines pro-inflammatoires.....</b>	<b>75</b>
II.1 Cinétiques d'expression des cytokines pro-inflammatoires .....	75
II.2 Influence des contaminants.....	75
II.2.a Implication de l'azide de sodium.....	75
II.2.b Implication des endotoxines (LPS).....	76
<b>III. Effets de la CRP sur la métalloprotéinase MMP-9.....</b>	<b>76</b>
<b>IV. Effets de la CRP sur la synthèse et la libération du VEGF-A.....</b>	<b>77</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>79</b>
<b>I. Étude et préparation des solutions commerciales de CRP.....</b>	<b>80</b>
I.1 Vérification de la qualité des solutions commerciales de CRP .....	80
I.2 Estimation des différentes formes présentes dans les préparations commerciale de CRP .....	81
I.3 Retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP commerciales .....	81
<b>II. Étude des effets de la CRP sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC).....</b>	<b>82</b>
II.1 Obtention des PBMC à partir de sang humain et conditions de culture.....	82
II.1.a Isolement des PBMC .....	82
II.1.b Contrôle de l'état de stress cellulaire après purification .....	82
II.1.c Test de viabilité cellulaire.....	83
II.2 Étude des effets de la CRP sur l'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la pathologie de l'athérosclérose.....	84
II.2.a Approche transcriptionnelle.....	84
II.2.b Approche protéique .....	85
II.2.c Impact de l'azide de sodium sur la quantité d'ARNm de certaines cytokines pro-inflammatoires.....	86
II.3 Étude des effets potentiels de la CRP sur la biologie de certaines enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire .....	87
II.3.a Approche transcriptionnelle.....	87
II.3.b Approche protéique .....	88
II.3.b.α Dosages par test ELISA .....	88
II.3.b.β Mesure de l'activité gélatinase de MMP-9.....	89
II.4 Étude des voies de transduction impliquées dans l'augmentation de proMMP-9 induite par la CRP.....	89
II.4.a Inhibiteurs et activité catalytique de la MMP-9 .....	89
II.4.b Confirmation de l'activation de la voie MEK par la CRP .....	91
II.5 Effets des contaminants potentiellement présents dans les solutions de CRP .....	91
II.6 Résumé des effets de la CRP sur les PBMC .....	92
<b>III. Étude des effets de la CRP sur les monocytes humains .....</b>	<b>93</b>
III.1 Obtention des monocytes à partir de sang humain .....	93
III.1.a Purification des monocytes.....	93
III.1.b Contrôle de la pureté des monocytes .....	93
III.1.c Suivi du stress cellulaire engendré par la purification .....	94
III.2 Effets de la CRP sur l'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes.....	95
III.2.a Profils temporels d'expression de cytokines pro-inflammatoires par la CRP avec les monocytes .....	95
III.2.b Expression des cytokines pro-inflammatoires .....	96
III.3 Effets de la CRP sur le remodelage de la paroi artérielle .....	97
III.3.a Approche transcriptionnelle.....	97
III.3.b Approche protéique .....	98



III.3.b.α Dosage de la MMP-9 par test ELISA.....	98
III.3.b.β Mesure de l'activité gélatinase de la MMP-9.....	99
<b>III.4 Approche globale de la régulation protéique par la CRP dans les monocytes.....</b>	<b>99</b>
III.4.a Utilisation de puces à protéines.....	99
III.4.b Confirmation de la surexpression du VEGF-A par test ELISA.....	100
III.4.c Étude de la régulation transcriptionnelle du VEGF-A par la CRP.....	101
<b>III.5 Résumé des effets de la CRP sur les monocytes.....</b>	<b>102</b>
<b>IV. Étude des effets de la CRP sur la lignée monocyttaire humaine THP-1.....</b>	<b>103</b>
<b>IV.1 Effets de la CRP sur la synthèse de cytokines par les cellules THP-1.....</b>	<b>104</b>
IV.1.a Cinétique d'expression des cytokines pro-inflammatoires.....	104
IV.1.b Effet de l'azide de sodium sur l'expression de l'IL-1β et du TNF-α dans les cellules THP-1.....	105
IV.1.c Effet du LPS pouvant contaminer les préparations de CRP commerciales sur les cellules THP-1.....	106
<b>IV.2 Influence de la CRP sur l'activité de MMP-9 dans les cellules THP-1.....</b>	<b>107</b>
IV.2.a Mise en évidence de l'activité MMP-9.....	107
IV.2.b Confirmation par dosage ELISA.....	107
IV.2.c Approche par mesure de la quantité d'ARNm MMP-9.....	108
IV.2.d Voies de signalisation impliquées.....	109
IV.2.e Effet de l'azide de sodium sur la synthèse de MMP-9.....	110
<b>IV.3 Effets de la CRP sur la synthèse de VEGF-A.....</b>	<b>110</b>
IV.3.a Influence de la CRP sur l'expression du VEGF-A.....	111
IV.3.b Effets de la CRP sur l'expression protéique du VEGF-A dans les surnageants des cultures de cellules THP-1.....	112
IV.3.c Effet des contaminants de la CRP sur l'expression du VEGF-A.....	113
<b>IV.4 Étude des voies de signalisation impliquées dans la synthèse du VEGF-A par la CRP.....</b>	<b>115</b>
IV.4.a Approche par l'utilisation de différents inhibiteurs de transduction du signal.....	115
IV.4.b Approche par Western-blot.....	117
<b>IV.5 Activation de la synthèse du VEGF-A par la CRP via les récepteurs FcγR.....</b>	<b>118</b>
IV.5.a Implication des récepteurs FcγRI (CD64) et FcγRIIa (CD32) dans l'expression des ARNm VEGF-A par la CRP.....	119
IV.5.b Etude protéique de la fixation de la CRP sur FcγRI et FcγRIIa.....	120
<b>IV.6 Résumé des effets de la CRP sur les cellules THP-1.....</b>	<b>121</b>
<b>V. Résumé des effets de la CRP dans les trois types cellulaires étudiés.....</b>	<b>122</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>123</b>
DISCUSSION METHODOLOGIQUE.....	124
<b>I. Le problème des contaminants de la CRP.....</b>	<b>124</b>
I.1 Cas de l'azide de sodium.....	124
I.2 Cas des endotoxines.....	125
<b>II. Le choix des cellules.....</b>	<b>126</b>
<b>III. Le choix des concentrations.....</b>	<b>127</b>
<b>ÉTUDE N° 1 : EFFETS DE LA PROTEINE C-REACTIVE SUR L'EXPRESSION DU FACTEUR ANGIOGENIQUE VEGF-A.....</b>	<b>128</b>
<b>I. La CRP induit une augmentation de l'ARNm du VEGF-A.....</b>	<b>129</b>
<b>II. La CRP induit la synthèse protéique du VEGF-A.....</b>	<b>129</b>
<b>III. Les protéines VEGF-A ne sont pas toutes néosynthétisées suite à l'action de la CRP.....</b>	<b>131</b>
<b>IV. L'action de la CRP sur la synthèse de VEGF-A est concentration-dépendante.....</b>	<b>132</b>
<b>V. Effets des contaminants des solutions de CRP.....</b>	<b>132</b>
V.a L'azide de sodium.....	132
V.b Les endotoxines.....	133
V.c Les immunoglobulines.....	133
<b>VI. Les voies de signalisation activées par la CRP.....</b>	<b>133</b>
<b>VII. Augmentation de la synthèse du VEGF-A par liaison de la CRP aux récepteurs FcγRI et FcγRIIa.....</b>	<b>135</b>
<b>VIII. Autres récepteurs impliqués ?.....</b>	<b>136</b>
<b>IX. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>136</b>
<b>ÉTUDE N° 2 : IMPLICATION DE LA PROTEINE C-REACTIVE DANS L'EXPRESSION DES METALLOPROTEASES IMPLIQUÉES DANS L'ÉVOLUTION DE LA PLAQUE D'ATHEROME.....</b>	<b>140</b>
<b>I. Corrélation entre la CRP et l'augmentation de proMMP-9.....</b>	<b>141</b>
<b>II. Implication de la CRP dans la régulation MMP-9/proMMP-9.....</b>	<b>142</b>
II.a Approche à l'aide des PBMC.....	142

<b>II.a</b> Approche à l'aide des monocytes isolés .....	144
<b>III. Régulation de la synthèse de MMP-9 par les voies PI3-Kinase et MEK.....</b>	<b>144</b>
<b>IV. Effets de l'azide de sodium contenu dans les solutions de CRP sur la synthèse de MMP-9.....</b>	<b>145</b>
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>146</b>
ÉTUDE N° 3 : PROTEINE C-REACTIVE ET IMPLICATION DANS LA SYNTHÈSE DE CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES .....	148
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES.....	151
<b>FICHES TECHNIQUES .....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>181</b>
<b>ARTICLES.....</b>	<b>204</b>

## **Table des illustrations**

<b>Figure 1</b> : Répartition des causes de mortalité en France .....	19
<b>Figure 2</b> : Promoteur du gène de la CRP .....	23
<b>Figure 3</b> : Séquence protéique primaire de la protéine C-réactive.....	24
<b>Figure 4</b> : Structure cristalline de la CRP.....	25
<b>Figure 5</b> : Fixation de C1q sur le pentamère de CRP .....	25
<b>Figure 6</b> : Les différentes classes de récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines dans l'espèce humaine.....	29
<b>Figure 7</b> : Modèle d'interaction entre la CRP et les phospholipides membranaires .....	30
<b>Figure 8</b> : Les différentes voies du complément régulées par la CRP .....	32
<b>Figure 9</b> : Les différentes fonctions associées à la CRP .....	33
<b>Figure 10</b> : Les 5 sous-classes de lipoprotéines classées selon leur densité et leur diamètre	34
<b>Figure 11</b> : Influence du cholestérol intracellulaire sur la synthèse des récepteurs ABCA1 et SR-B1.....	36
<b>Figure 12</b> : Études prospectives depuis 1996 liant le niveau de CRP et le risque de survenue d'un premier événement cardiovasculaire respectivement dans le cadre d'accidents vasculaires cérébraux, de maladies coronaires, de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde et de maladies artérielles pulmonaires selon l'étude.....	37
<b>Figure 13</b> : Corrélation entre la concentration en CRP plasmatique et le risque d'accident cardiovasculaire chez des sujets apparemment en bonne santé (A) ou présentant un syndrome métabolique (B).....	38
<b>Figure 14</b> : Survie sans événement cardiovasculaire évalué en fonction des taux initiaux de CRP et de LDL .....	39
<b>Figure 15</b> : Structure de la paroi artérielle .....	41
<b>Figure 16</b> : Modèle de la genèse de la plaque d'athérome .....	42
<b>Figure 17</b> : Schématisation de la lésion de type II montrant l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima .....	43
<b>Figure 18</b> : Schématisation de la lésion de type III .....	44
<b>Figure 19</b> : Schématisation de la lésion de type IV.....	45
<b>Figure 20</b> : Schématisation de la lésion de type V .....	45
<b>Figure 21</b> : Schématisation de la lésion de type VI.....	46
<b>Figure 22</b> : Lésion aortique athéromateuse compliquée avec rupture de sa chape fibreuse	47
<b>Figure 23</b> : Les principales enzymes impliquées dans l'oxydation des LDL .....	48
<b>Figure 24</b> : Les marqueurs de surface des monocytes responsables de l'interaction avec les cellules endothéliales .....	49
<b>Figure 25</b> : Recrutement des monocytes circulants après activation de l'endothélium vasculaire.....	50
<b>Figure 26</b> : Les principaux marqueurs de surface des lymphocytes permettant les interactions avec les cellules endothéliales .....	51
<b>Figure 27</b> : Facteurs influencés par l'interaction CD40-CD40L entre lymphocytes et macrophages. ....	52
<b>Figure 28</b> : Estimation de la qualité des solutions commerciales de CRP purifiée et recombinante .....	80
<b>Figure 29</b> : Fractions monomérique et pentamérique des CRP commerciales .....	81
<b>Figure 30</b> : Comparaison de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL- 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ et IL-6 à partir de PBMC .....	83
<b>Figure 31</b> : Suivi de la viabilité cellulaire des PBMC au cours du temps de culture .....	84

<b>Figure 32</b> : Effets de la CRP purifiée sur l'expression en ARNm de cytokines pro-inflammatoires avec les PBMC .....	85
<b>Figure 33</b> : Effets de la CRPp sur les variations de concentrations protéiques de cytokines pro-inflammatoires dans les surnageants de culture de PBMC .....	86
<b>Figure 34</b> : Impact de l'azide de sodium sur la variation de l'expression en ARNm de l'IL-1 $\beta$ avec les PBMC .....	86
<b>Figure 35</b> : Effets de la CRPp sur l'expression en ARNm de MMP-9, de ses inhibiteurs TIMP-1, TIMP-2 et $\alpha$ 2-M ainsi que de PAI-2 avec les PBMC.....	87
<b>Figure 36</b> : Effets de la CRP sur les concentrations protéiques de proMMP-9, MMP-9 active et TIMP-1 dans les surnageants de culture de PBMC .....	88
<b>Figure 37</b> : Zymographie représentative de l'augmentation de l'activité catalytique de MMP-9 dans les surnageants de culture de PBMC .....	89
<b>Figure 38</b> : En A, zymographie représentative de l'activité gélatinase de la MMP-9 et de la MMP-2 dans les surnageants de culture de PBMC .....	90
<b>Figure 39</b> : Western-blot représentatif de la phosphorylation des protéines ERK1/2 induite par 25 $\mu$ g/mL de CRPp sur des PBMC .....	91
<b>Figure 40</b> : Effet de l'azide de sodium sur l'expression en ARNm de MMP-9 dans les PBMC .....	92
<b>Figure 41</b> : Analyse de la pureté des monocytes par cytométrie en flux .....	94
<b>Figure 42</b> : Impact de la purification sur l'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ et IL-6 par les monocytes.....	95
<b>Figure 43</b> : Variation en fonction du temps de l'expression en ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes .....	96
<b>Figure 44</b> : Variation de l'expression en ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes .....	97
<b>Figure 45</b> : Effets de la CRP purifiée (CRPp) sur l'expression en ARNm de MMP-9, PAI-2 et $\alpha$ 2-M dans les monocytes isolés.....	97
<b>Figure 46</b> : Effets de la CRP sur l'expression de proMMP-9 et MMP-9 active dans les surnageants de culture de monocytes isolés.....	98
<b>Figure 47</b> : Zymogramme représentatif de l'activité gélatinase de la MMP-9 dans des surnageants de culture de monocytes .....	99
<b>Figure 48</b> : Résultat représentatif de deux puces détectant 79 protéines différentes dans les surnageants de culture de monocytes isolés.....	100
<b>Figure 49</b> : Variations du VEGF-A mesurées par test ELISA dans les surnageants de culture de monocytes.....	101
<b>Figure 50</b> : Profil d'expression du VEGF-A (formes prédominantes VEGF 121 et VEGF 165) obtenu par RT-PCR dans les monocytes .....	102
<b>Figure 51</b> : Résumé des différents effets de la CRP observés sur les monocytes isolés .....	103
<b>Figure 52</b> : Cinétiques d'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires pour des cellules THP-1 .....	104
<b>Figure 53</b> : Effet de l'azide de sodium sur l'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ et TNF $\alpha$ dans des cellules THP-1 .....	105
<b>Figure 54</b> : Variations de l'expression en ARNm de cytokines pro-inflammatoires des cellules THP-1 .....	106
<b>Figure 55</b> : Variations de l'activité MMP-9 observée par zymographie dans les surnageants de cellules THP-1 .....	107
<b>Figure 56</b> : Variations des concentrations protéiques en MMP-9 total dans les surnageants des cellules THP-1 .....	108
<b>Figure 57</b> : Variations au cours du temps de l'expression en ARNm de MMP-9 avec les cellules THP-1 .....	108

<b><u>Figure 58</u></b> : Influence de certains inhibiteurs enzymatiques sur les variations de l'activité MMP-9 pour des cellules THP-1.....	109
<b><u>Figure 59</u></b> : Influence de l'azide de sodium sur la synthèse protéique de MMP-9 total dans les surnageants de cellules THP-1.....	110
<b><u>Figure 60</u></b> : Variations de l'expression en ARNm du VEGF-A dans les cellules THP-1.....	111
<b><u>Figure 61</u></b> : Effet dose-réponse de la CRP sur la libération de VEGF-A dans les surnageants de culture de cellules THP-1.....	112
<b><u>Figure 62</u></b> : Effet des contaminants de la solution commerciale de CRP sur l'expression du VEGF-A en ARNm dans les cellules et en protéines dans les surnageants des cultures de cellules THP-1.....	114
<b><u>Figure 63</u></b> : Effet des inhibiteurs PD98059, Ly294002, SB203580, SB202190 et cycloheximide sur la synthèse protéique de VEGF-A.....	116
<b><u>Figure 64</u></b> : Analyse par Western-blot des voies de signalisation ERK et p38MAPK dans les cellules THP-1.....	117
<b><u>Figure 65</u></b> : Analyse par Western-blot des voies de signalisation Akt et NFκB dans les cellules THP-1 traitées avec la CRP.....	118
<b><u>Figure 66</u></b> : Implication des récepteurs FcγRI et FcγRII dans l'expression de l'ARNm du VEGF-A sous l'action de la CRP.....	119
<b><u>Figure 67</u></b> : Mesure par cytométrie en flux de la fixation de la CRP sur les récepteurs FcγRI et FcγRII pour les cellules THP-1.....	120
<b><u>Figure 68</u></b> : Résumé des effets observés dans les cellules THP-1 en présence de CRP.....	122

## Liste des fiches techniques

Electrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	154
Coloration au bleu de Coomassie.....	155
Electrophorèse sur gel non dénaturant de polyacrylamide (PAGE) <sup>(1)</sup> .....	156
Coloration au nitrate d'argent.....	157
Retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP commerciales.....	158
Séparation des cellules mononucléaires sur gradient de Ficoll et mise en culture.....	159
Récupération des cellules après la mise en culture pour l'extraction d'ARN.....	160
Extraction d'ARN totaux à partir de cellules en culture.....	161
Vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose.....	162
Transcription inverse des ARN (RT).....	163
PCR quantitative en temps réel sur LIGHT CYCLER®.....	164
Zymographie.....	166
Extraction des protéines totales ou nucléaires/cytosoliques à partir de cultures cellulaires .....	167
Dosage des protéines.....	169
Western-Blot avec révélation par chimioluminescence (HRP).....	170
Deshybridation des membranes de Western-blot.....	173
Isolement des monocytes CD14+ par tri sélectif positif.....	174
Numération et test de viabilité par exclusion au bleu Trypan.....	175
Puces à protéines pour surnageants de culture cellulaire.....	176
Amplification de l'ADN par PCR.....	177
Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose.....	179
Culture cellulaire de la lignée THP-1.....	180

## **Abréviations**

µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
12-LO	12-lipoxygénase (12-lipoxygénase)
15-LO	15-lipoxygénase (15-lipoxygénase)
ABCA-1	ATP-binding cassette transporter A1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Akt	= PKB (protéine kinase B)
AP-1	Activator Protein-1
Apo	Apolipoprotein (apolipoprotéine)
ARN	Acide RiboNucléique
AT1R	Angiotensin Type 1 Receptor (récepteur de type 1 à l'angiotensine)
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (facteur de croissance basique des fibroblastes)
BNP	B-type Natriuretic Peptide (peptide natriurétique de type B)
BSA	Bovin Serum Albumin (albumine de sérum bovin)
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CCR2	Beta Chemokine receptor 2 (récepteur 2 aux bêta chimiokines = récepteur de MCP-1)
CETP	Cholesteryl Esters Transfer Protein (protéine de transfert des esters de cholestérol)
cGMP	Cyclic Guanosine 5' MonoPhosphate (guanosine 5' monophosphate cyclique)
CML	Cellules musculaires lisses
COX-2	CycloOxygenase-2 (cyclooxygénase-2)
c-PLA2	Cytosolic PhosphoLipase A2 (phospholipase A2 cytosolique)
CRP	C-Reactive Protein (protéine C-réactive)
CRPrec	Recombinant C-Reactive Protein (protéine C-réactive recombinante)
CS-1	Connecting segment-1 (segment 1 de raccordement)
CXCR-3	Chemokine (C-X-C motif) Receptor-3 (récepteur 3 aux chimiokines C-X-C)
DAF	Decay Accelerating Factor (facteur accélérateur de la dégradation de C3 convertase et C5 convertase)
DEPC	DiEthyl PyroCarbonate
DMSO	DiMethyl SulfOxide
dNTP	Désoxy Nucleotide TriPhosphate (désoxy nucléotide triphosphate)
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid (acide éthylène-diamine-tétraacétique)
EGF	Epidermal Growth Factor (facteur de croissance de l'épiderme)
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1 (molécule d'adhésion endothéliale leucocytaire 1)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (dosage immunoenzymatique)
EPC	Endothelial Progenitor Cells (cellules progénitrices endothéliales)
ERK	Extracellular-Regulated Kinase
ET-1	Endothelin-1 (endothéline 1)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FAK	Focal Adhesion Kinase
FcγR	Fc gamma Receptor (récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines)
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 (facteur 2 de croissance des fibroblastes)
Flt-1	Fms-like tyrosine kinase-1
GAPDH	GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (facteur stimulant des colonies macrophages et de granulocytes)
H	Heure
H2O <sub>d</sub>	Distilled Water (eau distillée)

HAEC	Human Aortic Endothelial Cells (cellules endothéliales aortiques humaines)
HASMC	Human Aortic Smooth Muscle Cells (cellules musculaires lisses vasculaires d'aorte humaine)
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells (cellules endothéliales d'artère coronaire humaine)
HDL	High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HGF	Hepatocyte Growth Factor (facteur de croissance des hépatocytes)
HIF-1	Hypoxia Inductible Factor-1 (facteur 1 inductible par l'hypoxie)
HL	Hepatic Lipase (lipase hépatique)
HRP	Horseradish Peroxydase (péroxydase de raifort)
hsCRP	High sensitivity C-Reactive Protein (protéine C-réactive ultra sensible)
HSP-60	Heat Shock Protein-60 (protéine de choc thermique 60)
ICAM-1	IntraCellular Adhesion Molecule 1 (molécule d'adhésion intracellulaire 1) = CD54
IDL	Intermediate Density Lipoprotein (lipoprotéine de densité intermédiaire)
IFN $\alpha$	InterFeroN alpha (interféron alpha)
IFN $\gamma$	InterFeroN gamma (interféron gamma)
IFN $\gamma$ R	InterFeroN gamma Receptor (récepteur de l'interféron gamma)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
IL-x	Interleukin x (1<x<23) (interleukine)
IP-10	Interferon-gamma inductible Protein-10 (protéine 10 inductible par l'IFN $\gamma$ )
I-TAC	Interferon-inductible T cell Alpha Chemoattractant
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (motif d'activation de l'immunorécepteur dépendant de la tyrosine)
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (motif d'inhibition de l'immunorécepteur dépendant de la tyrosine)
JNK	c-Jun N-terminal protein Kinase (protéine kinase c-jun N-terminal)
kDa	kiloDalton
KO	Knock Out
LCAT	Lécithine-Cholestéro-Acyl-Transférase
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
LDL-RP	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (protéine apparentée au récepteur des LDL)
LFA-1	Lymphocyte Function associated Antigen-1 (antigène-1 associé à la fonction lymphocytaire)
LOX-1	Lectin-like Oxidized LDL receptor 1
Lp(a)	Lipoprotein (a) (lipoprotéine (a))
Lp-PLA2	Lipoprotein-associated Phospholipase A2 (phospholipase A2 associée aux lipoprotéines)
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL Receptor related Protein (protéine apparentée au récepteur des LDL)
LT	T-Lymphocyte (lymphocyte T)
LXRE	Liver X Response Element (élément de réponse aux récepteurs X du foie)
LXR $\alpha$	Liver X Receptor alpha (récepteur X alpha du foie)
MASP	MAAnnose binding lectine Serine Protease (protéase à sérine de la MBL)
MBL	Mannose Binding Lectine (lectine liant le mannose)
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1 (protéine chimioattractante des monocytes 1)
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor (facteur stimulant des colonies macrophages)
MEK	MAP Kinase Kinase (= ERK Kinase)
MIG	Monokine induced by Interferon Gamma (monokine induite par l'IFN $\gamma$ )
min	Minute
MIP-1 $\alpha$	Macrophage Inflammatory Protein alpha (protéine inflammatoire macrophagique alpha)
MIP-1 $\beta$	Macrophage Inflammatory Protein beta (protéine inflammatoire macrophagique beta)
mL	Millilitre
MMP-1	Matrix MetalloProteinase-1 (métalloprotéinase matricielle 1)
MMP-2	Matrix MetalloProteinase-2 (métalloprotéinase matricielle 2)
MMP-3	Matrix MetalloProteinase-3 (métalloprotéinase matricielle 3)



MMP-8	Matrix MetalloProteinase-8 (métalloprotéinase matricielle 8)
MMP-9	Matrix MetalloProteinase-9 (métalloprotéinase matricielle 9)
MMP-13	Matrix MetalloProteinase-13 (métalloprotéinase matricielle 13)
MPO	MyeloPerOxidase (myéloperoxydase)
MT-MMP	Membrane Type MMP (MMP de type membranaire)
M-MULV	Moloney MURine Leukemia Virus
NFκB	Nuclear Factor kappa B (facteur nucléaire kappa B)
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
NO	Nitric Oxide (oxide nitrique)
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2 (NO synthétase 2)
NOS3	Nitric Oxide Synthase 3 (NO synthétase 3)
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1 (inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononucléées du sang périphérique)
PCPE	type I Collagen C-Proteinase Enhancer Protein
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes) = CD31
pg	Picogramme
PGE2	ProstaGlandin E2 (prostaglandine E2)
PGIS	Prostacycline Synthase (prostacycline synthétase)
PKC	Protéine Kinase C
PLCγ	Phospholipase C gamma
PLTP	PhosphoLipid Transfer Protein (protéine de transfert de phospholipides)
PPARα	Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosomes)
PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes)
PRE	Progesterone response element (élément de réponse à la progestérone)
PSGL-1	P-Selectin glycoprotein-1 Ligand (ligand de la glycoprotéine 1 P-sélectine)
PTGS2	ProsTaGlandin-endoperoxide Synthase 2 (prostaglandine-endoperoxide synthétase 2)
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RXR	Retinoids X Receptor
SAA	Serum Amyloid A (protéine amyloïde A sérique)
SDF-1	Stromal cell-derived Factor-1 (Facteur 1 dérivé des cellules stromales)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHIP	SH2 domain-containing Inositol Phosphatase (inositol-phosphatase à domaine SH2)
SIL-1R	Soluble InterLeukin 1 Receptor (récepteur soluble à l'interleukine 1)
SMase	SphingoMyelinase (sphingomyélinase)
s-PLA2	Secretory PhosphoLipase A2 (phospholipase A2 sécrétoire)
SR-A	Scavenger Receptor A (récepteur éboueur A)
SR-B1	Scavenger Receptor B1 (récepteur éboueur de classe 1)
TF	Tissue Factor (facteur tissulaire)
TFPI-2	Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (inhibiteur 2 de la voie de signalisation du TF)
TGF-β	Transforming Growth Factor beta (facteur de croissance transformant bêta)
TIMP-1	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 1 (inhibiteur 1 tissulaire des métalloprotéinases)
TIMP-2	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 2 (inhibiteur 2 tissulaire des métalloprotéinases)
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha (facteur alpha nécrosant des tumeurs)
TNFβ	Tumor Necrosis Factor beta (facteur bêta nécrosant des tumeurs)
t-PA	Tissue-type Plasminogen Activator (activateur tissulaire du plasminogène)
u-PA	Urokinase-type Plasminogen Activator (activateur du plasminogène de type urokinase)
UV	UltraViolet
V	Volt
VCAM-1	Vascular Cellular Adhesion Molecule (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1)

VLA-4	Very Late Antigen-4
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de très faible densité)
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells (cellules musculaires lisses vasculaires)
XIAP	X-chromosome-linked inhibitors of apoptosis
$\alpha$ 2-M	alpha-2 Macroglobulin (alpha 2 macroglobuline)

***Introduction***

Les maladies cardiovasculaires représentent aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés et sont responsables du tiers des décès en France.

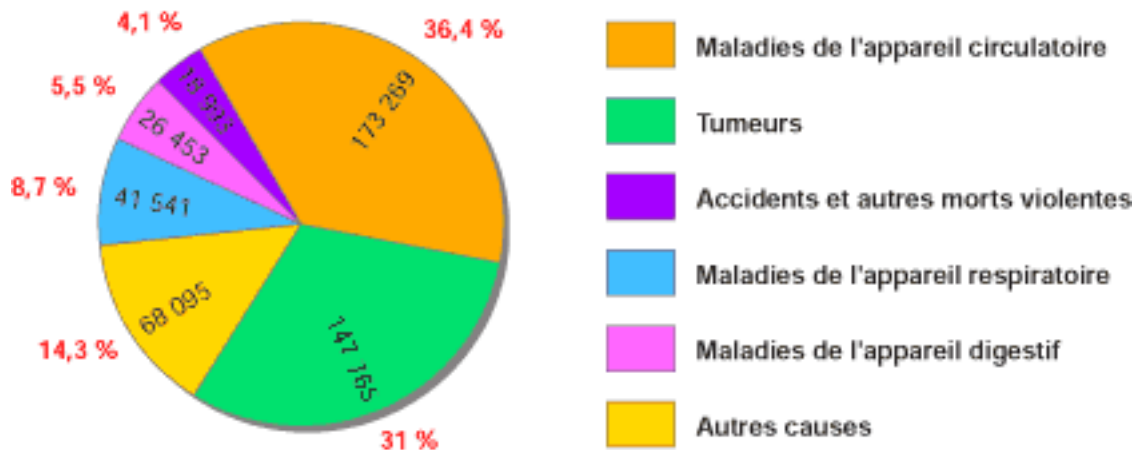


Figure 1 : Répartition des causes de mortalité en France

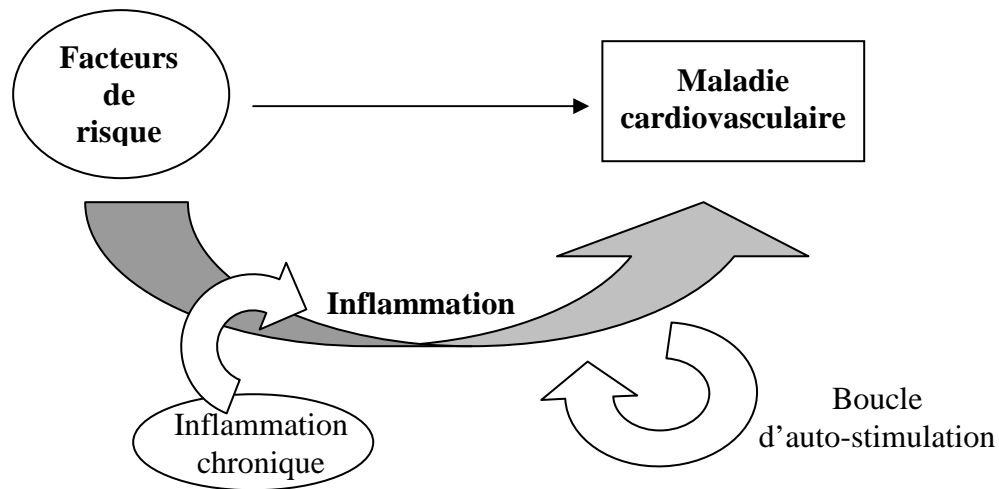
Le terme de maladies cardiovasculaires regroupe les maladies coronariennes (angine de poitrine et infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux (AVC), l'artériopathie des membres inférieurs ainsi que l'insuffisance cardiaque.

La probabilité d'apparition d'une maladie cardiovasculaire est liée à un ou à plusieurs facteurs de risque. Ces facteurs sont de différentes origines et sont classés selon leur implication dans la survenue d'une pathologie. Il existe donc les facteurs de risque majeurs, regroupant l'hypertension artérielle (HTA), l'excès de cholestérol et de triglycérides, le tabac, le diabète et l'augmentation du taux plasmatique de la protéine C-réactive (CRP), les facteurs de risque mineurs (sédentarité, stress, embonpoint) et les facteurs de risque dits immuables que sont le sexe, l'âge et les facteurs génétiques.

Les maladies cardiovasculaires s'imbriquent dans un cadre conceptuel particulier et dépendent des facteurs de risque mais également du facteur inflammation.

L'origine inflammatoire peut provenir des facteurs de risque eux-mêmes, d'une inflammation chronique liée à la polyarthrite rhumatoïde [1], au lupus érythémateux [2] ou lors d'insuffisance rénale chronique [3]. Par exemple, le phénomène inflammatoire est capable de s'auto-amplifier en fonction de la susceptibilité génétique de l'individu, de l'environnement,

dans le cas de prise de médicaments de manière chronique mais également lors d'infections chroniques par des bactéries ou des virus [4, 5].



La réaction inflammatoire étant un processus complexe, difficile à décrire et à mesurer de manière objective, il a fallu proposer des biomarqueurs de l'inflammation. Ces molécules qui participent à la réaction inflammatoire doivent répondre à un certain nombre de critères pour être considérées comme telles. Le milieu biologique contenant la molécule doit être facile à prélever ou à obtenir et son dosage doit pouvoir se faire en routine avec fiabilité et un coût moindre. Différents dosages de cette molécule, espacés de plusieurs mois, doivent prédire, de manière similaire, un risque de développer un phénotype particulier plusieurs années après. Il doit exister une linéarité entre la concentration du biomarqueur et l'importance du risque et les variations de sa concentration doivent être rapides. La valeur prédictive d'un biomarqueur doit être associée à un phénotype particulier et ne doit être corrélée ni avec les autres biomarqueurs, ni avec les facteurs de risque associés au phénotype étudié et les variations de concentration du biomarqueur doivent prédire un risque de développer un phénotype inscrit dans une pathologie précise. La relation de causalité entre le biomarqueur et le phénotype doit être clairement définie au niveau cellulaire et moléculaire. Les résultats des dosages doivent influencer le type d'approche clinique chez les patients concernés et il doit exister une association entre les variations de concentration du biomarqueur obtenues pharmacologiquement et un effet bénéfique. Enfin, ce bénéfice doit être conservé indépendamment des variations des autres biomarqueurs ou facteurs de risque.

Plusieurs marqueurs sont utilisés en pratique clinique, d'autres dans les études cliniques mais très peu de biomarqueurs de l'inflammation répondent à tous ces critères. Parmi eux, la protéine C-réactive (CRP) semble être le plus puissant biomarqueur de l'inflammation indépendant prédictif du risque cardiovasculaire mais ses effets moléculaires et cellulaires ne sont pas encore clairement définis.

***Revue Bibliographique***

## I. Caractères généraux de la CRP

### I.1 Le gène

#### I.1.a Localisation

Le gène de la CRP a été cartographié dans l'espèce humaine sur le bras court du chromosome 1 entre 1q21 et 1q23. Il est constitué de 1913 bases et ne contient qu'un seul intron [6]. De nombreux polymorphismes de ce gène ont été décrits mais seulement trois ont été associés à une variation de la concentration plasmatique de CRP [7-9]. Le gène de la CRP génère un ARN de 1631pb.

#### I.1.b Régulation de l'expression du gène de la CRP

Le promoteur du gène de la CRP contient plusieurs éléments de réponse à l'interleukine-1 beta (IL-1 $\beta$ ) et à l'interleukine 6 (IL-6) (Figure 2). L'expression du gène de la CRP dans les hépatocytes est influencée par deux cytokines pro-inflammatoires que sont l'interleukine-1 beta (IL-1 $\beta$ ) et l'interleukine 6 (IL-6). L'IL-6 seule est capable d'activer l'expression du gène de la CRP alors que l'IL-1 $\beta$  ne le peut qu'en synergie avec l'IL-6 [10]. La régulation par l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  fait intervenir différents facteurs de transcription que sont C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  (ou NF-IL-6 beta), et STAT3. L'IL-1, quant à elle, permet la fixation de Rel p50 sur le site NF $\kappa$ B en position -46 ou -2652. C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  peuvent interagir avec deux éléments de réponse à l'IL-6 (IL-6RE) présents dans le promoteur du gène de la CRP et centrés en position -53 et -219. STAT3 est capable de se fixer en position -108 [11-15] et de favoriser la synthèse du gène de la CRP.

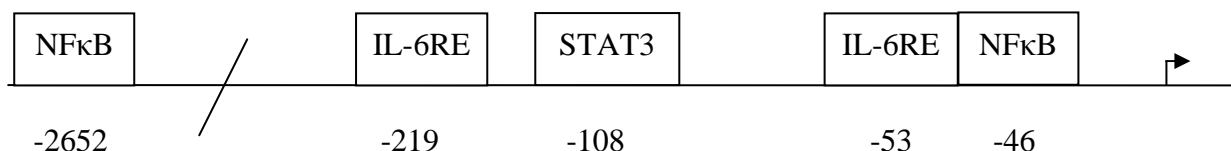


Figure 2 : Promoteur du gène de la CRP



## I.2 La protéine

### I.2.a Historique

Découverte en 1930 par Tillet et Francis, la protéine C-réactive (CRP) a été isolée à partir de sérums de patients atteints d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*. Elle tient son nom de la réactivité qu'elle exerce vis-à-vis du polysaccharide C contenu dans la paroi cellulaire des pneumocoques.

### I.2.b Structure de la protéine

#### I.2.b.a Structure primaire

La traduction de l'ARNm issu du gène de la CRP génère un protomère de 224 acides aminés qui a été séquencé. Sa structure primaire est indiquée ci-dessous :

```

1 mekl1cflvl tslshafgqt dmsrkafvfp kesdtsyvsl kapltkplka ftvclhfyte
61 lsstrgysif syatkrqndne ilifwskdig ysftvvggsei lfevpevtva pvhictswes
121 asgivefwvd gkprvrkslk kgytvgaeas iilgqeedsf ggnfegsqsl vgdignvnmw
181 dfvlspdein tiylggpfsp nvlnwralky evqgevftkp qlwp

```

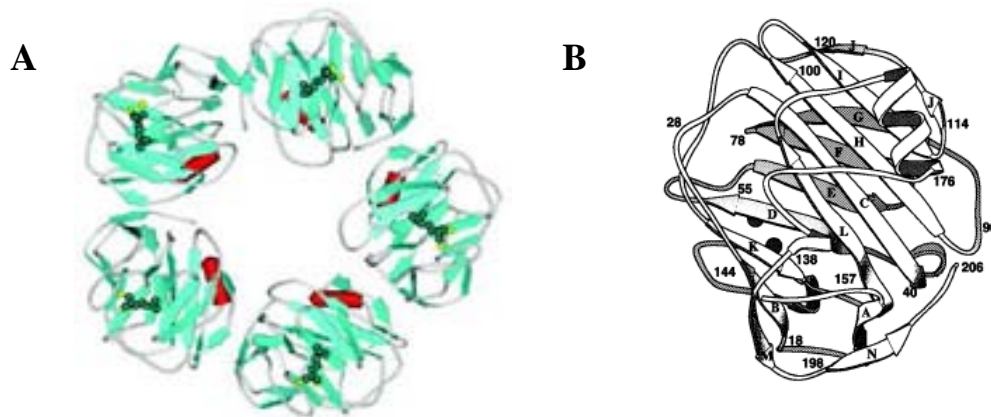
**Figure 3** : Séquence protéique primaire de la protéine C-réactive.

#### I.2.b.β Structures secondaire et tertiaire

La CRP appartient à la famille des pentraxines. Elle s'organise sous forme d'un pentamère de 115kDa et de 102Å de diamètre externe avec un pore central de 30Å (Figure 4A). Les monomères de 36Å de diamètre et 23kDa chacun sont organisés de manière similaire et sont reliés entre eux par des liaisons non covalentes. Chaque protomère contient un site de fixation à la phosphorylcholine [16, 17] associé à deux sites de fixation au calcium (Figure 4B). Tous ces sites sont situés sur la même face du pentamère (face de reconnaissance du pentamère).

Le site de fixation à la phosphorylcholine est constitué d'une poche hydrophobe formée par les résidus Leu64, Phe66 et Thr76. Les deux sites de fixation au calcium sont situés au niveau des résidus Asp60, Asn61, Glu138, Asp140 pour le premier site et au niveau des résidus Glu138, Asp140, Gln150, Glu147 pour le second [18]. La fixation de calcium facilite celle de la

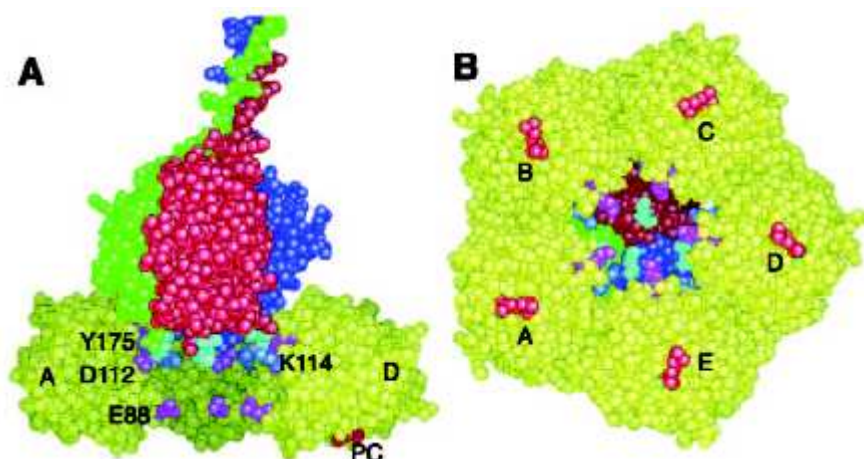
phosphorylcholine sur le résidu Phe66 de la poche hydrophobe et Glu81 [19] avec une constante de fixation de  $K_a=0,62.10^6 \text{ M}^{-1}$  [20].



**Figure 4** : Structure cristalline de la CRP.

A : structure du pentamère complexé à la phosphocholine (sphères noires et blanches) [21]. B : structure secondaire d'un monomère de la CRP constituée de deux feuillets  $\beta$  antiparallèles ainsi que d'une longue hélice  $\alpha$  (résidus 168 à 176). Les deux sites de fixation pour le calcium sont représentés par les sphères noires [22].

La face située à l'opposé (face effectrice) permet la fixation de ligands comme le facteur C1q du complément (Figure 5) ou comme le récepteur à la partie Fc des immunoglobulines (Fc $\gamma$ R). Le site de fixation de C1q a été localisé par mutagenèse dirigée au niveau des résidus de contact Asp112 et Tyr175 par mutagenèse dirigée. Le résidu Glu88 semble influencer le changement conformationnel de C1q nécessaire à l'activation du complément alors que les résidus His38 et Asn158 contribuent à la forme du site de fixation [23].



**Figure 5** : Fixation de C1q sur le pentamère de CRP [21].

Les monomères de la CRP sont définis de A à E. En A : vue de face. Les monomères B et C ont été effacés pour plus de clarté. Les 3 modules de C1q sont montrés en bleu, vert et rouge. Les résidus Asp112 et Tyr175 sont représentés respectivement par D112 et Y175. En B : vue perpendiculaire. Les résidus phosphocholine sont colorés en rouge.

Un modèle de fixation de C1q sur la CRP a été proposé dans lequel la tête de C1q, positivement chargée, interagit avec le pore central négativement chargé du pentamère permettant ainsi l'interaction de C1q avec deux des cinq protomères.

### *1.2.b.γ Modifications post-traductionnelles*

Peu de modifications post-traductionnelles ont été décrites sur la CRP. Une étude récente chez l'Homme a cependant permis de démontrer que la CRP pouvait être glycosylée de manière pathologie-dépendante [24].

### *1.2.c Formes biologiques de la protéine CRP*

Dans des conditions physiologiques, plusieurs formes de la protéine ont été décrites. La CRP peut être présente sous forme cyclique pentamérique (CRP native) prédominante au niveau plasmatique ou sous forme monomérique (CRP modifiée) située préférentiellement dans les tissus. Il existe également des formes intermédiaires conformationnellement altérées ou agrégées et différemment glycosylées. La localisation et les fonctions des différentes formes ne sont que peu documentées et souvent contradictoires.

Il semblerait malgré tout que la forme monomérique soit associée à une réponse pro-inflammatoire alors que la forme pentamérique favoriserait la résolution de l'inflammation [25, 26]. Leurs activités respectives sont variables et la CRP monomérique est responsable d'un nombre plus important d'effets biologiques en comparaison à la CRP pentamérique.

Seule la CRP monomérique semble capable d'activer les cellules endothéliales et les neutrophiles. Khreiss et al. [26] ont démontré que la CRP sous forme monomérique en contact avec des cellules HCAEC augmentait la libération d'IL-8 et de MCP-1 ainsi que l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine par l'intermédiaire de CD16 (FcγRIII). Ces observations ont également été effectuées avec la CRP pentamérique mais à des temps beaucoup plus tardifs correspondant au moment de la cinétique *in vitro* où l'on observe la dissociation de la CRP pentamérique en monomères.

Après plusieurs études sur des neutrophiles, il apparaît que la CRP monomérique induit la libération d'IL-8 ainsi que la formation de NO via le récepteur CD16 et non via le récepteur CD32. L'effet est également observé avec la CRP pentamérique mais toujours après des durées plus importantes de contact [27]. Il a également été décrit une diminution de la L-selectine et une

augmentation de CD11b liée à la CRP monomérique [25], cette régulation passant par une voie Ras/Raf/MEK.

Il est tout de même défini quelques activités propres à la CRP pentamérique telles que la fixation à la phosphocholine ou/et au calcium. Une étude chez des souris ApoE  $-/-$  a permis de définir deux observations opposées sur l'évolution de la taille de la plaque d'athérome selon le traitement avec CRP monomérique ou pentamérique [28].

Toutes ces observations nous permettent d'avancer que la forme pentamérique, dont l'activité semble limitée au niveau plasmatique, se doit de passer par une étape de dissociation de ses monomères pour acquérir un certain nombre de fonctions biologiques qui ont pu être d'ores et déjà définies sur des cellules endothéliales et sur des neutrophiles. L'existence d'une forme de CRP intermédiaire entre la pCRP et la mCRP et capable de se fixer aux cellules HUVEC a même été avancée [29].

#### *1.2.d Synthèse et localisation*

La CRP est synthétisée principalement dans le foie par les hépatocytes et est ensuite libérée au niveau plasmatique. Il a également été décrit une synthèse de la CRP par les cellules musculaires lisses et les macrophages au niveau des lésions athéromateuses [30, 31] mais aussi par les neurones [32], les macrophages alvéolaires [33], les lymphocytes [34] ainsi que dans le rein [35]. La CRP synthétisée par les hépatocytes est de nature pentamérique et les cellules type cellules musculaires lisses, monocytes/ macrophages synthétiseraient de la CRP monomérique. La CRP présente dans la paroi sous forme monomérique proviendrait donc soit de ces cellules soit d'une dissociation de la CRP « hépatique » ou des deux. La protéine est détectable dans l'intima des artères, sous sa forme pentamérique ou monomérique dans les vaisseaux sanguins associés à des tissus sains [36] mais également dans les phases précoces de l'athérogenèse où elle s'accumule avec la progression des lésions [37-40].

#### *1.2.e Concentration plasmatique*

Chez un individu sain, la concentration plasmatique basale en CRP est inférieure à 1mg/L et est indépendante du sexe [41-44], de l'âge, du niveau de cholestérol, de la pression sanguine, du diabète, du tabagisme mais des informations contradictoires sont rapportées quant au taux basal de CRP entre les différents groupes ethniques [41, 45]. Seules les femmes sous traitement hormonal de substitution présentent une concentration en CRP légèrement plus élevée [46, 47]. Il n'existe pas de variations diurnes de cette concentration [48]. En cas d'infection ou

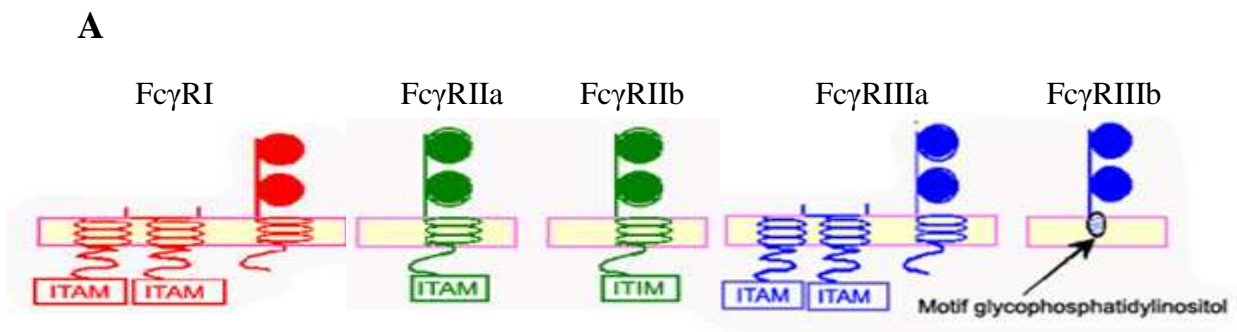
d'inflammation, cette valeur peut être augmentée de manière transitoire d'un facteur 1000 ce qui explique sa dénomination de protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Chez les individus présentant un risque de développer un accident vasculaire, les concentrations de CRP ne sont que peu augmentées par rapport à la normale mais cette élévation est conservée durant plusieurs mois voire plusieurs années [46, 47].

### *1.2.f Récepteurs*

Hormis quelques travaux assez anciens [49-51], de nombreux auteurs s'accordent à dire que la CRP interagit avec les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines (FcγR) mais l'existence d'un récepteur spécifique à la CRP n'est pas exclu [52]. Il existe trois catégories de récepteurs FcγR, activateur ou répresseur selon la sous-classe et dont la localisation varie selon le type cellulaire (Figure 6) [52-55, 56, 57]. Aucun récepteur à la CRP n'a été caractérisé sur les cellules musculaires lisses et une seule étude démontre la présence de FcγRII sur des cellules endothéliales bovines [58].

A l'aide de lignées cellulaires exprimant de manière différentielle ces différents récepteurs [52, 54, 56, 57, 59] ou à partir de cellules transfectées avec un ou plusieurs de ces récepteurs [59, 60], il a été démontré que la CRP pouvait interagir avec les récepteurs FcγRI [55, 61] avec une faible affinité ( $K_a=1,6 \times 10^5 M$ ) et FcγRIIa avec une forte affinité ( $K_a=1,5 \times 10^7 M$ ) [52]. La faible affinité de la CRP pour le récepteur FcγRI a été remise en cause depuis [60]. Une étude récente par mutations spécifiques des récepteurs FcγRI et FcγRIIa démontre qu'il existe bien des acides aminés essentiels permettant une interaction avec la CRP [62].

Un polymorphisme pour le récepteur FcγRIIa a été décrit en position 131 [63]. Il a été noté une baisse de la fixation de la CRP sur ce récepteur chez les homozygotes H131-H131 alors que cette fixation reste élevée pour les génotypes H131-R131 et R131-R131 [52]. Cette observation a été très récemment contredite [64]. Malgré ces résultats controversés, une association a été démontrée entre la présence de l'allèle H131 et une protection contre l'athérosclérose [65].



**B**

Récepteur	FcγRI (CD64)	FcγRIIa (CD32a)	FcγRIIb (CD32b)	FcγRIIc (CD32c)	FcγRIIIa (CD16a)	FcγRIIIb (CD16b)
Type cellulaire						
Monocytes	+	+	+		+	
Macrophages	+	+	+		+	
Granulocytes		+			+	
Neutrophiles	+	+				+
Cellules dendritiques	+	+	+			
Lymphocytes B		+	+			
Lymphocytes T					+	
Cellules NK				+	+	

**Figure 6** : Les différentes classes de récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines dans l'espèce humaine. **A** : Différences structurales des différentes classes de récepteurs. Les récepteurs dits activateurs possèdent, dans leur partie intracellulaire, le motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) capable d'induire une cascade de phosphorylations via les familles de tyrosine kinases src et syk conduisant à la synthèse de différents gènes cibles. Le récepteur FcγRIIb est qualifié d'inhibiteur de par la présence d'un motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) au niveau de sa chaîne de transduction. Lorsqu'un ligand se fixe sur FcγRIIb, le motif ITIM se place à proximité d'un motif ITAM et peut alors interagir avec une protéine inhibitrice du signal de transduction appelée SHIP, interférant ainsi avec le signal généré à partir de ITAM (d'après <http://www.ucl.ac.uk/~regfjxe/FcR.gif>). **B** : Répartition des différentes classes de récepteurs selon le type cellulaire. Les + indiquent la présence du type de récepteur sur le type cellulaire correspondant.

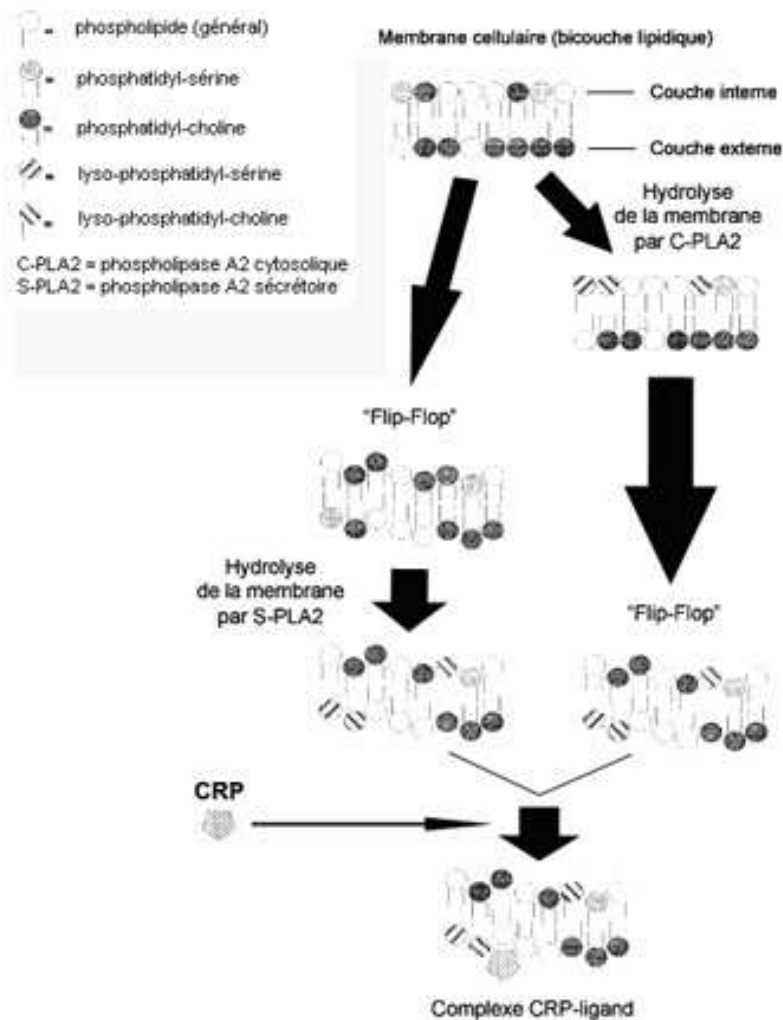
Les conditions de fixation de la CRP sur ses récepteurs ne sont pas encore clairement définies mais deux études semblent indiquer une fixation et une action directe de la CRP monomérique [26, 66].

**I.3 Fonctions de la CRP**

*I.3.a Opsonisation, activation du complément et phagocytose*

La CRP joue un rôle important dans la médiation de la phagocytose [67, 68]. Elle peut se comporter comme un facteur opsonisant des phospholipides des parois bactériennes et des

membranes des cellules apoptotiques ou nécrotiques [60, 68-70]. D'autres ligands de la CRP tels que la phosphoryléthanolamine (PE) [71], certains polycations [72, 73], la chromatine et les histones [74], la fibronectine [75] et la protéine de surface A de *Staphylococcus aureus* [76] ont été caractérisés.



**Figure 7** : Modèle d'interaction entre la CRP et les phospholipides membranaires. D'après Lagrand (modifié) [77].

Les lyso-phospholipides générés par les phospholipases A2 cytosolique et sécrétoire (c-PLA2 et s-PLA2) au niveau de la face externe de la bicouche lipidique constituent des ligands pour la CRP. Suite à un stress cellulaire, les phospholipides des deux couches et les lyso-phospholipides de la face interne de la bicouche lipidique subissent des phénomènes de "Flip-Flop". On observe alors une répartition plus homogène des lyso-phospholipides au sein de la membrane cellulaire contrairement à l'asymétrie observée pour les cellules normales. La fixation de la CRP aux résidus lyso-phosphatidyl-choline de la couche externe va permettre la reconnaissance puis la lyse de la cellule ou de la bactérie liée (Figure 7). Par sa face effectrice, la

CRP peut alors activer le système du complément par interaction directe avec le facteur C1q et/ou interagir avec les cellules phagocytaires par Fc $\gamma$ R.

La fixation de la CRP à un de ces ligands induit un changement conformationnel de la protéine et permet la fixation du facteur C1q du complément qui révèle alors l'activité enzymatique de C1r (Sérine protéase). Cette fixation correspond à la première étape d'activation de la voie classique du complément aboutissant à la lyse des cellules ou des bactéries complexées à la CRP via la formation d'un complexe d'attaque membranaire [23].

La CRP peut également réguler négativement les deux autres voies du complément : la voie alterne et la voie des lectines qui rejoint la voie classique au niveau de la dissociation du facteur C4 en C4a et C4b. La voie alterne, boucle d'amplification de la voie classique, peut être naturellement inhibée par le facteur H conduisant à la dégradation du facteur C3b empêchant ainsi la formation du complexe d'attaque membranaire. Le facteur H est incapable de fixer les membranes des cellules endommagées. La CRP sert alors d'intermédiaire en fixant d'une part les membranes cellulaires et d'autre part le facteur H, restaurant la fonction inhibitrice de ce dernier [78]. La voie des lectines requiert l'intégrité de la voie alterne pour initier l'activation de la voie classique du complément par le complexe MBL. La CRP, par inhibition du facteur H, bloque la voie alterne du complément et par la même occasion la voie des lectines [79] (Figure 8).

Récemment, un nouveau mécanisme de régulation du complément a été découvert. La CRP serait responsable de la surexpression par les cellules endothéliales de trois facteurs inhibiteurs du complément que sont DAF (decay accelerating factor), CD46 et CD59 [80].

La lyse cellulaire par le système du complément peut être corrélée avec l'intervention de cellules phagocytaires [81], ces dernières ne nécessitant pas forcément une action préliminaire du complément pour exercer leur activité. La fixation de la CRP sur les cellules phagocytaires serait assurée par les récepteurs Fc $\gamma$ RI [82-84] et Fc $\gamma$ RIIa [54, 59, 82] présents à la surface de ces cellules. Les récepteurs aux facteurs du complément CR1 (CD35) et CR3 (CD11b) ont été localisés à la surface des cellules phagocytaires et pourraient être impliqués dans l'endocytose des particules opsonisées par la CRP. Le récepteur CR1 est capable de fixer les facteurs C3b et C4b alors que le récepteur CR3 peut lier le facteur iC3b obtenu après intervention du facteur H sur C3b. Les cellules apoptotiques, opsonisées par la CRP et possédant à leur surface les facteurs C3b, C4b et iC3b, pourront alors être capturées par les cellules phagocytaires.



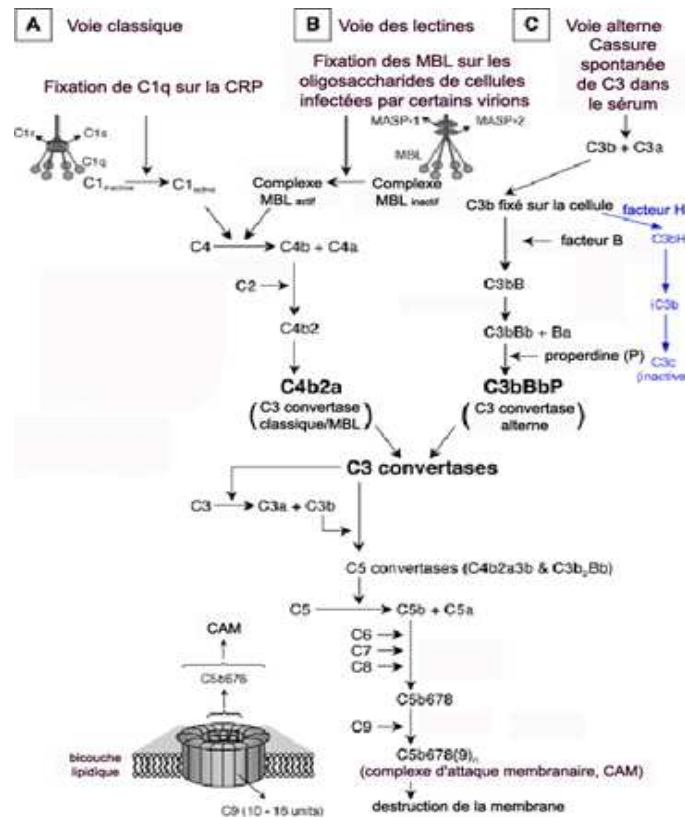


Figure 8 : Les différentes voies du complément régulées par la CRP.  
D'après Favoreel (modifié) [85]. MBL : mannose binding lectine ; MASP : mannose-binding lectine serine protease.

**Résumé des fonctions d'opsonisation et de phagocytose associées à la CRP :**

La CRP peut opsoniser les débris nucléaires et la chromatine mais aussi les parois de bactéries pathogènes et les membranes de cellules endommagées ou en apoptose. Elle peut alors activer le système du complément et/ou interagir avec des cellules phagocytaires pour provoquer la lyse des bactéries ou des cellules. La CRP monomérique est capable d'activer le complément de manière plus efficace que la CRP sous forme pentamérique et est également capable de fixer les LDL natifs et modifiés.

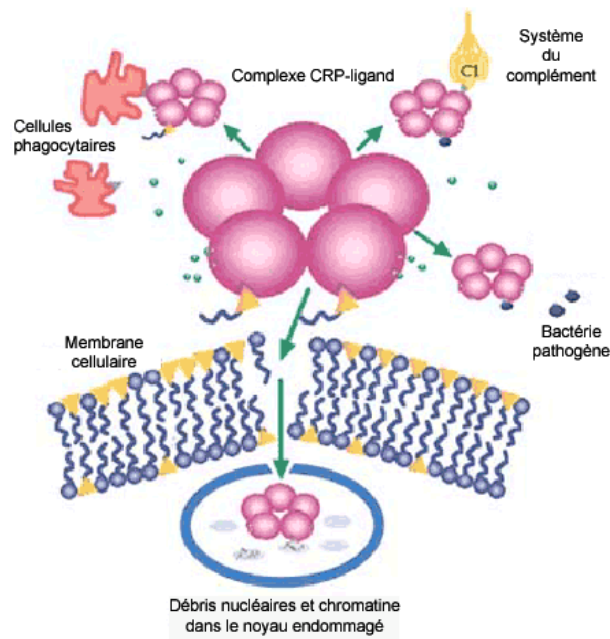


Figure 9 : Les différentes fonctions associées à la CRP. D'après Joan, M (modifié).

### 1.3.b CRP et cholestérol

Les lipides jouent un rôle central dans le fonctionnement de l'organisme en participant à diverses fonctions telles que le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires, le métabolisme énergétique, la croissance cellulaire ou la synthèse d'hormones stéroïdes. De par leur hydrophobicité, les lipides sont empaquetés dans des particules particulières appelées lipoprotéines permettant ainsi leur transport dans les fluides biologiques tels que le sang [86]. Ces particules sont constituées de trois couches : un cœur hydrophobe composé d'ester de cholestérol, d'acides gras libres et de triglycérides ; une enveloppe de phospholipides et de cholestérol et une couche externe contenant diverses protéines.

Les lipoprotéines sont séparées en 5 classes selon leur diamètre, leur densité, leur mobilité électrophorétique et leur composition (Figure 10). On distingue donc par ordre décroissant de diamètre, les chylomicrons, les VLDL (lipoprotéine de très faible densité), les IDL (lipoprotéine de densité intermédiaire), les LDL (lipoprotéine de faible densité) communément décrits comme "mauvais" cholestérol et les HDL (lipoprotéine de haute densité) comme "bon" cholestérol.

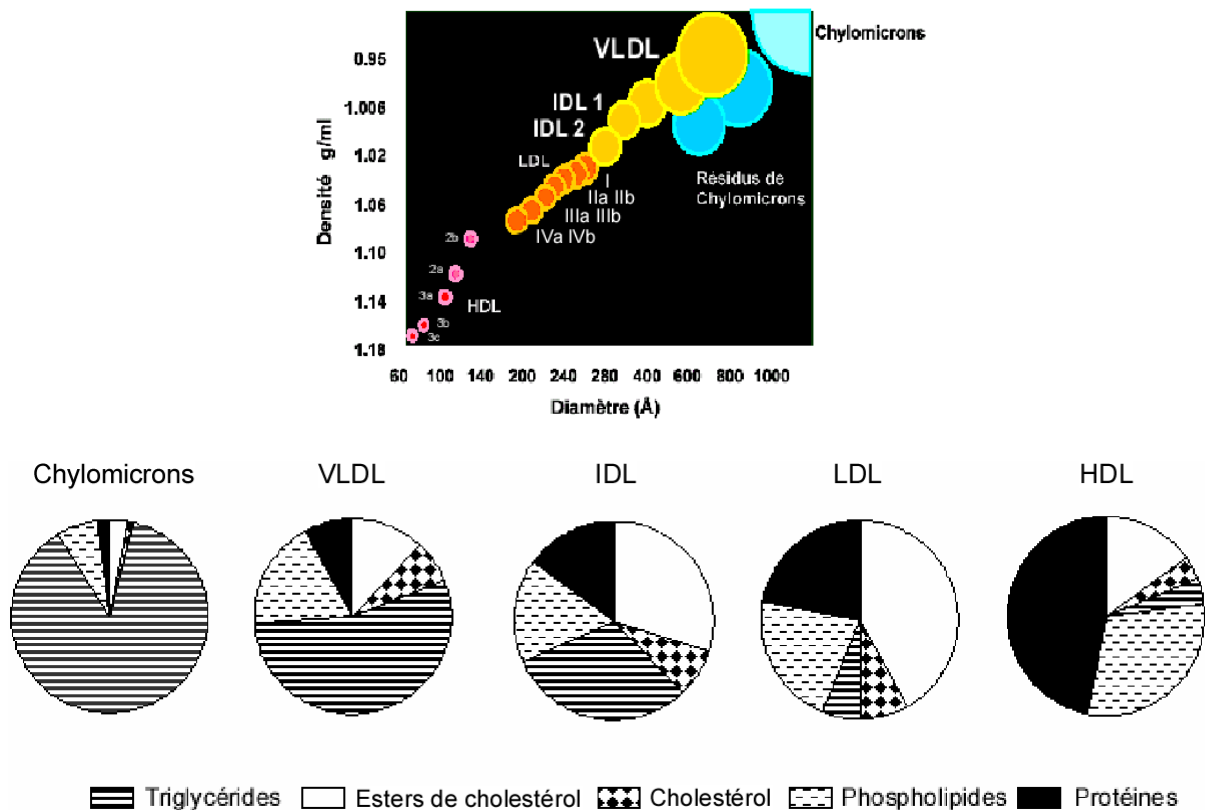


Figure 10: Les 5 sous-classes de lipoprotéines classées selon leur densité et leur diamètre (9A) d'après : [http://www.chusa.jussieu.fr/disc/bio\\_cell/PCEM2/EIA\\_cardio/PB\\_LiposCourseEIAC041.pdf#search='LDL %20taille'](http://www.chusa.jussieu.fr/disc/bio_cell/PCEM2/EIA_cardio/PB_LiposCourseEIAC041.pdf#search='LDL%20taille'), modifié), et selon leur composition (9B).

Parmi les protéines de la couche externe figurent les apolipoprotéines ou apoprotéines (apo), spécifiques de chaque sous-classe de lipoprotéines et intervenant aussi bien lors des interconversions des lipoprotéines que dans la reconnaissance cellulaire dans le cadre du métabolisme du cholestérol. Il existe deux courants de cholestérol dans l'organisme : la voie impliquant les chylomicrons, VLDL, IDL et LDL qui transportent le cholestérol des organes (foie, intestins) vers les tissus et cellules périphériques et le transport inverse du cholestérol impliquant les HDL pour le transport du cholestérol des cellules périphériques vers le foie.

Les VLDL, synthétisées dans le foie et formées à partir du cholestérol d'origine endogène, incorporent l'apoprotéine apoB100 et sont ainsi préparées au transport de triglycérides et de cholestérol du foie vers les autres tissus. Ils restent cependant dans un état inactif jusqu'à ce qu'ils captent apoE et apoC2 cédés par les HDL. ApoC2 est capable d'activer une enzyme appelée lipoprotéine lipase (LPL) au niveau des capillaires sanguins et permet ainsi la transformation de VLDL en IDL [86] par hydrolyse de triglycérides qui seront absorbés par le tissu adipeux ou par les muscles adjacents. Environ la moitié des IDL formés sont recaptés directement par le foie via un récepteur reconnaissant apoB [87]. Les triglycérides des IDL

restants sont hydrolysés par une autre enzyme, la lipase hépatique (HL) générant ainsi des LDL [88]. Environ 75% des LDL sont captés par le foie via les récepteurs spécifiques de apoB, 24% sont distribués dans les autres tissus et 1% des LDL sont retirés de la circulation par des cellules présentant des récepteurs "éboueurs" (CD36 et SR-A). Ces récepteurs reconnaissent la forme apoB oxydée présente lorsque les LDL persistent trop longtemps dans la circulation.

Par la voie exogène, les acides biliaires et le cholestérol issus du foie ainsi que les lipides provenant de l'alimentation forment les chylomicrons dans l'intestin. Ils portent à leur surface les mêmes apoprotéines apoE et apoC2 que les VLDL plus une variante d'apoB intestinale (apoB48). Ils se transforment en résidus de chylomicrons par perte de triglycérides après hydrolyse de la LPL au niveau des capillaires sanguins. Les résidus de chylomicrons, enrichis en apoE, sont ensuite directement recaptés par le foie via les récepteurs reconnaissant apoE et via des récepteurs apparentés aux récepteurs des LDL, les LRP (LDL receptor related protein) et sont catabolisés par la HL au sein des hépatocytes [89].

Les HDL ont une fonction propre dans le transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie. Trois mécanismes distincts régulent la sortie de cholestérol stocké à l'intérieur du foie et des macrophages [90] :

- la voie du transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) : présent au niveau du foie, de l'intestin et des membranes des macrophages, ce transporteur est l'accepteur préférentiel de apoA-1, pauvre en lipides et qui déclenche l'efflux de cholestérol cellulaire et de phospholipides. Cet efflux permet de former des pré-HDL ayant incorporé apoA-1 et qui deviennent sphériques et matures (HDL3). Après estérification du cholestérol par la lécithine-cholestéro-acyl-transférase (LCAT) ils deviennent des HDL2 plus gros et plus denses.
- la voie du récepteur "éboueur" SR-B1 (scavenger receptor B1) : cette voie est apoA-1 indépendante et permet le passage de cholestérol libre de la cellule vers les HDL matures.
- la diffusion passive : comme son nom l'indique, cette voie d'efflux du cholestérol s'effectue directement à travers les membranes cellulaires sans intervention de récepteurs ni de facteurs régulateurs externes.

Les voies ABCA1 et SR-B1 sont modulées par la concentration intracellulaire en cholestérol. Une augmentation intracellulaire en cholestérol se traduit par une augmentation de la synthèse des récepteurs X du foie (LXR : liver X receptor) qui, dimérisés aux récepteurs X aux

rétinoïdes (RXR : retinoid X receptor), activent la synthèse des récepteurs ABCA1 et SR-B1, ce qui facilite l'efflux de cholestérol vers le milieu extracellulaire (Figure 11).

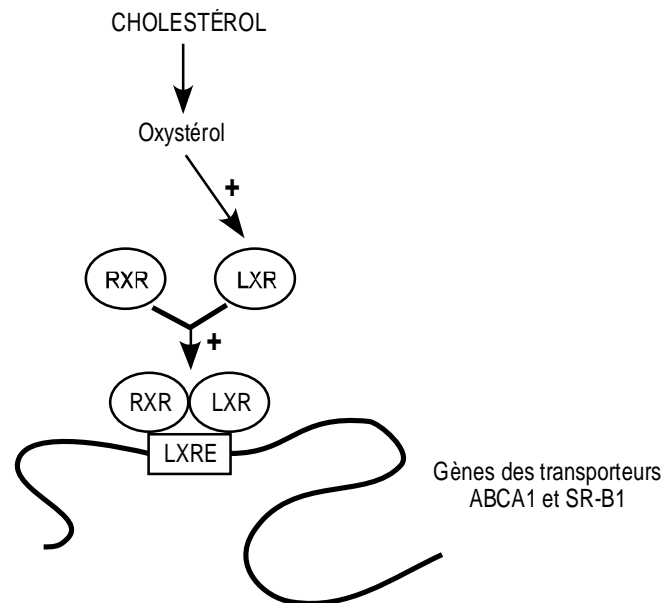


Figure 11 : Influence du cholestérol intracellulaire sur la synthèse des récepteurs ABCA1 et SR-B1.

Les oxystérols formés à partir du cholestérol intracellulaire activent la synthèse de LXR qui se dimérise alors avec RXR. Ce complexe se fixe sur son élément de réponse (LXRE : liver X response element) présent dans la zone de régulation des gènes des transporteurs ABCA1 et SR-B1. Les protéines transporteurs formées seront transférées au niveau des membranes cellulaires où elles pourront accomplir leur fonction et ainsi diminuer la quantité de cholestérol intracellulaire.

Les HDL2 ainsi formés passent dans la circulation et échangent leur cholestérol estérifié par des triglycérides cédés par les VLDL et IDL et ce, à l'aide de protéines de transport des esters de cholestérol (CETP) et de protéines de transfert de phospholipides (PLTP). Les triglycérides des HDL2 ainsi formés sont hydrolysés par la HL convertissant les HDL2 en HDL3 accepteurs de cholestérol intracellulaire. Alternativement, le cholestérol estérifié des HDL2 peut être délivré au foie par l'intermédiaire des récepteurs SR-B1 présents à la surface des hépatocytes aboutissant également à la formation de HDL3. Enfin, les HDL2 peuvent être catabolisés directement par le foie.

La CRP interagit directement avec ce système. Elle est capable de se lier aux LDL et aux VLDL [91] mais semble fixer de manière préférentielle des formes particulières de LDL telles que les LDL oxydées [70] ou modifiées de manière enzymatique [92]. Le complexe ainsi formé peut induire et réguler la cascade du complément. Il est maintenant clairement défini que les LDL modifiées de manière enzymatique (E-LDL) sont capables de déclencher la cascade du complément de deux manières distinctes. La première, CRP dépendante, se produit en présence de faibles concentrations de E-LDL, probablement lors des phases précoces de l'athérosclérose.

La cascade du complément est alors stoppée avant la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9. La seconde, indépendante de la CRP mais en présence de fortes concentrations en E-LDL, se produirait à des stades avancées de la pathologie lors de l'accumulation des E-LDL dans la lésion [93]. Le complexe CRP/LDL peut également induire la fonction phagocytaire des macrophages et ainsi favoriser leur transformation en cellules spumeuses lors de l'évolution de la plaque d'athérome [94].

## II. La CRP, biomarqueur de risque indépendant de survenue de maladies cardiovasculaires

L'identification de la CRP en tant de biomarqueur de l'inflammation, à des concentrations plus faibles que celles mesurées lors de la phase aiguë, a permis d'étendre les études cliniques et de déterminer que cette protéine agissait également en qualité de biomarqueur de l'athérosclérose et de la survenue de complications. [95]. De nombreuses études épidémiologiques prospectives ciblées chez des patients apparemment sains [43, 96], ou présentant un angor stable ou un syndrome coronaire aigu [97, 98], ou un infarctus myocardique ou un syndrome métabolique [99] ont permis de démontrer un lien significatif entre un niveau basal de CRP élevé et le risque d'accident cardiovasculaire (Figure 12). Il a été également démontré que la concentration de CRP était corrélée avec le risque d'accident vasculaire cérébral ischémique [100], la mort subite d'origine cardiaque [101], l'arthériopathie périphérique [102] et la resténose à la suite d'une angioplastie transluminale percutanée [103].

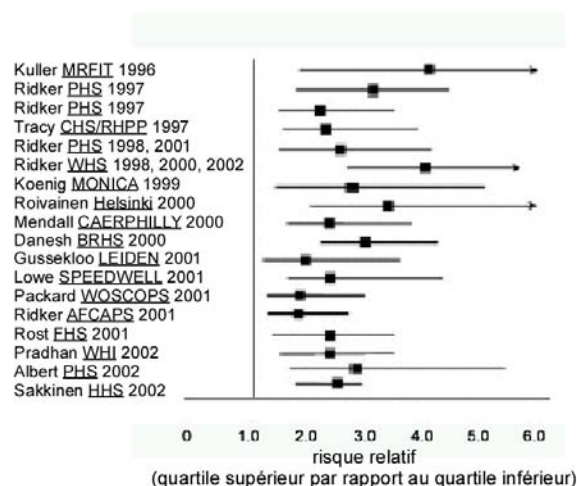
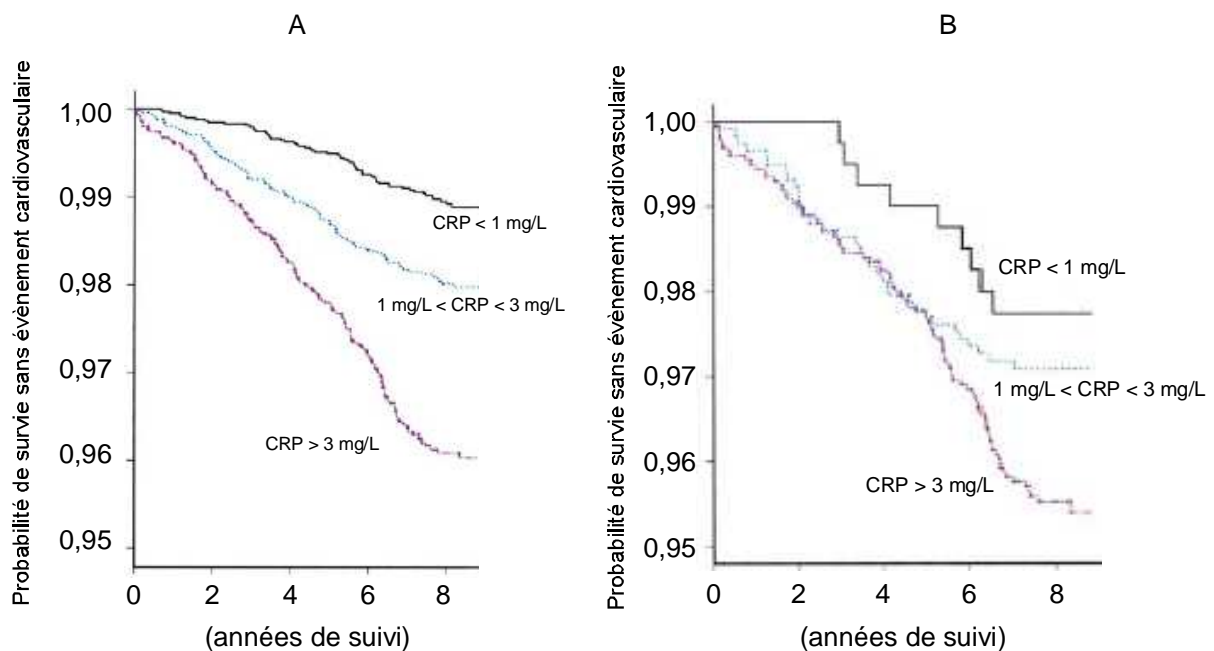


Figure 12 : Études prospectives depuis 1996 liant le niveau de CRP et le risque de survenue d'un premier événement cardiovasculaire respectivement dans le cadre d'accidents vasculaires cérébraux, de maladies coronaires, de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde et de maladies artérielles pulmonaires selon l'étude. D'après Ridker [104, 105] (modifié).

Les techniques initiales de dosage de la CRP par immunoprécipitation avaient un seuil de sensibilité élevé (5mg/L) mais qui restait acceptable pour la mise en évidence de la CRP en tant que marqueur de l'inflammation. L'acceptation de la CRP en tant que biomarqueur indépendant du risque cardiovasculaire et la mise au point du dosage ultra-sensible de la CRP (hsCRP) par des techniques ELISA ou de néphélométrie a permis de descendre le seuil de sensibilité (<0,2 mg/L) de la technique et ainsi définir 3 groupes [41] :

- groupe à faible risque avec des niveaux en CRP < 1mg/L
- groupe à risque modéré avec des niveaux en CRP compris entre 1 et 3 mg/L
- groupe à risque élevé avec des niveaux en CRP supérieur à 3 mg/L. Les niveaux supérieurs à 10 mg/mL ne sont pas utilisés pour définir un risque de développer un accident cardiovasculaire car ces valeurs entrent dans un contexte inflammatoire.

Ces groupes ont été définis à partir de résultats d'études cliniques de mortalité ou de suivi de survenue d'événements cardiovasculaires sur plusieurs années. Il a été démontré qu'une concentration élevée en CRP est corrélée avec une augmentation du risque d'accident cardiovasculaire que les sujets soient sains ou non (Figure 13).

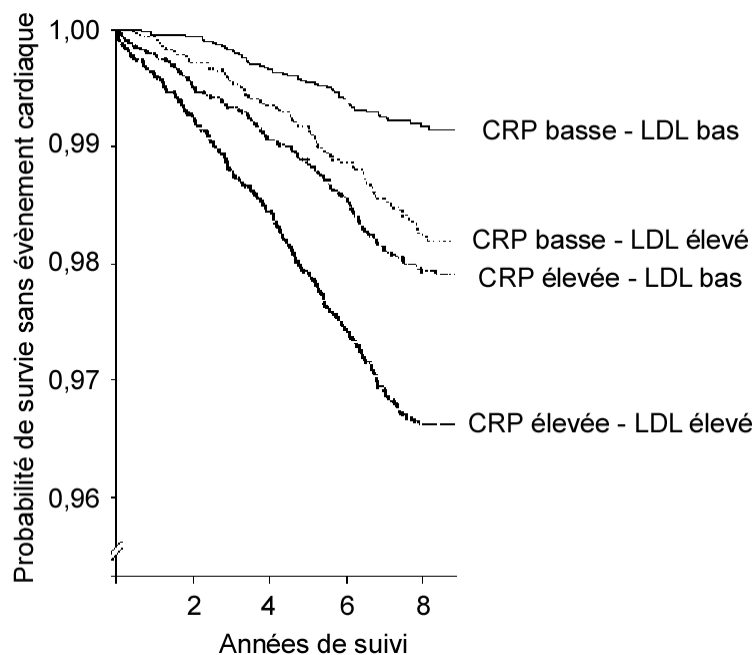


**Figure 13** : Corrélation entre la concentration en CRP plasmatique et le risque d'accident cardiovasculaire chez des sujets apparemment en bonne santé (A) ou présentant un syndrome métabolique (B). D'après Ridker [99] (modifié).

Avant l'utilisation de la CRP comme marqueur prédictif, ce sont les taux de cholestérol plasmatiques (cholestérol total, LDL-cholestérol et HDL-cholestérol) que l'on prenait en compte pour évaluer le risque d'accident cardiovasculaire. Une classification avait été établie afin de lier

les concentrations en cholestérol total, LDL-cholestérol et HDL-cholestérol avec une estimation du risque cardiovasculaire [106]. Cependant, un grand nombre d'événements cardiovasculaires n'étant pas été associés à une hyperlipidémie [41], la CRP a été préférée en tant que marqueur prédictif du risque cardiovasculaire [107] (Figure 14).

La CRP et les LDL ne sont pas les seuls marqueurs connus pour évaluer le risque d'événement cardiovasculaire. D'autres marqueurs de l'inflammation tels que le nombre élevé de leucocytes [108-110], le fibrinogène [111, 112], les immunoglobulines sériques [113, 114], les facteurs C3 et C4 du complément [115], l'amiloïde A sérique (SAA) [43, 116], l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) [117] et son récepteur soluble (SIL-1R) [118], l'IL-2 [114, 119], l'IL-6 [43], l'IL-18 [120], le facteur nécrosant des tumeurs (TNF $\alpha$ ) [118], les formes solubles des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1 [43, 121], la sélectine P et sélectine E [122], la sPLA-2 [123], la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2) [124], la néoptérine [125], la protéine A associée à la grossesse (PAPP-A) [126], le ligand CD40 soluble [127, 128], les métalloprotéinases matricielles 2 (MMP-2) et 9 (MMP-9) [129-131], certains antigènes de surface des leucocytes ainsi que certains biomarqueurs de l'activation leucocytaire dont la myéloperoxydase (MPO) et le facteur tissulaire (TF) [132, 133] ont pu être associés à certaines pathologies cardiovasculaires ciblées, mais ne semblent pas avoir un pouvoir prédictif et une étendue aussi importants que la CRP.



**Figure 14** : Survie sans événement cardiovasculaire évalué en fonction des taux initiaux de CRP et de LDL. D'après Ridker [41] modifié. Quelque soit le niveau de LDL, une CRP élevée suffit à diminuer la probabilité de survie sans événement cardiaque. De plus, une CRP élevée couplée à un niveau élevé de LDL diminue de manière importante cette probabilité.



Par ailleurs, d'autres marqueurs ont été mis en évidence mais leur impact clinique est modeste. Parmi eux, l'homocystéine [134-136], la lipoprotéine a (Lp(a)) [137], l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) [138], la troponine I ou T [139], le peptide natriurétique de type B (BNP) [140], ou encore certains biomarqueurs du stress oxydatif [107].

La mesure simultanée de plusieurs de ces biomarqueurs, en général troponine Ic ou Tc (biomarqueurs de dommages myocardiques), peptides natriurétiques (biomarqueur de stress cardiaque), protéine C-réactive (biomarqueur d'inflammation systémique) et cystatine C (biomarqueur de dysfonction rénale) permettrait d'améliorer la prédiction de la survenue de l'athérosclérose et de ses complications. Dans une étude récente, il a été montré que la prise en compte d'au moins deux de ces biomarqueurs prédisait significativement la survenue du décès chez des hommes d'âge moyen avec ou sans maladie cardiovasculaire au début de l'étude [141].

Ces résultats démontrent l'importance pronostique de l'élévation des biomarqueurs y compris chez des patients indemnes de toute pathologie cardiovasculaire. De plus, comme certains facteurs de risque (âge et sexe) ne sont pas modifiables, les biomarqueurs pourraient être utilisés pour la titration de certains traitements (par exemple les statines) dans le cadre de prévention des maladies cardiovasculaires. Il est pour cela nécessaire de documenter les mécanismes biologiques qui pourraient mettre en évidence une relation causale entre le biomarqueur et la survenue des complications cardiovasculaires, au-delà des relations statistiques entre concentration du biomarqueur et survenue des complications cardiovasculaires.

### **III. La CRP, actrice dans la pathologie cardiovasculaire**

De nombreuses études fondamentales ont permis de corrélérer la présence de CRP avec le processus athéromateux, qui est à l'origine de la plupart des pathologies cardiovasculaires. En effet, la CRP est retrouvée à de fortes concentrations au niveau des plaques d'athérome. De plus, il s'avère de plus en plus évident qu'il existe une relation causale entre la CRP et l'initiation et l'évolution de l'athérosclérose. Sous l'action de divers stimuli, la synthèse de la CRP peut être activée mais la CRP est également capable d'induire la synthèse d'autres ARNm et protéines dans différents types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose.

### III.1 Le processus athéromateux

L'athérosclérose est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une "association de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaires, avec remaniements de la média". L'athérosclérose est un type d'artériosclérose, cette dernière désignant l'épaississement de l'intima artérielle avec amincissement fibreux de la média. A la différence de l'athérosclérose, l'artériosclérose touche aussi les artères de petit calibre et les artérioles.

#### III.1.a Les données anatomo-histologiques

Les artères sont constituées de trois couches entourant la lumière et qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la média et l'adventice (Figure 15).

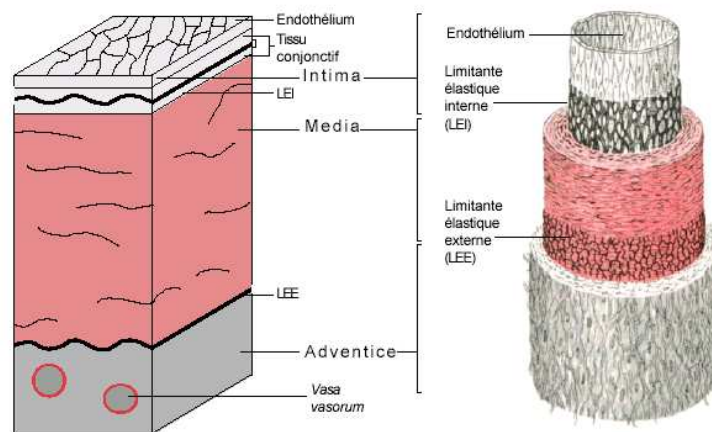


Figure 15 : Structure de la paroi artérielle. D'après <http://www.123bio.net>

L'intima est constituée d'une unique couche de cellules endothéliales imbriquées les unes dans les autres qui est entourée de tissu conjonctif fibro-élastique où se forme la plaque d'athérome et d'une lame de fibre élastique constituée d'élastine appelée limitante élastique interne. La média est la couche la plus épaisse de l'artère et est constituée de cellules musculaires lisses (une couche pour les artérioles et plusieurs pour les grosses artères élastiques) et pour les gros vaisseaux d'une lame d'élastine, la limitante élastique externe. L'adventice ou tunique externe est constituée, quant à elle, de tissu conjonctif riche en collagène et en fibres élastiques contenant des fibroblastes et des adipocytes, de *vasa vasorum* (des vaisseaux dans les vaisseaux)

qui ont un rôle nourricier pour l'adventice et pour la partie externe de la média, d'un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés rejoignant les fibres musculaires de la média et d'une enveloppe qui permet l'ancrage des artères aux structures avoisinantes.

Les différents types cellulaires présents dans cette compartimentation possèdent des fonctions propres. Les cellules endothéliales ont, entre autres, une fonction de transport des lipoprotéines et peuvent agir par l'intermédiaire de médiateurs sur les plaquettes et sur les cellules musculaires lisses. Les cellules musculaires lisses ont avant tout une fonction contractile régulée par les cellules endothéliales mais également un rôle dans la sécrétion de matrice extracellulaire et dans le catabolisme des LDL.

Lors du vieillissement de la paroi artérielle, les fonctions cellulaires se modifient. La barrière endothéliale devient plus perméable aux LDL et aux leucocytes circulants. Les cellules musculaires lisses perdent peu à peu leur fonction contractile vers une fonction sécrétoire conduisant à la synthèse de collagène responsable de la fibrose de la paroi artérielle [142].

En 1994, Stary a proposé une division en 8 étapes de la genèse de la plaque d'athérome [143, 144] (Figure 16)

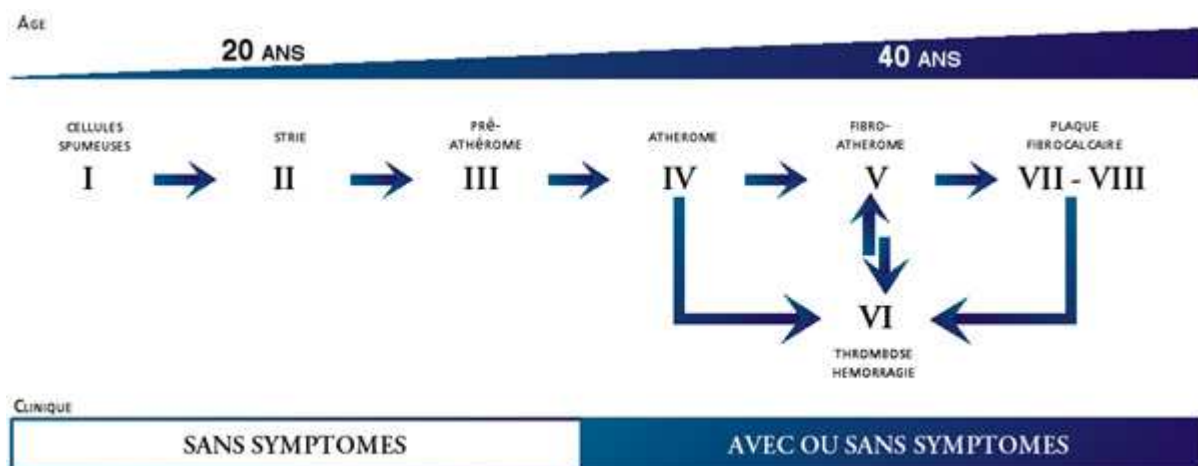
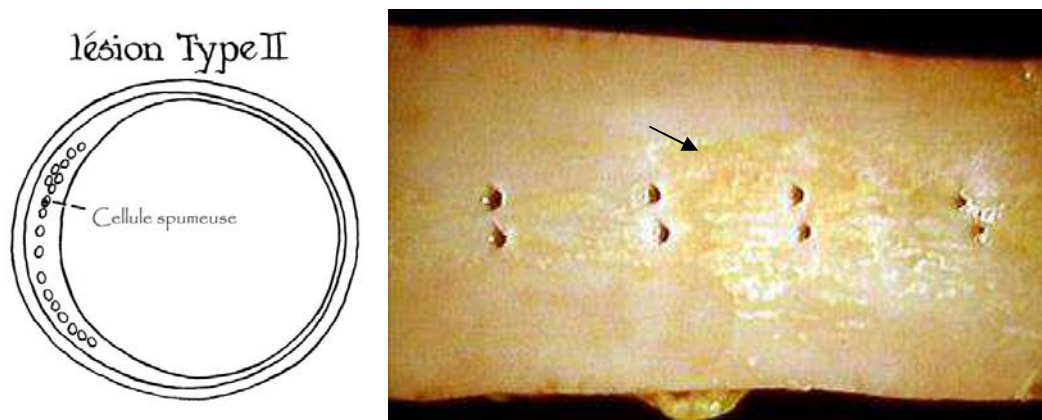


Figure 16 : Modèle de la genèse de la plaque d'athérome. D'après Stary [143, 144]

L'American Heart Association (AHA) a adopté une classification histogénétique reconnaissant 6 types lésionnels successifs [145]. La phase I ou lésion initiale peut être observée dès la petite enfance. Elle peut également exister chez des adultes possédant des artères résistantes aux lésions ou avec une faible athérosclérose. Cette phase n'est pas observable à l'œil nu mais il a été démontré par microscopie et chimiquement l'existence de petits groupes isolés

de cellules spumeuses (macrophages surchargés en esters de cholestérol apportés par les LDL oxydées) et de macrophages dans l'intima.

Le premier signe visible du processus athéromateux est la formation de stries lipidiques pouvant apparaître dès l'enfance (phase II) et se présentant sous la forme de lésions jaunâtres, sans relief ou quasiment sans relief, sous forme de lignes allongées parallèles au flux sanguin (Figure 17). Ces structures sont réversibles mais peuvent également évoluer vers la plaque d'athérome. Elles sont constituées par l'agrégation de cellules spumeuses disposées en couches et non plus en îlots comme en phase I. A ce stade, les cellules spumeuses formées sont issues de macrophages mais également de cellules musculaires lisses. On trouve également un grand nombre de macrophages n'ayant pas incorporé de cholestérol ainsi que des lymphocytes T, moins nombreux que les macrophages, ainsi que quelques cellules mastocytaires.



**Figure 17** : Schématisation de la lésion de type II montrant l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima (à gauche) selon Stary [146] modifié. A droite, aorte présentant des lésions de phase II ou stries lipidiques (flèche). D'après [www-medlib.med.utah.edu/kw/sol/sss/subj1.html](http://www-medlib.med.utah.edu/kw/sol/sss/subj1.html).

Il existe deux sous-classes de lésion de type II : la lésion de type IIa ou lésion "prédisposée" colocalisée avec les cellules spumeuses de phase I et la lésion de type IIb ou lésion "résistante", la plus observée, présente à des niveaux où l'intima est fin avec peu de cellules musculaires lisses et qui ne progresse pas ou très lentement. Les deux sous-classes se différencient, en plus de leur localisation, par la présence dans les lésions de type IIa de cellules musculaires lisses, d'une matrice extracellulaire importante, d'une grande quantité de lipoprotéines, d'une accumulation de macrophages sans cholestérol près de la surface endothéliale ainsi que la présence de gouttelettes et de particules lipidiques extracellulaires.

Chez le jeune adulte, le pré-athérome ou lésion intermédiaire (lésion de type III) fait le pont entre les lésions de type II et l'athérome. On y observe une accumulation de gouttelettes lipidiques extracellulaires en petite quantité sous les cellules spumeuses mais sans formation

d'un véritable centre lipidique (Figure 18). Ces gouttelettes remplacent les fibres et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire et désorganisent la cohérence des cellules musculaires lisses impliquées dans les lésions de type II.

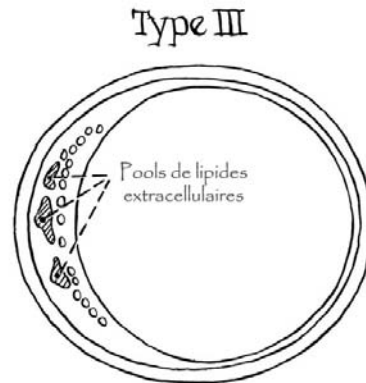
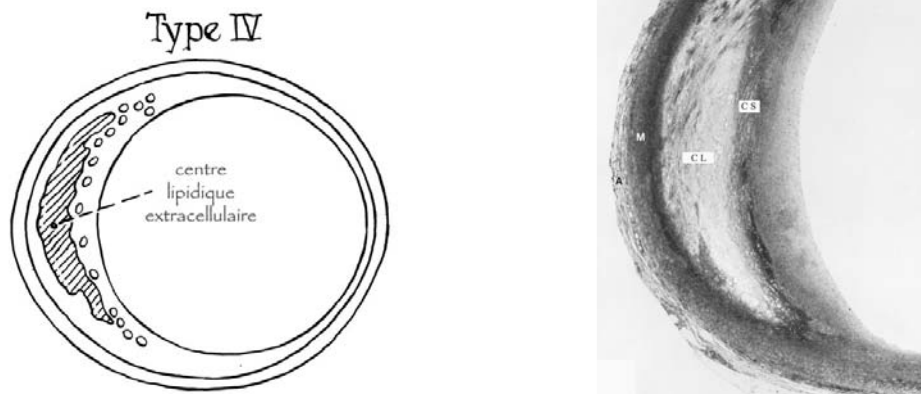


Figure 18 : Schématisation de la lésion de type III selon Stary [147] (modifié).

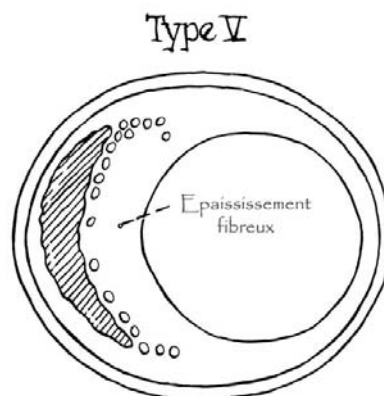
Aucune manifestation clinique n'est associée à ces trois types lésionnels précoces.

La lésion de type IV ou athérome (Figure 19) constitue la première lésion dite avancée car une grande désorganisation dans l'intima est causée par la formation d'un centre lipidique également nommé centre athéromateux. Ce centre lipidique résulte de la confluence des îlots isolés de lipides définis dans les lésions de type III [148]. Le centre lipidique épaissit la paroi artérielle mais ne diminue pas la taille de la lumière vasculaire. Ce sont les limites externes de l'artère qui sont augmentées [149]. Entre le centre lipidique et la surface endothéliale, on note la présence de cellules spumeuses ainsi que quelques lymphocytes [150] et quelques cellules mastocytaires, souvent plus concentrés à la périphérie de la lésion, plus vulnérable à la rupture du fait notamment de la présence abondante de macrophages et de MMP-9 à cet endroit. On y trouve également des protéoglycanes et peu de collagène ce qui peut favoriser la future formation de fissures (lésion de type VI). Des capillaires bordent le centre lipidique à proximité de l'artère.



**Figure 19** : Schématisation de la lésion de type IV selon Stary [147] (modifié) à gauche. A droite, photographie d'une lésion de type IV dans une artère coronaire. A : adventice, M : media, CL : centre lipidique, CS : cellules spumeuses. D'après Stary [147] modifié.

La formation d'un centre lipidique précède la mise en place d'un tissu fibreux ou chape fibreuse composé essentiellement de collagènes fibrillaires de type I et III mais également de glycoprotéines de structure (fibronectine) et de glycosaminoglycanes (chondroïtines sulfates). Ce tissu fibreux se forme entre le centre lipidique et la couche de cellules endothéliales et caractérise une lésion de type V (Figure 20).



**Figure 20** : Schématisation de la lésion de type V selon Stary [147] (modifié)

Les capillaires à proximité du centre lipidique peuvent être plus larges et plus nombreux que dans les lésions de type IV. La classification de l'AHA reconnaît 3 sous-classes de lésions de type V. La lésion de type Va ou fibro-athérome ou plaque d'athérosclérose ou plaque fibrolipidique est caractérisée par la présence de plusieurs centres lipidiques séparés par des couches épaisses de tissu fibreux. Dans certains cas, le centre lipidique ainsi que le tissu fibreux de la lésion sont calcifiés. Il s'agit de lésion de type Vb, équivalente à la lésion de type VII

décrite par Stary [144]. La lésion de type Vc (ou lésion de type VIII selon Stary [144]) ne comprend pas de centre lipidique et contient peu de lipides en général. Elle est caractérisée comme une plaque fibreuse où l'intima normal est remplacé et épaissi par du tissu fibreux. Cette lésion est le résultat d'un ou plusieurs phénomènes tels que l'organisation du thrombus, l'extension d'un fibro-athérome adjacent ou la résorption du centre lipidique.

Dans les lésions de type V, les cellules musculaires lisses présentes au niveau de la media et proches de l'intima sont désorganisées et moins nombreuses. On observe également une accumulation de lymphocytes, de macrophages et de cellules spumeuses dans la media et l'adventice.

Les lésions de type IV et V subissant des complications peuvent devenir des lésions de type VI ou plaque compliquée (Figure 21).

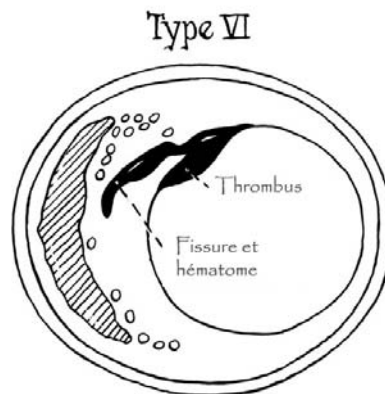


Figure 21 : Schématisation de la lésion de type VI selon Stary [147] (modifié)

Il existe 3 types de lésion de type VI selon la complication qui l'a provoquée. La lésion de type VIa ou ulcération est le résultat d'une perte d'une partie des cellules endothéliales à la surface de la plaque d'athérosclérose conduisant à la rupture de cette plaque. En cas de lésion étendue, on peut observer ce type de lésion de manière macroscopique sous forme d'une dépression ou d'un cratère. Ce type de lésion peut ne concerner que la partie superficielle de la chape fibreuse mais peut aussi provoquer la perte du centre lipidique en profondeur. La rupture peut être également microscopique sous forme de micro-ulcérations et difficile à visualiser en imagerie vasculaire. La formation d'un hématome intraplaque ou d'une hémorragie est une complication qui caractérise une lésion de type VIb. Une collection sanguine est formée à l'intérieur de la plaque par une ulcération ou par rupture, sous diverses contraintes hémodynamiques, de néo-vaisseaux de la plaque. L'hématome se forme dans le centre lipidique, ce qui augmente rapidement le volume de la plaque. La lésion de type VIc ou thrombose représente la complication majeure de l'athérosclérose. Elle se produit sur une plaque qui a perdu

son revêtement endothélial anti-thrombotique lors d'une ulcération et peut être totalement ou partiellement occlusive selon le calibre des artères. Cette lésion peut évoluer par la mise en place d'un tissu conjonctif à la place du thrombus ce qui stabilise ce dernier et diminue le risque d'embolie. Ce remplacement s'effectue après destruction par les macrophages de la fibrine ainsi que des cellules incluses dans le réseau de fibrine. La libération de médiateurs par les macrophages favorise la formation de néo-vaisseaux et la migration des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle vers le site de la thrombose. Plusieurs complications peuvent être observées simultanément (Figure 22).

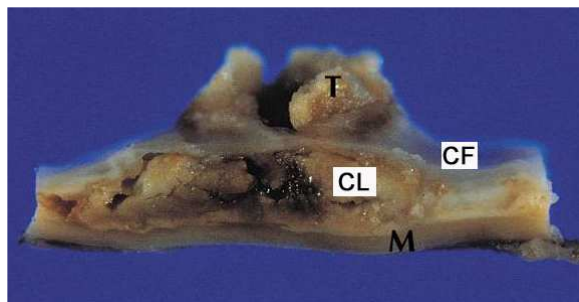


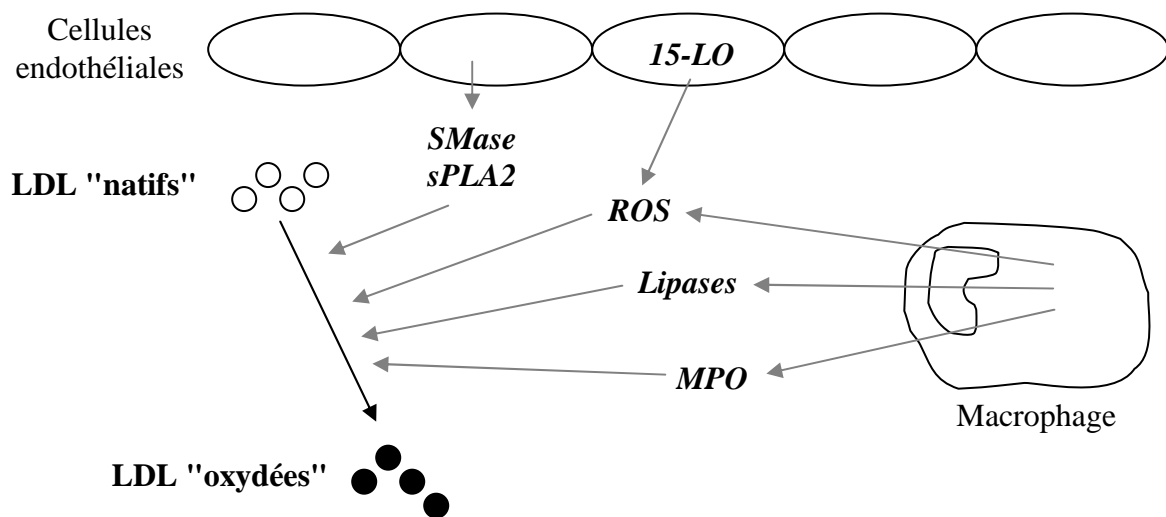
Figure 22 : Lésion aortique athéromateuse compliquée avec rupture de sa chape fibreuse (CF). La photographie montre l'étendue du centre lipidique (CL) avec une zone hémorragique centrale issue de l'entrée de sang à partir de la lumière vasculaire. M : média ; T : thrombus. D'après [www.medscape.com](http://www.medscape.com) (modifié)

### III.1.b Les données moléculaires et cellulaires

L'initiation du phénomène athéromateux se fait bien en amont de la formation de cellules spumeuses. L'ensemble du phénomène est déclenché à partir d'une dysfonction endothéliale qui peut être provoquée par divers facteurs comme le régime alimentaire (génération de particules de LDL cholestérol modifiées ou oxydées ou concentrations élevées d'acides gras polyinsaturés), un stress mécanique, l'hypertension, une infection virale et/ou bactérienne, un taux élevé en homocystéine, une hyperglycémie, l'obésité, certaines toxines (issues du tabac par exemple) ou d'autres agents comme la CRP [151]. Ces facteurs influencent la perméabilité de la barrière endothéliale et provoquent la synthèse de nombreux ARNm et protéines dont celui de la NO synthase endothéliale (NOS3). L'augmentation de la perméabilité permet la diffusion passive des particules de LDL par les jonctions des cellules endothéliales du sang vers l'espace sous-endothélial. L'accumulation de ces LDL se situe à des sites favorables à la formation de la future lésion et implique des interactions entre les lipoprotéines ApoB des LDL et les protéoglycanes de la matrice [152]. Les LDL natifs ne peuvent pas être captés par les macrophages. Elles doivent subir une modification préliminaire dans la paroi artérielle [153] que ce soit par



oxydation, glycation, lipolyse, protéolyse, agrégation ou incorporation dans des complexes immuns [154]. Ces modifications s'effectuent via certaines enzymes dont la NO synthétase 2 (NOS2) [155], les 12/15-lipoxygénases (12-LO et 15-LO) [156], la sphingomyélinase (SMase) [157], la s-PLA2 [158, 159], la MPO [160] ou d'autres lipases (Figure 23).



**Figure 23 :** Les principales enzymes impliquées dans l'oxydation des LDL peuvent être d'origine endothéliale ou macrophagique. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être produites directement par les macrophages ou indirectement via la 15-lipoxygénase (15-LO). La myéloperoxydase (MPO) génère des espèces hautement réactives de l'oxygène responsables de l'oxydation des LDL alors que la sphingomyélinase (SMase) favorise l'agrégation des lipoprotéines oxydées augmentant ainsi la capture par les macrophages. La phospholipase A2 sécrétoire (sPLA2) est capable, quant à elle, d'hydrolyser les phospholipides des LDL, libérant alors un produit lipidique pro-inflammatoire.

Cette oxydation forme des LDL légèrement oxydées possédant une activité pro-inflammatoire. L'accumulation dans un premier temps de LDL légèrement oxydées inhibe la production d'oxyde nitrique (NO) qui est un puissant médiateur anti-athérogène avec un rôle très important dans le phénomène de vasorelaxation. Cette accumulation stimule également la production par les cellules endothéliales de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-6 [161], certaines molécules d'adhésion comme le facteur de von Willebrand, la sélectine P (CD62P) et sélectine E (CD62E), ICAM-1, VCAM-1 [162, 163], PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), des protéines chimioattractantes pour les monocytes et les lymphocytes comme MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) [164] ou des facteurs de croissance tel que le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) [165].

Les monocytes circulants vont fixer les protéines MCP-1 par l'intermédiaire de leur récepteur CCR2 (beta chemokine receptor 2) ce qui va faciliter leur migration au niveau de la barrière endothéliale [166, 167]. Les molécules d'adhésion PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein-1 Ligand) des monocytes vont alors permettre l'adhésion aux sélectines P présentes à la surface des cellules endothéliales activées (Figure 24). Cette fixation de faible affinité et réversible va permettre aux monocytes de "rouler" ("rolling") le long de la barrière endothéliale par fixation successive aux différentes sélectines de surface.

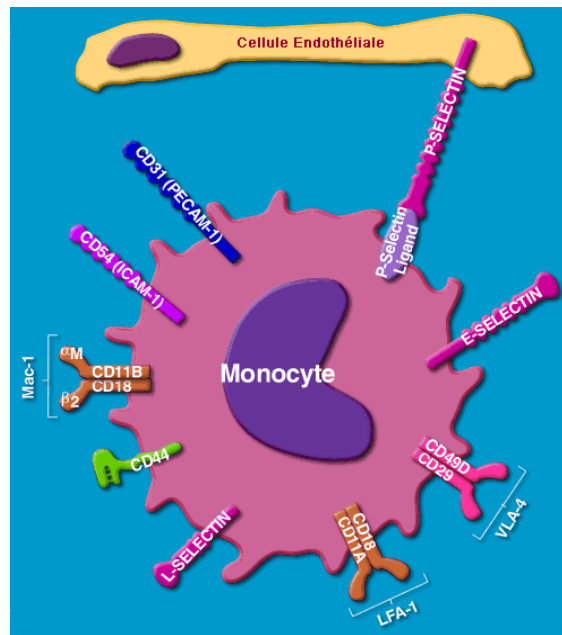


Figure 24 : Les marqueurs de surface des monocytes responsables de l'interaction avec les cellules endothéliales. D'après [http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_monocytePathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_monocytePathway.asp) (modifié)

L'endothéline 1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur jouant un rôle dans l'athérosclérose [168], peut favoriser l'adhésion ainsi que le "rolling" des leucocytes par un mécanisme sélectine P-dépendant [169]. La vitesse de "rolling" diminue lorsque l'intégrine  $\alpha$ -4 présente à la surface du monocyte interagit avec l'intégrine VCAM-1 des cellules endothéliales [170]. Le monocyte stoppe sa migration et adhère avec une forte affinité à la barrière endothéliale lorsqu'il y a interaction entre l'intégrine VLA-4 (Very Late Antigen-4 =  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin) du monocyte et l'intégrine VCAM-1 ou CS-1 (fibronectin containing segment-1) des cellules endothéliales [171, 172] ainsi qu'entre LFA-1 (Lymphocyte Function associated Antigen-1) du monocyte et ICAM-1 des cellules endothéliales [173].

La transmigration ou diapédèse est facilitée par la fixation des monocytes aux molécules d'adhésion PECAM-1 [174], VCAM-1 mais aussi par la présence en grande quantité de MCP-1

dans l'intima [175] (Figure 25). D'autres molécules telles que la lysophosphatidylcholine [176], formée par l'oxydation des LDL, l'interleukine-8 (IL-8) [177], produite par les monocytes, peuvent également participer, par leur fonction chimioattractante, au recrutement et à la transmigration de cellules leucocytaires.

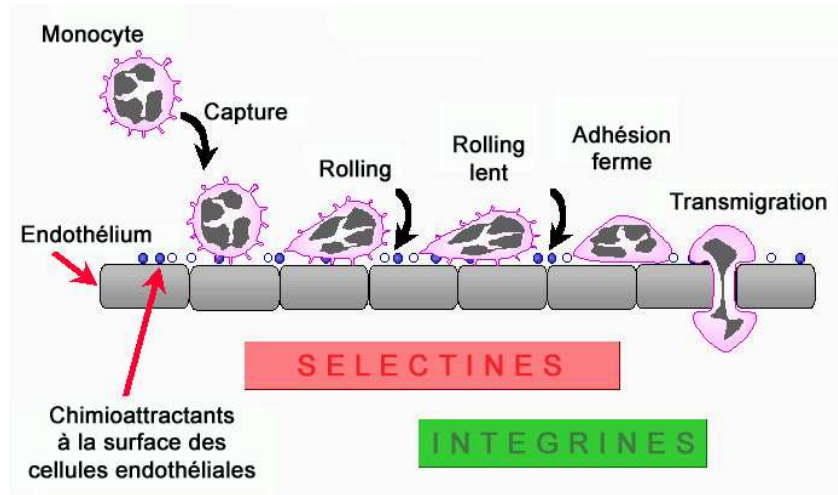


Figure 25 : Recrutement des monocytes circulants après activation de l'endothélium vasculaire. D'après [www.helsinki.fi/ml/biotiet/biokemia/lag/fig9.html](http://www.helsinki.fi/ml/biotiet/biokemia/lag/fig9.html) (modifié). L'expression des sélectines et des intégrines est décalée dans le temps avec une zone de co-expression, ce qui permet de contrôler la capture et la vitesse de "rolling" des monocytes.

Le facteur de croissance M-CSF induit la différenciation des monocytes entrés dans l'intima en macrophages et augmente l'expression, par PPAR- $\gamma$  [178], TNF $\alpha$  ou l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), de récepteurs éboueurs CD36 et SR-A à la surface des macrophages. Cette différenciation peut également être régulée par le lipopolysaccharide (LPS) par l'intermédiaire du récepteur CD14 monocyttaire/macrophagique conjugué au récepteur TLR4 (Toll-Like receptor 4) [160], par la protéine HSP-60 (Heat Shock Protein-60) via le récepteur CD14, par le PAF (Platelet Activating Factor) ou par une régulation autocrine des cytokines libérées par les macrophages.

Les monocytes ne sont pas les seules cellules circulantes à être impliquées dans l'initiation et la propagation de la lésion. L'accumulation de LDL légèrement oxydées sous la barrière endothéliale, mais aussi la présence d'IFN $\gamma$ , permettent le recrutement de lymphocytes T (LT). Comme les monocytes, les LT se fixent aux cellules endothéliales par leur intégrine VLA-4 ou CS-1 [179, 180] (Figure 26) mais peuvent utiliser d'autres molécules pour l'adhésion et la migration qui sont CXCR3 (Chemokine C-X-C motif Receptor 3), IP-10 (Interferon-gamma inducible Protein-10), I-TAC (Interferon-inducible T cell Alpha Chemoattractant) et MIG (Monokine induced by Interferon-Gamma) [155].

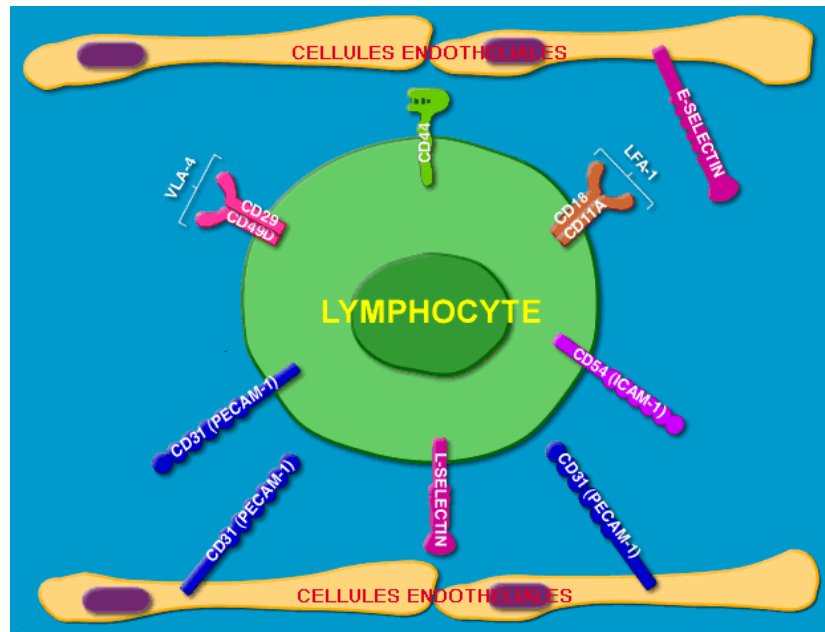


Figure 26 : Les principaux marqueurs de surface des lymphocytes permettant les interactions avec les cellules endothéliales. D'après [http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_lymphocytePathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_lymphocytePathway.asp) (modifié)

Les monocytes et les lymphocytes qui infiltrent la barrière endothéliale entretiennent une réaction inflammatoire au sein de la lésion qui fait intervenir les molécules CD40 et CD40L (ligand du CD40) ainsi que certaines cytokines. Le CD40, récepteur de surface appartenant à la famille des récepteurs du TNF, est exprimé par de nombreux types cellulaires [181, 182]. Son ligand, le CD40L (= CD154), est exprimé majoritairement par les lymphocytes T.

Le contact entre le CD40 des macrophages et le CD40L des lymphocytes T induit une activation de ces derniers puis une orientation vers un phénotype Th1 sous l'action de l'IL-12 (interleukine 12) [183, 184] ou Th2 sous l'action de l'IL-4 (interleukine-4) [185]. Les lymphocytes avec un profil Th1 sécrètent de l'IL-2 de manière transitoire, du TNF $\alpha$  [186], des molécules de CD40 et CD40L et surtout de l'IFN $\gamma$  [187]. Le profil Th2 va plutôt produire de l'IL-4, de l'IL-3 (interleukine 3), de l'IL-5 (interleukine 5), de l'IL-13 (interleukine 13) et de l'IL-10 (interleukine 10). L'IL-4 peut inhiber la formation de Th1 et l'IL-12, la formation de Th2 [185] par un phénomène de rétrocontrôle négatif.

Dans le cadre de la lésion, le profil Th1 est prédominant [188]. L'IFN $\gamma$  produit active les macrophages qui, à leur tour, libèrent des molécules pro-inflammatoires telles que le précurseur de l'IL-1 $\beta$  accompagné de l'enzyme de conversion de l'IL-1 $\beta$  active (= caspase 1) [189], de l'IL-6, du TNF $\alpha$  ou encore de l'IL-12 qui va favoriser le priming Th1 et la synthèse d'IFN $\gamma$  [190]. En parallèle, la diminution d'expression des récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-10 supprime la réponse faite par les Th2.

En plus de la libération de cytokines pro-inflammatoires, on observe l'expression d'un grand nombre de molécules chimioattractantes que sont l'IL-8, MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein alpha), MIP-1 $\beta$  (Macrophage Inflammatory Protein beta), SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1), RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) et MCP-1 [191, 192].

La liaison CD40/CD40L provoque également la synthèse de protéases dont les métalloprotéinases (MMP) [193, 194], capables de dégrader la matrice extracellulaire constituée de glycosaminoglycanes, de protéoglycanes, de collagène, d'élastine, de fibronectine, de laminine, de vitronectine et de thrombospondine. Les MMP-1, MMP-8 et MMP-13, ou collagénases interstitielles, dégradent le collagène de type I [195, 196] alors que la MMP-2 et la MMP-9 (collagénases) digèrent le collagène de type IV et V, la laminine, la fibronectine, l'élastine [197, 198] et, *in vitro*, la gélatine [194]. La MMP-3 intervient également avec un rôle dans la dégradation des protéoglycanes et de l'élastine. Toutes ces MMP sont synthétisées sous une forme inactive et sont sous le contrôle d'inhibiteurs tissulaires que sont TIMP-1, TIMP-2 et  $\alpha$ -2M [199]. La forme active n'est obtenue qu'après clivage par diverses enzymes ou facteurs [200, 201].

L'interaction lymphocyte/macrophage par le CD40 et CD40L favorise la production de molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1 à la surface des macrophages ainsi que l'expression du facteur tissulaire (TF) et la diminution de l'expression de la thrombomoduline, le récepteur anti-coagulant de la thrombine [202, 203].(Figure 27)

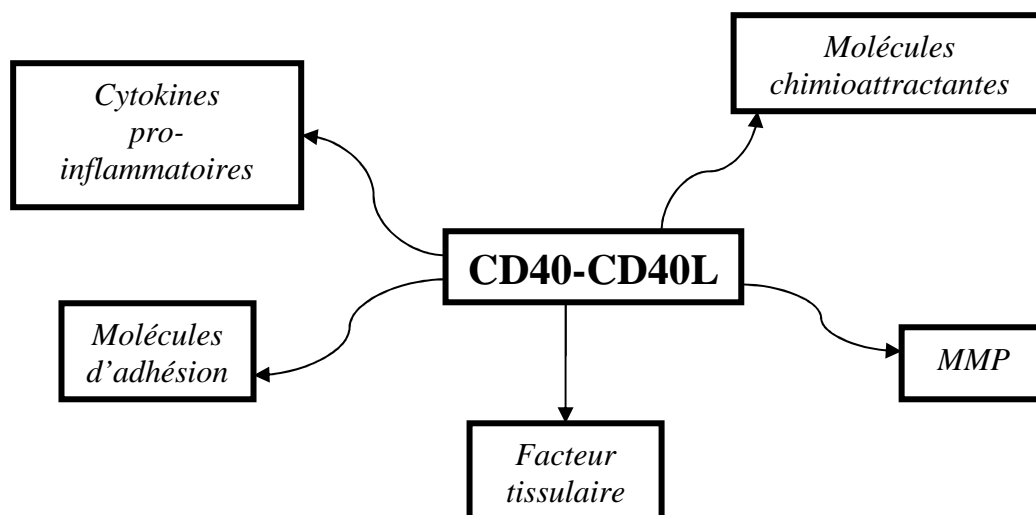


Figure 27 : Facteurs influencés par l'interaction CD40-CD40L entre lymphocytes et macrophages.

Les macrophages activés par la liaison avec les lymphocytes vont capter les LDL oxydées et agrégées par l'intermédiaire de leurs récepteurs éboueurs CD36 et SR-A [204, 205] qui sont les plus importants, mais aussi par CD68 et LOX-1 (Lectin-like OXidized-LDL receptor-1) [206]. L'IFN $\gamma$  libéré induit une diminution des récepteurs ABCA-1 des macrophages et bloque ainsi l'efflux de cholestérol favorisant la formation de cellules spumeuses [207].

Des concentrations élevées en homocystéine [208] et/ou en angiotensine II [209] stimulent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (CML) de l'intima vers la média où elles synthétisent du collagène de type I et III. Cette néo-matrice forme la chape fibreuse qui stabilise la plaque. Les cellules spumeuses issues des macrophages et des CML qui ont migré et qui meurent forment le corps nécrotique de la plaque avec accumulation de cholestérol extracellulaire. La stabilité de la plaque est aussi dépendante de la calcification et de la néo-vascularisation. La calcification est un processus actif où les cellules de type péricytes sécrètent un réseau matriciel qui se calcifie d'une manière similaire à celle des os. Ce phénomène est sous le contrôle de cytokines et des oxystérols [210]. La néo-vascularisation favorise la croissance des petits vaisseaux à partir de la média qui constituent alors un conduit d'entrée pour les cellules inflammatoires.

Le développement du thrombus dépend de la composition et de la vulnérabilité de la plaque. Les plaques vulnérables sont caractérisées par une fine chape fibreuse et par un grand nombre de cellules inflammatoires. L'IFN $\gamma$  produit par les lymphocytes bloque la synthèse de matrice par les CML [211] et dans un même temps, les MMP produites par les macrophages activés dégradent la matrice existante [201]. De plus, l'apoptose des cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes) associée à la formation du thrombus est responsable de l'activation locale du facteur tissulaire qui est libéré lors de la mort cellulaire et accompagné de microparticules apoptotiques [212]. La rupture de la plaque s'effectue souvent en bordure de la lésion, riche en cellules spumeuses [211]. Après la rupture, le collagène sous-endothélial, le corps lipidique et les procoagulants (TF et facteur de von Willebrand) sont exposés au sang où se trouvent les plaquettes et la thrombine. Les plaquettes adhèrent à la paroi du vaisseau via les glycoprotéines plaquettaires et forment le thrombus [172].

### III.1.c Les modèles animaux

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'athérosclérose ont pu être en partie démontrés grâce à différents modèles animaux de rats, de lapins et surtout de souris knock-out (KO) ou transgéniques, n'exprimant plus ou sur-exprimant une protéine impliquée dans la genèse de la plaque. Dans le cadre de l'athérosclérose, les souris Apo E  $-/-$ , lipoprotéine E déficientes, sont largement utilisées. Elles présentent un niveau élevé en cholestérol et développent des lésions athéromateuses importantes.

Différentes enzymes responsables de la dysfonction endothéliale initiale ont été étudiées chez des souris mutantes Apo E  $-/-$  12/15LO  $-/-$  [213] ou chez des souris déficientes pour les récepteurs aux LDL (LDLR  $-/-$ ) sur-exprimant la 15LO [214]. La fonction de la NOS2 (NOS inducible) a pu être également observée à l'aide de souris Apo E  $-/-$  NOS2  $-/-$  [215] et chez des lapins hypercholestérolémiques [216] alors que la sPLA2 a été étudiée à partir de souris transgéniques exprimant la sPLA2 humaine [158, 159].

L'étude de la composante inflammatoire a permis de démontrer que l'IL-6 n'était que peu impliquée dans la genèse de la plaque, et ce, grâce à des souris doubles KO LDLR  $-/-$  IL-6  $-/-$  comparées à des simples mutantes LDLR  $-/-$  [217]. A l'opposé, des souris Apo E  $-/-$  où l'IL-1 $\beta$  est inhibée par fixation sur son récepteur antagoniste IL-1Ra présentent un développement moindre de la plaque d'athérome [218].

Le rôle des sélectines et des intégrines dans la capture, le rolling et la diapédèse des monocytes a été précisé grâce à des souris sélectine P déficientes (P $-/-$ ), à des souris combinant la déficience en sélectine P et en sélectine E [219] mais aussi chez des souris Apo E  $-/-$  [220] et chez des souris double KO Apo E  $-/-$  ICAM-1  $-/-$  ou Apo E  $-/-$  sélectine P  $-/-$  [221].

Les souris KO pour le facteur de von Willebrand (vWf  $-/-$ ) croisées avec des souris LDLR  $-/-$  présentent une diminution de l'ordre de 50% du rolling monocyttaire par rapport aux souris LDLR  $-/-$  seules [222] ce qui implique une fonction de ce facteur dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales.

Les propriétés de MCP-1 et son implication dans le phénomène athéromateux ont été mises en évidence chez des souris KO Apo E  $-/-$  et sur-exprimant MCP-1 [223], déficientes en MCP-1 [224] mais aussi chez des lapins élevés en conditions hypercholestérolémiques [225]. La régulation de la synthèse de MCP-1 a été étudiée chez des souris transgéniques apo (a) et chez des souris LDLR  $-/-$  [226] et l'implication de son récepteur CCR2 dans le recrutement monocyttaire et macrophagique a été démontré chez des souris double mutantes Apo E  $-/-$  CCR2  $-/-$  [166, 227].

L'activation monocytaire par MCSF a pu être étudié chez des souris Apo E  $-/-$  pour lesquelles il manquait également le gène MCSF [228]. Les récepteurs éboueurs (CD36 et SR-A) et leurs inducteurs d'expression ont également été des cibles d'études privilégiées à l'aide de souris Apo E  $-/-$  SR-A  $-/-$  [229], LDLR  $-/-$  SR-A  $-/-$  [230], de souris doubles mutantes ApoE3Leiden SR-A  $-/-$  [231], Apo E  $-/-$  CD36  $-/-$  [232], de souris LDLR  $-/-$  traitées avec des agonistes de PPAR $\gamma$  [233] ou de souris PPAR $\gamma$   $-/-$  [234].

L'utilisation d'anticorps dirigés contre CD154 (CD40L) chez des souris LDLR  $-/-$  [235] ou l'étude des souris Apo E  $-/-$  CD154  $-/-$  [236] ont permis de démontrer l'importance des interactions entre lymphocytes et macrophages dans le développement final de la lésion.

En aval de cette activation cellulaire, l'importance de l'IFN $\gamma$  et en particulier du récepteur IFN $\gamma$ R a pu être prouvée chez les souris double KO Apo E  $-/-$  IFN $\gamma$ R  $-/-$  [237].

Certaines protéines du remodelage de la matrice extracellulaire ont également fait l'objet de plusieurs études avec l'utilisation de souris KO pour MMP-9 [238] ou pour MMP-2 [239] démontrant ainsi une implication de ces protéines dans la dégradation et la réorganisation du collagène ou de manière plus générale dans le taux de survie après accident vasculaire.

L'utilisation de ces modèles animaux représente donc une approche très intéressante pour l'étude fonctionnelle des protéines impliquées tout au long du processus athéromateux.

### **III.2 Implication de la CRP dans la pathologie**

L'analyse des effets biologiques de la CRP dans l'athérosclérose humaine est d'autant plus compliquée qu'il n'existe pas de modèles animaux parfaits. Une limite des modèles de souris génétiquement modifiées réside dans le fait que les protéines associées à la phase aigue de l'inflammation sont différentes chez l'Homme et la souris. Alors que la CRP a été définie comme protéine majeure de l'inflammation chez l'Homme, elle n'a qu'une fonction mineure chez la souris, où la protéine prédominante est la SAP (sérum amyloïde P). Il est donc très difficile de faire un parallèle fonctionnel entre la CRP humaine et les effets observés chez la souris.

Deux modèles animaux de souris transgéniques exprimant le gène de la CRP humaine [240, 241] ou de lapin [242] ont été utilisés pour des tests *in vivo* mais aucune association n'a pu être décrite entre la CRP et le développement d'athérosclérose [243]. La récente utilisation de ces modèles laisse persister des doutes quant à leur qualité et leur fiabilité [241, 242]. La description des fonctions de la CRP proviennent donc, initialement et dans la quasi-totalité, de modèles animaux



expérimentaux *ex vivo* ou *in vitro* et définissent, en plus de son rôle de biomarqueur indépendant du risque cardiovasculaire, une fonction effectrice sur les différents types cellulaires incriminés dans la genèse de la plaque d'athérome.

Depuis juillet 2008, un modèle génétique de souris KO pour la CRP est disponible (<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2008089482&IA=US2008051665&DISPLAY=STATUS>). Cet outil ouvre donc de nouvelles opportunités d'études sur le rôle de la CRP dans le processus de l'athérosclérose.

### III.2.a CRP et cellules endothéliales

La dysfonction endothéliale à l'origine de la genèse de la plaque peut être liée à la CRP [151]. De nombreuses études ont permis de définir des interactions entre la CRP et les cellules endothéliales.

La CRP semble être corrélée avec la vasoréactivité des cellules endothéliales [244] en diminuant la synthèse de la NOS3 [245, 246], en diminuant son activité (conversion de la L-arginine en L-citrulline avec production de NO) et sa bioactivité (sécrétion de NO conduisant à un relâchement des cellules musculaires lisses et à une vasorelaxation) dans les cellules endothéliales aortiques (HAEC) ou veineuses humaines. L'incapacité des cellules endothéliales à produire suffisamment de NO favorise la levée de l'inactivation des caspases et facilite l'apoptose des cellules endothéliales [247]. La CRP diminue également, dans des cellules HAEC et les cellules HCAEC, la libération de la prostaglandine F-1 $\alpha$  (PGF-1 $\alpha$ ), le métabolite de la prostacycline qui est un vasodilatateur potentiel [248]. A l'opposé, la CRP stimule la libération d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> [248] et l'activité de NOS2 en augmentant la quantité de peroxy-nitrite [249] responsable de la nitration de la prostacycline synthétase (PGIS) [250] dont l'activité est alors diminuée.

Il existe également un effet de la CRP sur le chimiotactisme et l'adhésion monocytaire. La CRP induit l'expression de ICAM-1, VCAM-1, de la sélectine E dans des cellules HUVEC (cellules endothéliales humaines de veine ombilicale) et HCAEC, mais aussi de molécules chimioattractantes comme l'IL-8 ou MCP-1 [251, 252]. La CRP favorise également la libération d'ET-1 dans l'endothélium veineux [252] mais diminue la sécrétion du facteur de von Willebrand [253].

Les composantes inflammatoires et athérothrombotiques sont aussi régulées par la CRP. En effet, elle induit la synthèse et l'activité de PAI-1 des HAEC [254] ainsi que la production

d'IL-6 des cellules endothéliales veineuses humaines [255]. L'IL-6 libérée se fixe aux récepteurs de l'IL-6 et les complexes formés fixent la glycoprotéine membranaire endothéliale 130 (gp130) [256], ce qui conserve un environnement pro-inflammatoire. L'expression de CD40 et CD40L à la surface de cellules HUVEC et l'augmentation de l'activité de MMP-2 et MMP-9 sont également induites par la CRP [257].

Enfin, la CRP inhibe la prolifération, la viabilité, favorise l'apoptose des cellules endothéliales [248, 258] et inhibe l'action du complément en favorisant la synthèse de DAF [80].

Cependant, certains effets de la CRP ont été très récemment remis en cause en incriminant la CRP commerciale, utilisée dans la majorité des expériences. La présence d'azide de sodium, en tant que stabilisateur de la protéine, ainsi que de LPS contaminant dans la CRP commerciale seraient responsables des effets décrits ci-dessus.

Il a été démontré que la vasorelaxation, la diminution de la NOS3 et du facteur de van Willebrand et la régulation du facteur DAF observées avec les cellules endothéliales étaient totalement dues à l'azide de sodium [259-262]. Dans un même temps, il a été mis en évidence que l'augmentation de ICAM-1 et la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 des cellules endothéliales étaient le résultat de la contamination de la CRP commerciale par des endotoxines telles que le LPS [261, 263, 264].

### *III.2.b CRP et cellules musculaires lisses*

Des effets de la CRP sur les cellules musculaires ont également été décrits.

Une induction de la synthèse des récepteurs de type 1 à l'angiotensine (AT1R) par des cellules musculaires lisses vasculaires humaines (VSMC) a été reportée [265].

La CRP agit sur la vasoréactivité des VSMC en augmentant NOS2 [266]. Ses effets sur la production de NO initiée par l'IL-1 $\beta$  varient suivant l'origine des cellules musculaires lisses. Elle augmente dans les myocytes [267] alors qu'elle diminue dans les VSMC de rat [268].

L'ARNm de l'IL-6 et de MCP-1 est également augmenté dans les VSMC de rat [266] après exposition à la CRP.

Comme pour les cellules endothéliales, il a été suggéré que les contaminants présents dans certaines préparations de CRP pourraient être responsables des effets attribués à la CRP. Dans le cas de cellules musculaires lisses vasculaires d'aorte humaine (HASMC), la production de NO initiée par l'IL-1 $\beta$  est diminuée aussi bien par la CRP commerciale que par l'azide de

sodium seul [269]. De plus, la relaxation observée dans les cellules musculaires lisses serait également due à l'azide de sodium et non à la CRP [259, 270].

### *III.2.c CRP et leucocytes*

Contrairement aux interactions décrites plus haut entre la CRP et les cellules endothéliales et musculaires lisses, ses effets ne sont que peu caractérisés sur les leucocytes circulants. Malgré tout, différentes études décrivent un effet pro-inflammatoire de la CRP qui induit la synthèse d'IL-1 $\beta$ , de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et du récepteur soluble à l'IL-6 pour les monocytes/macrophages [271, 272] mais également de l'IL-8, de COX-2 (cyclooxygénase-2) ou PTGS (prostaglandine-endoperoxyde synthétase 2) et de PGE2 (prostaglandine E2) pour les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) regroupant donc monocytes et lymphocytes [273]. La CRP agit également sur la libération d'espèces réactives de l'oxygène en induisant la NOS2 dans les macrophages mais aussi en produisant du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elle est présente à de fortes concentrations [274]. La CRP stimule la chimiotaxie et l'adhésion des monocytes en augmentant la synthèse de CCR2 et du marqueur de surface CD11b [275, 276]. Elle a également un rôle dans la différenciation macrophagique en favorisant la capture des LDL oxydées [70] mais aussi dans la déstabilisation de la plaque en stimulant la synthèse et l'activité collagénase de MMP-1 sans modifier l'expression de TIMP-1, son inhibiteur [277]. Le rôle de la CRP sur la synthèse du TF reste peu documenté. Deux études ont démontré que la CRP induisait la sécrétion de TF par les PBMC [278] mais pour les monocytes, ni pour les macrophages seuls. En 2000, Nakagomi et al. démontrent que le TF est synthétisé exclusivement par les monocytes et pas par les lymphocytes mais que la coopération entre les deux types cellulaires est indispensable à cette production [279].

### **III.3 Effets des traitements cardiovasculaires sur les concentrations sériques en hsCRP**

Du fait de son rôle en tant que marqueur du risque cardiovasculaire mais aussi en tant qu'effecteur dans la genèse de la plaque d'athérome, la CRP est une cible thérapeutique privilégiée. Les concentrations de hsCRP ont été proposées pour la titration des doses de certains médicaments. Pour que la hsCRP devienne une cible thérapeutique, il serait nécessaire que son rôle dans l'athérosclérose soit compris. Différentes stratégies et traitements ont été testés afin de réduire les concentrations sériques de CRP.

### *III.3.a Les statines*

Les statines sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), impliquée dans la production du cholestérol et en particulier dans la transformation du HMG-CoA en mévalonate. Les statines induisent une baisse de tous les métabolites en aval du mévalonate, dont le cholestérol et sont utilisées pour traiter les hyperlipidémies. Par un mécanisme inconnu, toutes les statines induisent une diminution des taux de CRP de 15 à 30% [280, 281] mais ne font varier ni PAI-1, ni les taux de fibrinogène [282]. Elles peuvent avoir des effets anti-inflammatoires [279] et baissent les taux de CRP indépendamment de la diminution des lipides [280, 283]. Cette baisse du taux de CRP plasmatique est retrouvée au mois 5 ans après le début de la thérapie par statines [284]. L'action des statines sur les taux de CRP a pu être observée lors de la survenue d'événements coronariens aigus [285, 286] mais également chez des sujets sains avec l'étude PRINCE [280]. L'efficacité des statines sur la diminution du risque de survenue d'un événement cardiovasculaire semble néanmoins plus important lorsque le taux de CRP est élevé [42].

### *III.3.b Les fibrates*

Comme les statines, les fibrates ont été utilisés dans le traitement de l'hyperlipidémie mais agissent également sur les marqueurs systémiques de l'inflammation. En effet, il a été démontré que les fibrates diminuaient les taux de CRP par inhibition de sa synthèse via l'activation de PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha) [287], mais aussi de fibrinogène, de TNF $\alpha$  et d'IL-6 [288]. D'autres activateurs de PPAR $\gamma$  tels que les thiazolidinediones ont un effet similaire sur la diminution du taux de CRP dans les cas de diabète de type II [289, 290].

### *III.3.c L'aspirine et agents anti-plaquettaires*

Connue pour ces propriétés d'activateur et d'anti-agrégant plaquettaire, l'aspirine est également capable de diminuer les taux de CRP [291]. Deux études cliniques ont confirmé cette baisse chez des patients traités avec de l'aspirine [132] avec une action inhibitrice supplémentaire sur les taux d'IL-6 et d'autres cytokines inflammatoires [132]. Malgré tout, les effets anti-inflammatoires de l'aspirine sur la CRP restent controversés [132, 292, 293].

Les résultats obtenus avec d'autres agents anti-plaquettaires restent mitigés. Les antagonistes des glycoprotéines IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) tels que l'abciximab et l'éptifibatide interviennent en fin de voie de signalisation de l'agrégation plaquettaire d'une manière plus efficace que l'aspirine. Cependant, aucune baisse du taux de CRP n'a pu être corrélée [294]. Deux autres agents, le clopidogrel et l'ézetimibe ont, quant à eux, été associés à une diminution de la CRP d'autant plus importante que son taux basal était élevé. Une association du clopidogrel avec l'aspirine optimise l'action sur la CRP [295].

#### *III.3.d Autres inhibiteurs*

Les inhibiteurs des récepteurs à l'angiotensine II ou inhibiteurs des récepteurs AT1, dont le bénéfice a été démontré dans les pathologies cardiovasculaires, diminuent les concentrations sériques de CRP [296-298]. Une étude malgré tout n'associe pas la baisse de la CRP avec l'utilisation de ces inhibiteurs [299].

L'utilisation de  $\beta$ -bloquants dans des phases précoces post-infarctus ou dans le cadre d'ischémies diminue les taux de CRP [300, 301] alors qu'aucun effet n'est observé après intervention coronaire et utilisation de  $\beta$ -bloquants [302].

Enfin, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine diminuent les concentrations de CRP, et ce dans différentes pathologies [292, 303].

#### *III.3.e La perte de poids*

Il a été mis en évidence une corrélation entre un index de masse corporelle élevé et une augmentation du taux de CRP [304]. A la suite de cette observation, l'étude de la perte de poids sur l'incidence des concentrations de CRP a été étudiée chez des femmes obèses en post-ménopause. La perte de poids a été associée à une baisse du taux de CRP deux fois plus importante que celle observée avec l'utilisation de statines [305] et s'effectue probablement par diminution de l'IL-6 produit par le tissu adipeux.

#### *III.3.f Le régime sélectif en acides gras*

Une étude récente sur les habitudes alimentaires chez des individus sains a évalué les effets des acides gras n-3 et n-6 sur l'inflammation systémique. Chez les individus ayant une

consommation exclusive en acides gras n-3, les taux de CRP et de TNF étaient légèrement réduits [306].

***Objectif de l'étude***

La majorité des décès dans le monde se répartissent entre un nombre restreint de causes (cancers, infections, problèmes cardio-vasculaires...). La première et la plus importante d'entre elles dans les pays industrialisés concerne les maladies cardiovasculaires et plus particulièrement l'athérosclérose et ses complications.

La probabilité de survenue des maladies cardiovasculaires prend en compte la composante inflammatoire liée ces pathologies ainsi que les facteurs de risque tels que l'hypertension artérielle, l'excès de cholestérol et de triglycérides, le tabac, le diabète.

L'étude du facteur inflammation a nécessité la définition et la caractérisation de biomarqueurs. La protéine C-réactive, protéine de la phase aiguë de l'inflammation, a été considérée en 2003 par un groupement d'experts comme marqueur prédictif indépendant du risque de survenue de l'athérosclérose et de ses complications.

Même si l'association entre l'augmentation des concentrations en CRP plasmatique et l'athérosclérose est aujourd'hui acceptée, de nombreuses interrogations persistent sur un rôle effecteur possible de la CRP dans la pathologie.

Quelques travaux reportent de nouveaux rôles de la CRP sur la biologie de la paroi artérielle en lui associant des effets pro-athérogènes et pro-inflammatoires. Ces effets ont été démontrés sur des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et sur des monocytes, cellules circulantes contribuant à l'initiation et à la progression des lésions athéromateuses. De même, la CRP est présente en grande quantité dans les parois vasculaires atteintes sans que l'on connaisse précisément son origine.

Pour le moment, il n'a pas été défini de récepteurs spécifiques à la CRP mais nous savons qu'elle est capable de se lier aux différents récepteurs de Fc d'immunoglobulines présents notamment sur les cellules immunitaires.

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer le rôle effecteur de la CRP dans la physiopathologie de l'athérosclérose, nous avons exploré les effets de la CRP sur les monocytes humains en suivant une stratégie génératrice d'hypothèses.

Pour cela, nous avons débuté nos investigations par des expériences de screening de gènes et de protéines. La comparaison des différents profils d'expression nous a permis d'orienter plus finement nos recherches en sélectionnant des molécules communes aux deux expériences et/ou pertinentes à partir d'une des deux approches.



La seconde étape de notre travail a consisté à regrouper toute la partie validation des résultats obtenus et à explorer les mécanismes pouvant expliquer ces variations. Ces études ont été effectuées à partir de monocytes, PBMC (lymphocytes et monocytes) et cellules THP-1 (lignée promonocytaire).

L'ensemble des résultats pourra alors potentiellement permettre de mieux comprendre l'action de la CRP sur les cellules immunitaires et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques afin de lutter contre la formation et la progression de la plaque d'athérome.

## ***Matériels et Méthodes***

# Tests sur les solutions de CRP commerciales

## I. Analyse de la pureté

La pureté des CRP commerciales purifiées à partir de plasma humain (Sigma, St-Louis, USA) et recombinantes (Calbiochem, VWR, Fontenay sous bois, France) ont été vérifiées par électrophorèse sur gel dénaturant d'acrylamide/bis-acrylamide (SDS-PAGE) à 12%-4% (Fiche 1). Un volume correspondant à 4 $\mu$ g de CRP a été déposé. Après une migration de 1H30 à 100V, le gel est lavé 15min dans de l'eau distillée (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) sous agitation puis coloré au bleu de Coomassie 0,5% (BioSafe Coomassie, BioRad, Hercules, USA) (Fiche 2). Le gel est "scanné" (GS-800 Calibrated Densitometer, BioRad) et les bandes sont analysées par mesure densitométrique (GelDoc 1000, BioRad).

## II. Répartition des formes monomériques et pentamériques

Les solutions de CRP purifiée et recombinante ont été déposées sur gel non dénaturant d'acrylamide/bis-acrylamide 12%-4% (PAGE) (Fiche 3) et, après électrophorèse à 100V durant 1H30, les protéines ont été colorées au nitrate d'argent (Fiche 4). Les proportions des formes monomériques non agrégées ont été analysées par mesure densitométrique (GelDoc 1000, BioRad).

## III. Retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP commerciales

L'azide de sodium des solutions de CRP a été retiré pour les expériences en utilisant les colonnes de chromatographie Bio-Spin® Chromatography columns (BioRad) avec une limite d'exclusion de 6kDa (Fiche 5). L'échantillon élué de la colonne est directement utilisé dans le traitement de cellules.

# **Type cellulaire 1 :**

## **Les cellules mononucléaires du sang périphérique**

### **I Origine du matériel**

Des prélèvements sanguins ont été effectués, dans la matinée, sur des volontaires sains, hommes et femmes, entre 25 et 35 ans. Le sang a été récolté dans des tubes traités au citrate de sodium. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par séparation sur gradient de Ficoll et mises en culture dans un milieu RPMI-1640 avec 25mM HEPES et L-Glutamine (Invitrogen Corporation, Baisley, Royaume Uni) supplémenté avec 1% de sérum autologue dans une étuve à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> (Fiche 6).

### **II Evaluation de l'état de stress cellulaire induit par la purification**

#### **II.1 Etude de l'expression de cytokines pro-inflammatoires**

##### *II.1.a Lyse des cellules et extraction des ARN totaux*

Une partie des PBMC obtenues après séparation sur Ficoll a été conservée pour l'étape de lyse alors que l'autre partie a été mise en culture pendant 20H. Les cellules ont été lysées et les ARN totaux extraits par la solution de Trizol® (Invitrogen Corporation) et traités à la DNase I (Fiches 7 et 8). Les ARN totaux ont été dosés à l'aide d'un biophotomètre (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) par comparaison des densités optiques à 260nm et 280nm puis leur pureté a été contrôlée sur gel d'agarose à 0,8% (Fiche 9).

##### *II.1.b Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel*

Les ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase (MBI Fermentas, Euromedex) (Fiche 10). Les expressions des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNFα et IL-6 ont été mesurées par PCR quantitative en

temps réel (Fiche 11) et ont été comparées entre les PBMC après 20H de culture et les PBMC obtenues immédiatement après isolement sur gradient de Ficoll.

La PCR quantitative en temps réel a été effectuée à l'aide de la technologie du Light Cycler® (Roche, Mannheim, Allemagne) en utilisant une détection au SYBR Green I avec le kit QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les séquences d'ADNc des gènes étudiés ont été obtenues à partir de la GenBank et les amorces de PCR ont été définies en utilisant le logiciel PRIMER3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) ou MWG Eclipse Probes Systems (<https://eclipse.epochbio.com>) (Fiche 11).

Les ADNc ont été amplifiés selon un programme standardisé et spécifique de chaque gène étudié. La quantification relative de l'expression du gène cible a été estimée en utilisant un modèle mathématique [307] recommandé par Roche Molecular Biochemicals (note technique n° LC 13/2001). Le ratio d'expression relative a été calculé à partir des efficacités de PCR en temps réel et de la déviation du "crossing point" (point de sortie de la fluorescence en PCR) d'un échantillon inconnu par rapport à un contrôle.

Les efficacités de PCR pour le gène de référence et les gènes cibles ont été calculées à l'aide du logiciel Light Cycler Software (version 3.5) de Roche Molecular Biochemicals. Des dilutions en série des échantillons (de 500ng à 50pg par réaction) ont été préparées pour chaque couple d'amorces afin de déterminer cette efficacité qui est calculée à partir des valeurs de pente selon la formule :

$$E = 10^{(-1/\text{pente})}$$

Avec : E : efficacité PCR du gène

pente : valeur de la pente donnée par le logiciel

L'expression relative d'un gène cible dans un échantillon traité par rapport à un échantillon témoin est donnée par la formule :

$$E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}$$

Avec : Et : efficacité PCR du gène cible (ex : IL-1 $\beta$ , IL-6...).

E<sub>R</sub> : efficacité PCR du gène de référence (RPS29).

CpT(C) : valeur du "crossing point" du gène cible dans l'échantillon contrôle.

CpT(S) : valeur du "crossing point" du gène cible dans l'échantillon traité.

CpR(S) : valeur du "crossing point" du gène de référence dans l'échantillon traité.

CpR(C) : valeur du "crossing point" du gène de référence dans l'échantillon contrôle.

## **II.2 Etude de la viabilité cellulaire**

La mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) a été effectuée avec les surnageants de culture de PBMC à l'aide du kit CytoTox 96® Non-radioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, USA) afin d'apprécier le niveau de mortalité des PBMC après séparation sur gradient de Ficoll. Cette enzyme cytosolique stable est libérée dans le milieu extracellulaire lorsque les cellules sont lysées. Ce test a été effectué en suivant le protocole recommandé par le fournisseur, disponible sur <http://www.promega.com/tbs/tb163/tb163.html>.

## **III Influence de la CRP sur les cytokines, chimiokines et les protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire**

### **III.1 Conditions de culture et traitements :**

Les PBMC obtenues après purification sur un gradient de Ficoll ont été mises en culture dans un milieu RPMI-1640 avec 25mM Hepes et L-Glutamine, supplémenté avec 1% de sérum autologue et ont été mises au repos pendant 20H à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> (Fiche 6).

Un volume de CRP purifiée (Sigma) équivalent à 25 $\mu$ g/mL final a été ajouté directement dans le milieu de culture et les cellules ont été incubées durant 24H sans aucun autre traitement.

Afin de déterminer les voies de signalisation empruntées par la CRP, nous avons prétraité les PBMC soit avec 10 $\mu$ M de U0126, un inhibiteur de MEK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) soit avec 10 $\mu$ M de Ly294002, un inhibiteur de la PI3-Kinase (VWR). Les inhibiteurs ont été ajoutés au milieu de culture cellulaire 30min avant la CRP et l'incubation s'est ensuite effectuée dans les mêmes conditions.

## III.2 Expression des cytokines, chimiokines et des protéines de la matrice extracellulaire

### III.2.a Analyse transcriptionnelle et protéique

Les cellules ont été lysées, les ARN totaux extraits et rétro-transcrits. Les expressions des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, des chimiokines IL-8 et MCP-1 ainsi que des gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, PAI-2 et  $\alpha$ 2-M ont été analysées par PCR quantitative en temps réel (Fiches 7 à 11).

Les surnageants des cultures de PBMC traitées avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée ont été utilisés pour évaluer par test immunométrique sur Immulite®, les concentrations en IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 et confirmer les observations faites au niveau transcriptionnel. Les protéines MMP-9 active, proMMP-9 et TIMP-1 ont été dosées par test ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA pour MMP-9 active et Amersham Pharmacia, Freiburg, Allemagne pour proMMP-9 et TIMP-1) selon le protocole proposé par le fournisseur et l'activité gélatinase de la MMP-9 a été estimée par zymographie (Fiche 12).

### III.2.b Influence de l'azide de sodium

En parallèle des PBMC traitées avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée commerciale, nous avons traité des cellules avec la même CRP préalablement débarrassée de l'azide de sodium par passage sur les colonnes de purification (Fiche 5). Nous avons analysé par PCR quantitative en temps réel l'expression en ARNm de certaines cytokines et chimiokines (Fiche 11). **III.3**

### Analyse des voies de signalisation

L'éventuelle activation de la voie de signalisation MEK-ERK a été suivie avec des PBMC mises en culture avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée pendant 1H, 2H et 4H. Les cellules ont été récupérées, les protéines totales ont été extraites puis dosées (Fiches 13 et 14). Les protéines ERK1/2 phosphorylées ont été détectées par Western-blot (Fiche 15) puis la membrane a été deshybridée (Fiche 16) avant d'effectuer la détection des protéines ERK1/2 totales.

L'activité gélatinase de la MMP-9 a été analysée dans les surnageants des cultures de PBMC prétraitées avec les inhibiteurs de MEK1/2 et de la PI3-Kinase par zymographie (Fiche 12).

## Type cellulaire 2 : Les monocytes *ex vivo*

### I. Obtention des cellules

A partir de prélèvements sanguins dans des tubes citratés sur des volontaires sains, hommes et femmes, entre 25 et 35 ans, les PBMC ont été isolées par séparation sur gradient de Ficoll. Les monocytes ont été purifiés par tri sélectif positif (Fiche 17) à partir des PBMC et leur pureté a été contrôlée par cytométrie en flux en utilisant un double marquage anti-CD3 (afin d'évaluer le taux de lymphocytes contaminants) et anti-CD14 (marqueur spécifique des monocytes) en collaboration avec le service d'Hématologie Biologique du CHU Brabois (Nancy, France). Ils ont ensuite été mis en culture dans un milieu SFM (Invitrogen Corporation) supplémenté avec 1% (v/v) de sérum AB (BioValley, Marne la vallée, France) dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### II. Evaluation de l'état de stress cellulaire

Les monocytes isolés peuvent être dans un état de stress après leur purification. Nous avons donc contrôlé l'état d'activation de ces cellules de la même manière que les PBMC en mesurant l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 juste après isolement et après 20H de culture au repos. Les ARN totaux ont été extraits, rétrotranscrits et analysés en RT-PCR quantitative en temps réel (Fiches 7 à 11).

### III. Influence de la CRP sur l'expression de cytokines et chimiokines

#### III.1 Cinétique d'expression de cytokines et chimiokines sous l'action de la CRP

Les monocytes isolés ont été cultivés, après 20H au repos, en présence de 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée à différents temps d'incubation (2H, 6H, 12H et 24H) afin d'estimer, dans un premier temps, si la CRP induisait également la synthèse de cytokines et chimiokines dans les monocytes *ex vivo* et, dans le cas d'une réponse positive, de déterminer le pic d'expression des



différents gènes afin de permettre leur étude ciblée ultérieurement. Après extraction des ARN totaux et rétrotranscription, les expressions des gènes des cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  et des chimiokines IL-8 et MCP-1 ont été étudiés aux différents temps de la cinétique par RT-PCR quantitative en temps réel (Fiches 7 à 11). Leur expression a ensuite été suivie chez un plus grand nombre de donneurs sur les monocytes traités avec la CRP mais pendant un temps correspondant à celui du pic d'expression des cytokines et chimiokines.

### **III.2 Influence de l'azide de sodium**

Nous avons étudié l'influence de l'azide de sodium contenu dans les solutions de CRP commerciales sur l'expression des cytokines et chimiokines testées avec la CRP. Nous avons comparé, par RT-PCR quantitative en temps réel (Fiche 11), l'expression en ARN de certains gènes dans des monocytes traités pendant 12H en présence de 25 $\mu$ g/mL de CRP commerciale ou de CRP débarrassée de l'azide de sodium après passage sur colonne (Fiche 5).

## **IV. CRP et biologie de certaines enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire dans les monocytes**

L'expression des gènes MMP-9, PAI-2 et  $\alpha$ 2-M a été analysée en RT-PCR quantitative en temps réel (Fiche 11) dans des monocytes traités ou non avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée pendant 12H. Les protéines proMMP-9 et MMP-9 active ont été dosées par test ELISA selon le protocole du fournisseur dans les surnageants de culture de monocytes incubés avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée pendant 12H et 24H. L'activité protéolytique gélatinase de la MMP-9 a également été suivie par zymographie (Fiche 12) dans les mêmes surnageants.

## **V. Approche globale par puces à protéines**

### **V.1 Puces à protéines**

Nous avons testé les surnageants de culture de monocytes incubés durant 24H en présence ou non de 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée sur des puces RayBio™ Human Cytokine Array V (Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France). Ces puces peuvent détecter simultanément 79

protéines (Fiche19) grâce à des anticorps spécifiques immunoabsorbés sur la membrane. La composition de la membrane est décrite ci-dessous :

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-alpha
2	IL309	IL-1alpha	IL-1 beta	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1beta
4	MIP-1beta	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-beta 1	TNF-alpha	TNF-beta	EGF	IGF-1	Angiogenin
5	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC	Ck beta 8-1	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2	NT-3
8	NT-4	Osteoprotegerin	PARC	PIGF	TGF-beta 2	TGF-beta 3	TIMP-1	TIMP-2	Neg	Pos	Pos

Après détection, les signaux sont analysés par mesure densitométrique (GelDoc 1000, BioRad). L'analyse de l'effet de la CRP sur ces différentes protéines est effectuée, après normalisations, par comparaison entre les puces hybridées avec les surnageants de culture de monocytes traités avec la CRP (Puce "CRP") et les puces hybridées avec les surnageants de culture de monocytes non traités (puce "témoin") d'un même individu.

## V.2 Confirmation des résultats observés par les puces à protéines

### V.2.a Dosage du VEGF dans les milieux de culture

Les surnageants de culture de monocytes incubés 24H en présence ou non de 25µg/mL de CRP purifiée ont été utilisés afin de doser le VEGF en test ELISA (R&D systems) selon le protocole recommandé par le fournisseur.

### V.2.b Suivi de l'expression en ARNm du VEGF

A partir des cinétiques de culture de monocytes co-incubés avec 25µg/mL de CRP purifiée durant des temps croissants, nous avons suivi l'évolution de l'expression du VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub> du par RT-PCR. Les ARN totaux des monocytes sont extraits et rétro-transcrits en ADNc (Fiches 7 à 10). L'amplification par PCR (Fiche 19) est effectuée sur le I-Cycler (BioRad). Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose à 2% (Fiche 20) et visualisés sous

lampe UV. Les signaux sont traités par analyse densitométrique à l'aide du GelDoc 1000 (BioRad).

# Type cellulaire 3 : Les cellules THP-1

## I. Origine du matériel

La lignée cellulaire THP-1 provient d'un clone monocyttaire d'un patient atteint de leucémie aiguë. Les cellules nous ont été offertes par le Professeur D. Emilie, directeur du laboratoire INSERM U131 de Clamart. Les cellules conservées en azote liquide sont décongelées, mises en culture (Fiche 22) et dédoublées lorsqu'elles arrivent à confluence.

## II. CRP et cytokines pro-inflammatoires

### II.1 Cinétiques d'expression des cytokines pro-inflammatoires

Nous avons comparé l'évolution de l'expression des cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  au cours du temps sous différents traitements. Les cellules THP-1 ont été incubées, soit avec la CRP purifiée (Sigma) à 2,5 $\mu$ g/mL ou 25 $\mu$ g/mL, soit avec la CRP recombinante (Calbiochem, VWR) à 2,5 $\mu$ g/mL ou 25 $\mu$ g/mL. Après extraction des ARN totaux et rétro-transcription, les ADNc ont été utilisés pour analyser l'expression de l'IL-1 $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  par PCR quantitative en temps réel (Fiches 7 à 11).

### II.2 Influence des contaminants

#### *II.2.a Implication de l'azide de sodium*

Nous avons suivi, par PCR quantitative en temps réel, l'expression de ces trois cytokines à partir des ARN totaux des cellules THP-1 rétro-transcrits. Ces cellules ont préalablement subi différents traitements :

- Co-incubation pendant 3 heures avec la CRP purifiée à 2,5 $\mu$ g/mL.
- Co-incubation pendant 3 heures avec la CRP purifiée à 25 $\mu$ g/mL.
- Co-incubation pendant 3 heures avec 2,5 $\mu$ g/mL de CRP purifiée décontaminée de l'azide de sodium par passage sur colonne (Fiche 5).

- Co-incubation pendant 3 heures avec 25µg/mL de CRP purifiée décontaminée de l'azide de sodium par passage sur colonne (Fiche 5).

- Co-incubation pendant 3 heures avec 0,1% d'azide de sodium correspondant à la concentration présente dans la solution de CRP purifiée commerciale.

### *II.2.b Implication des endotoxines (LPS)*

Les cellules THP-1 ont été cultivées avec 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante en présence ou non 50µg/mL de polymyxine B (Sigma). Les expressions des trois cytokines IL-1α, IL-1β et TNFα ont été mesurées par PCR quantitative en temps réel.

## **III. Effets de la CRP sur la métalloprotéinase MMP-9**

L'activité gélatinase de la MMP-9 a été mise en évidence par zymographie (Fiche 12) à partir des surnageants de culture de cellules traitées ou non avec 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante.

Afin de déterminer les voies de signalisation empruntées par la CRP, nous avons prétraité les cellules avec 10µM de l'inhibiteur de ERK1/2 PD98059 (Calbiochem, VWR), 10µM de l'inhibiteur de la PI3-Kinase Ly294002 (Calbiochem, VWR), avec 20µM de l'inhibiteur spécifique de la p38MAPKinase SB203580 (Calbiochem, VWR) ou avec 20µM de l'inhibiteur non spécifique de la p38MAPKinase SB202190 (Calbiochem, VWR) 30 min avant d'ajouter la CRP. Les surnageants sont récoltés 24H après incubation des cellules avec la CRP. Les surnageants de culture de cellules THP-1 traitées avec 1ng/mL de LPS ont été utilisés comme témoin positif de l'activité de la MMP-9.

En parallèle, nous avons étudié l'activation de la voie NFκB en suivant l'internalisation de la protéine NFκBp65 dans le noyau des cellules THP-1 traitées avec 2,5µg/mL de CRP recombinante pendant 30min, 2H et 4H. Les protéines nucléaires ont été extraites, dosées (Fiches 13 et 14) et NFκBp65 a été détectée en Western-blot (Fiche 15).

#### IV. Effets de la CRP sur la synthèse et la libération du VEGF-A

Nous avons suivi, en RT-PCR (Fiches 10 et 20), la cinétique d'expression de l'ARNm du VEGF-A dans les cellules THP-1 sous l'effet de 2,5µg/mL et 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante. Les variations de l'ARNm ont été rapportées à l'expression de l'actine gamma (gène de référence) puis comparées entre les différents traitements. La libération du VEGF-A a également été étudiée dans les surnageants de culture par dosage ELISA (R&D systems), selon le protocole du fournisseur.

Dans un second temps, nous avons étudié l'implication de deux contaminants présents dans les solutions de CRP commerciales, l'azide de sodium et certaines endotoxines (LPS), sur l'expression en ARNm du VEGF-A dans les cellules THP-1 ainsi que sur la concentration protéique dans les surnageants des cultures. Avant traitement des cellules THP-1, l'azide de sodium a été retiré des solutions commerciales de CRP par passage sur colonne (BioSpin columns, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). La contamination par les endotoxines a été mesurée par Limulus assay (Sigma) et, si nécessaire, une purification supplémentaire par passage sur Detoxi-Gel Endotoxin Removal Columns (Pierce) a été effectuée pour retirer ces endotoxines. Après ces différentes phases de purification, le niveau d'endotoxines de toutes les solutions de CRP était inférieur à 0,08 EU/mL. Afin de s'assurer de l'absence totale d'endotoxines dans les solutions de CRP utilisées, les solutions "purifiées" par passage consécutif sur les deux colonnes ont été ajoutées aux cultures de cellules THP-1 accompagnées ou non d'une solution de polymyxine B à 20µg/mL. Ainsi, les endotoxines résiduelles potentiellement présentes après passage sur colonnes des solutions de CRP seront chélatées et donc inactives.

Les effets des inhibiteurs spécifiques de la voie ERK1/2 (PD98059), de la voie PI3Kinase (Ly294002) et de la voie p38MAPKinase (SB203580 ou SB202190) ont été observés par dosage ELISA du VEGF-A dans les surnageants de culture des cellules THP-1 prétraitées avec ces inhibiteurs pendant une heure puis co-incubées avec 2,5µg/mL de CRP recombinante. Tous ces inhibiteurs ont été utilisés à une concentration de 10µM. L'effet potentiel du solvant des inhibiteurs (DMSO) sur la libération de VEGF-A dans les surnageants des cellules THP-1 a également été testé lors de cette expérience et l'utilisation de cycloheximide à 10µM a permis de suivre la synthèse *de novo* des protéines VEGF-A.

Une étude parallèle a été menée par Western-blot (Fiche 15) afin de mettre en évidence une activation potentielle de la voie MEK-ERK par la détection des protéines ERK1/2 phosphorylées et ERK1/2 totales, de la voie PI3-Kinase par détection des protéines Akt phosphorylées et Akt totales mais également de la voie p38MAPKinase en détectant les protéines p38phosphorylées. Pour cela, les protéines totales des cellules THP-1 ont été extraites (Fiche 13) après 30min, 1H30 et 6H de co-incubation avec 2,5µg/mL de CRP recombinante.

L'étude de l'implication des récepteurs FcγRI et FcγRII a été effectuée à l'aide des cellules THP-1 traitées durant 3 heures avec 400 ng/mL d'anticorps anti-CD64 (clone 10.1, Calbiochem) ou 400ng/mL d'anticorps anti-CD32 (clone IV.3, StemCell Technologies) en présence ou non de 2,5 µg/mL de CRP purifiée. Deux expériences contrôle ont été réalisées à l'aide de contrôles isotypiques (respectivement IgG1 de souris pour l'anti-CD64 et IgG2b de souris pour l'anti-CD32). Après incubation, l'ARN est extrait à l'aide d'une solution de Trizol puis rétro-transcrit. Les expressions du VEGF-A et du gène de référence GAPDH ont été mesurées par PCR quantitative en temps réel.

Une approche protéique a également été mise en place en incubant des cellules THP-1 durant 30 minutes avec l'anticorps anti-CD64 ou anti-CD32 en présence ou non de CRP. Les concentrations en anticorps et CRP sont les mêmes que celles utilisées lors de l'étude ARN. Un anticorps secondaire F(ab')<sub>2</sub> de chèvre conjugué au FITC pouvant réagir contre toutes les sous-classes d'IgG de souris (F0479, Dako) a été ajouté conformément aux recommandations du fournisseur et l'intensité moyenne de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux.

***Résultats***

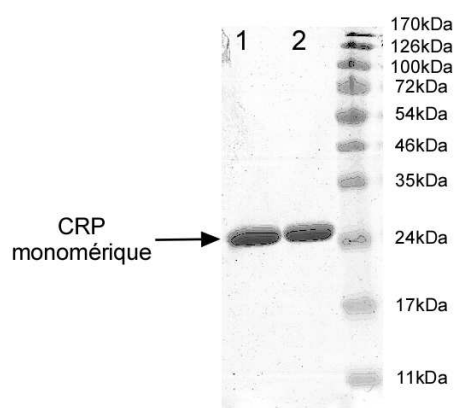


## I.Étude et préparation des solutions commerciales de CRP

Quelques études très récentes sur le rôle de la CRP au contact de différents types cellulaires ont montré que l'azide de sodium utilisé comme conservateur et stabilisateur de la protéine dans les solutions de CRP dites commerciales pouvait être responsable de certains effets attribués auparavant à la CRP. Des substances contaminantes telles que le LPS, potentiellement contenu dans les solutions commerciales de CRP, pourrait également être responsable, dans certains cas, des effets décrits lors de l'exposition de cellules à la CRP [259, 261, 269, 270]. Nous avons donc vérifié, à partir de ce moment et en avant de toute expérience, les solutions de CRP commerciale achetées.

### I.1 Vérification de la qualité des solutions commerciales de CRP

La CRP native est une protéine pentamérique de 115kDa divisée en cinq monomères de 23kDa reliés de manière non covalente. Nous avons donc vérifié sur gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie si le degré de pureté avancé par le fournisseur (proche de 100%) reflétait la réalité (Figure 28).

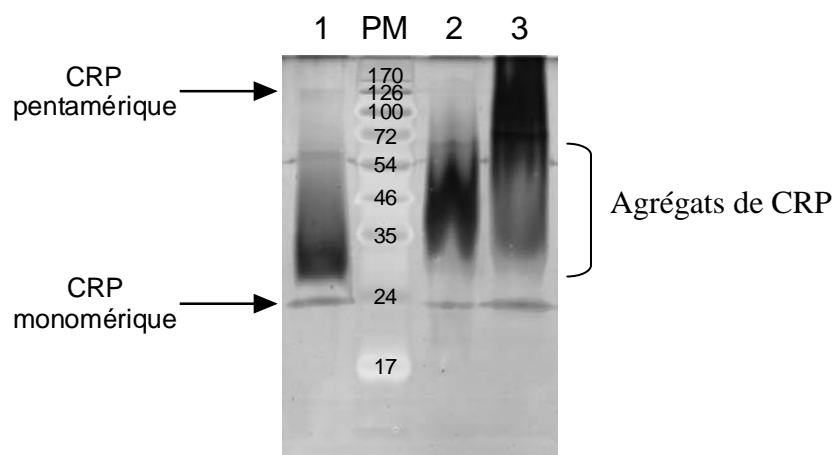


**Figure 28** : Estimation de la qualité des solutions commerciales de CRP purifiée et recombinante. Dépôt de 4 $\mu$ g de CRP purifiée en piste 1 et 4 $\mu$ g de CRP recombinante en piste 2 sur un gel dénaturant (SDS-PAGE) d'acrylamide/bis-acrylamide à 12%-4%. Après migration, les fragments obtenus sont visualisés par coloration au bleu de Coomassie et leur taille est estimée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire précolorés.

En conditions dénaturantes, les seules bandes observées par coloration au bleu de Coomassie correspondent au poids moléculaire du monomère de la CRP. Malgré la faible sensibilité du bleu de Coomassie, nous avons pu démontrer que les solutions de CRP commerciales présentaient un pourcentage de pureté élevé.

## I.2 Estimation des différentes formes présentes dans les préparations commerciale de CRP

La CRP pouvant se présenter sous forme pentamérique ou monomérique *in vivo* et *in vitro*, nous avons estimé les proportions de chaque fraction dans les deux types de CRP à l'aide d'un gel d'acrylamide non dénaturant (PAGE) (Figure 29).



**Figure 29** : Fractions monomérique et pentamérique des CRP commerciales. Deux microgrammes de la solution commerciale de CRP recombinante (CRPrec) ont été déposés en piste 1, quatre microgrammes de la solution de CRP purifiée (CRPp) commerciale en piste 2 et huit microgrammes de la solution de CRP purifiée commerciale en piste 3 sur un gel non dénaturant (PAGE) d'acrylamide/bisacrylamide à 12%-4%. Les fragments obtenus sont visualisés par coloration au nitrate d'argent et leur taille en kDa est estimée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire précolorés (PM).

Les solutions commerciales de CRP contiennent donc la protéine sous plusieurs formes en proportion variable selon le type de CRP (purifiée ou recombinante). La forme monomérique semble prédominante dans la solution de CRP recombinante par rapport à la CRP purifiée. Nous avons par ailleurs observé une possible agrégation de la forme monomérique, proportionnelle à la quantité de CRP déposée et caractérisée par un retard de migration sur le gel.

## I.3 Retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP commerciales

Après retrait de l'azide de sodium des CRP commerciales à l'aide des colonnes Micro Bio-Spin® Chromatography Columns (BioRad), nous avons déposé les éluats sur gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) (résultats non présentés). Par analyse densitométrique des bandes obtenues sur gel, nous avons effectivement estimé, comme l'indiquait le fournisseur, qu'il existait une légère perte de la quantité de protéine déposée au départ après passage sur colonne. Nous avons donc pu ajuster les quantités de CRP à prélever avant

passage sur colonne afin d'obtenir une concentration finale proche de 25µg/mL pour le traitement des cellules.

## **II.Étude des effets de la CRP sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)**

### **II.1 Obtention des PBMC à partir de sang humain et conditions de culture**

#### *II.1.a Isolement des PBMC*

Le sang de volontaires sains est prélevé dans des tubes traités au citrate de sodium et les PBMC sont récupérées par la technique de séparation sur gradient de Ficoll.

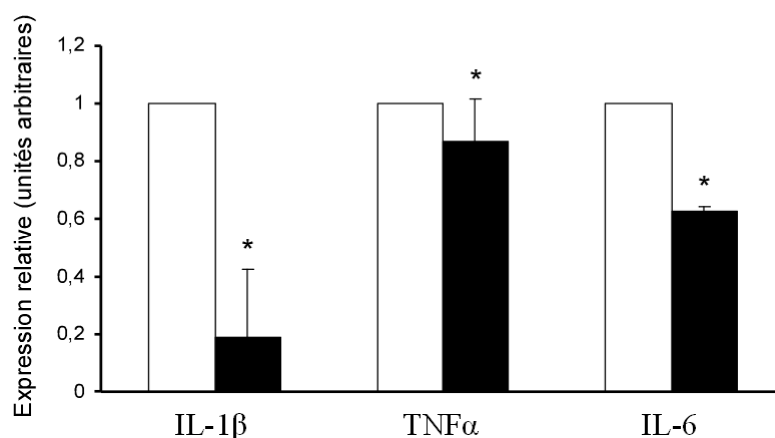
#### *II.1.b Contrôle de l'état de stress cellulaire après purification*

Après 24H de culture en présence de CRP purifiée à 25µg/mL, les PBMC sont lysées et les ARN totaux sont extraits par la technique au Trizol® puis traités à la DNase I afin d'éviter l'amplification de séquences génomiques contaminantes. Deux microgrammes d'ARN total sont rétro-transcrits en ADNc. L'amplification par PCR quantitative en temps réel est effectuée par la technologie du Light Cycler® en utilisant une détection au SYBR Green I. Le gène RPS-29 est alors utilisé comme gène rapporteur.

Les centrifugations et les manipulations des cellules associées à la technique d'isolement sur gradient de Ficoll peuvent être associées à un stress cellulaire pouvant modifier leur phénotype. Afin de contrôler le mieux possible le phénomène, nous avons testé et comparé la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNFα et IL-6 en PCR quantitative en temps réel juste après purification puis après 20 heures de culture dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 1% de sérum autologue (Figure 30).

Au terme de 20H de culture, nous avons noté une diminution de l'expression des gènes des trois cytokines mesurées non liée à un problème de viabilité cellulaire (résultats présentés en II.1.c). Les taux d'expression d'IL-1β, de TNFα et d'IL-6 diminuent respectivement de 81%, 13% et 37% après 20H de culture suggérant un retour des PBMC à un état de repos après purification sur gradient de Ficoll et une adaptation aux conditions de culture. Ces valeurs demeurent inchangées à des temps de culture plus tardifs (données non présentées). Nous avons donc choisi de maintenir les cellules 20H en culture après séparation

sur gradient de Ficoll pour les remettre au repos avant de les soumettre aux différents traitements.



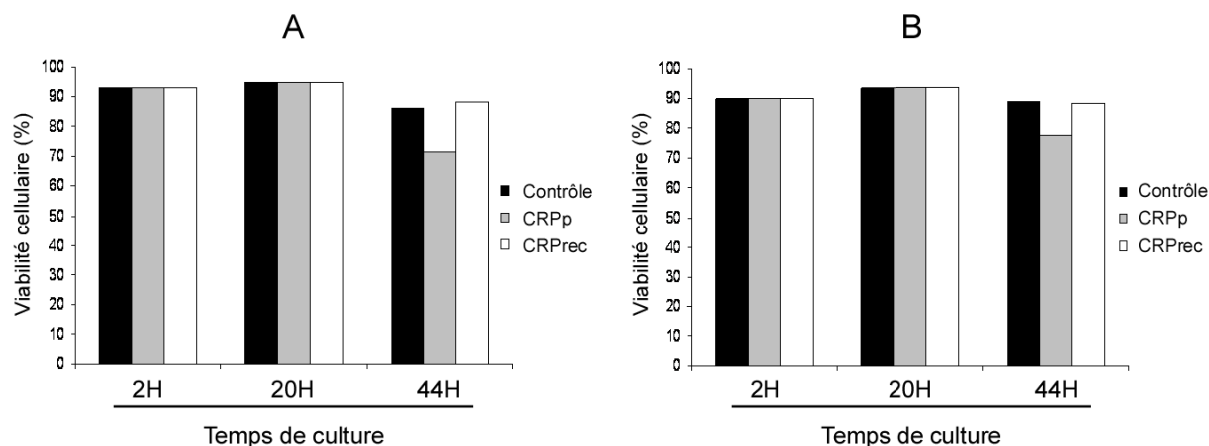
**Figure 30** : Comparaison de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 à partir de PBMC séparées par gradient de Ficoll après 20H de culture. Les résultats de 3 expériences sont exprimés en moyenne de ratio d'expression de l'ARNm de la cytokine après 20H de culture comparé au temps 0, juste après purification (barres blanches). La valeur arbitraire de 1 a été attribuée pour visualiser une expression de l'ARNm sans variation (barres blanches). \*  $p < 0,05$  par rapport à la valeur témoin sans variation d'expression (test de Mann-Whitney).

### II.1.c Test de viabilité cellulaire

En plus de l'estimation de la viabilité cellulaire par exclusion au bleu Trypan, nous avons mesuré la viabilité (CytoTox 96® Non-radioactive cytotoxicity assay) des cellules cultivées traitées avec la CRP purifiée ou recombinante. Immédiatement après ensemencement, les PBMC sont traitées pendant 2H ou 20H avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée (CRPp) ou de CRP recombinante (CRPrec). Le point 44H correspond à 20H de culture sans traitement puis ajout de la CRP pendant 24H. Nous avons également étudié l'influence de la densité cellulaire sur la viabilité en ensemençant les PBMC à 1.10<sup>6</sup> cellules/mL ou à 1,5.10<sup>6</sup> cellules/mL (Figure 31).

Nous observons une légère amélioration de la viabilité cellulaire entre 2H et 20H de culture, que les cellules soient traitées ou non. Les cellules fragilisées naturellement ou lors de la purification meurent très rapidement et l'augmentation de la viabilité cellulaire au bout de 20H nous confirme donc une adaptation des PBMC aux conditions de culture. Après 20 heures de culture sans traitement puis 24H en présence de CRP (condition 44 heures), la viabilité cellulaire diminue mais reste dans une gamme tout à fait acceptable avec au moins 70% de cellules vivantes. Il faut noter que la CRP recombinante semble exercer une

cytotoxicité plus faible sur les PBMC en culture, par rapport à la CRP purifiée mais cette différence n'est pas significative. La densité cellulaire ne joue aucun rôle significatif sur la viabilité cellulaire dans notre expérience.



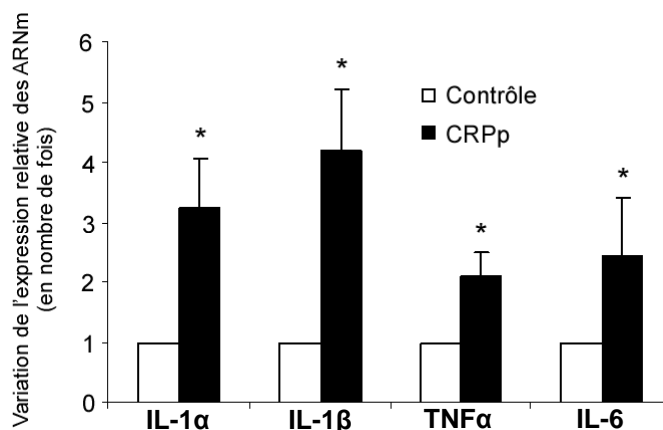
**Figure 31 :** Suivi de la viabilité cellulaire des PBMC au cours du temps de culture. Les PBMC isolées à partir du sang d'un patient sontensemencées à  $1.10^6$  cellules/mL (graphique A) ou à  $1,5.10^6$  cellules/mL (graphique B). Les cellules sont mises en contact avec  $25\mu\text{g/mL}$  de CRP purifiée (CRPp) ou  $25\mu\text{g/mL}$  de CRP recombinante (CRPrec) pendant 2 ou 20 heures. Le point 44H correspond à une culture sans traitement durant 20 heures puis 24H en contact avec  $25\mu\text{g/mL}$  de CRP ou  $25\mu\text{g/mL}$  de CRPrec. La viabilité des cellules sans traitement est représentée par les barres noires.

## II.2 Étude des effets de la CRP sur l'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la pathologie de l'athérosclérose

### II.2.a Approche transcriptionnelle

Nous avons étudié l'influence de la CRP purifiée sur l'expression des gènes de différentes cytokines et chimiokines (Figure 32) sur les PBMC cultivées 20H puis traitées ou non avec  $25\mu\text{g/mL}$  de CRP purifiée pendant 24H.

Nous observons une augmentation significative de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  (3,2 fois), IL-1 $\beta$  (4,2 fois), IL-6 (2,4 fois) et TNF $\alpha$  (2,1 fois) dans les PBMC cultivées 20 heures puis traitées 24 heures avec  $25\mu\text{g/mL}$  de CRP purifiée.

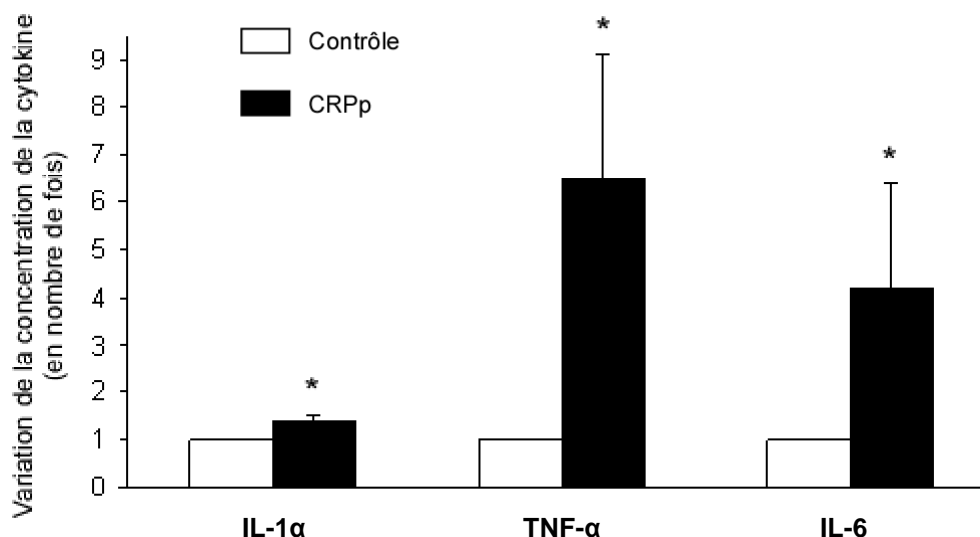


**Figure 32 :** Effets de la CRP purifiée sur l'expression en ARNm de cytokines pro-inflammatoires avec les PBMC. Les PBMC sont cultivées 20 heures puis incubées ou non pendant 24H avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée (CRPp). L'expression de l'ARNm des gènes de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 est quantifiée par PCR quantitative en temps réel par rapport au gène de référence RPS29. Les résultats de 9 expériences distinctes sont exprimés en moyenne de variation de l'expression relative +/- écart-type. \* p<0,05 (test de Mann-Whitney) par rapport aux cellules non traitées (contrôle).

### II.2.b Approche protéique

Les surnageants des cultures des PBMC cultivées pendant 20 heures puis traitées ou non durant 24 heures avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée sont collectés et traités avec un cocktail d'anti-protéases afin d'éviter la dégradation protéique. Les concentrations d'IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 sont mesurées par test immunométrique (Figure 33) sur un automate de type Immulite (DPC Biermann, Allemagne). Les concentrations protéiques obtenues à partir des surnageants de culture de PBMC traitées avec la CRP purifiée ont été normalisées par rapport à celles obtenues dans les surnageants des cultures de PBMC non traitées (contrôle). Cette normalisation s'est avérée nécessaire afin de pallier à une très forte variabilité inter-individuelle entre les différents patients.

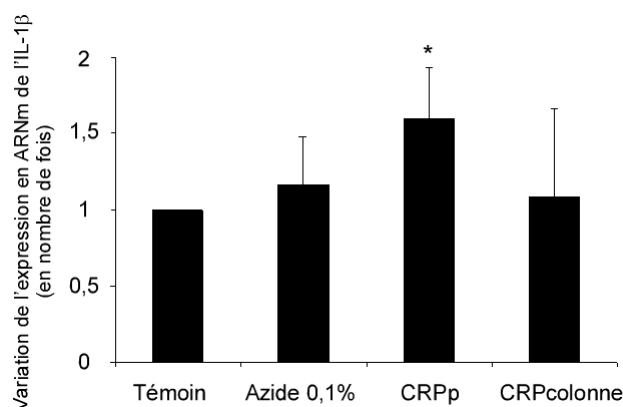
L'augmentation d'expression en ARNm observée pour les trois cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 a pu être confirmée au niveau protéique avec des variations de concentrations de 1,36 fois pour IL-1 $\beta$ , 6,46 fois pour TNF $\alpha$  et 4,19 fois pour IL-6.



**Figure 33** : Effets de la CRPp sur les variations de concentrations protéiques de cytokines pro-inflammatoires dans les surnageants de culture de PBMC cultivées 20 heures puis incubées ou non pendant 24H avec 25 $\mu$ g/mL de CRPp. A partir de trois à quatre expériences distinctes, les concentrations protéiques obtenues en présence de CRPp ont été normalisées par rapport à la concentration protéique mesurée sans CRPp. La valeur contrôle (PBMC sans traitement) a été fixée à 1. \* $p < 0,05$  par rapport au contrôle (test de Mann-Whitney).

### II.2.c Impact de l'azide de sodium sur la quantité d'ARNm de certaines cytokines pro-inflammatoires

Suite à la parution, bien après nos premiers résultats, de différents travaux attribuant à l'azide de sodium les effets initialement associés à la CRP, nous avons testé l'impact de l'azide de sodium contenu dans les solutions commerciales de CRP sur l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  dans les PBMC (figure 43).



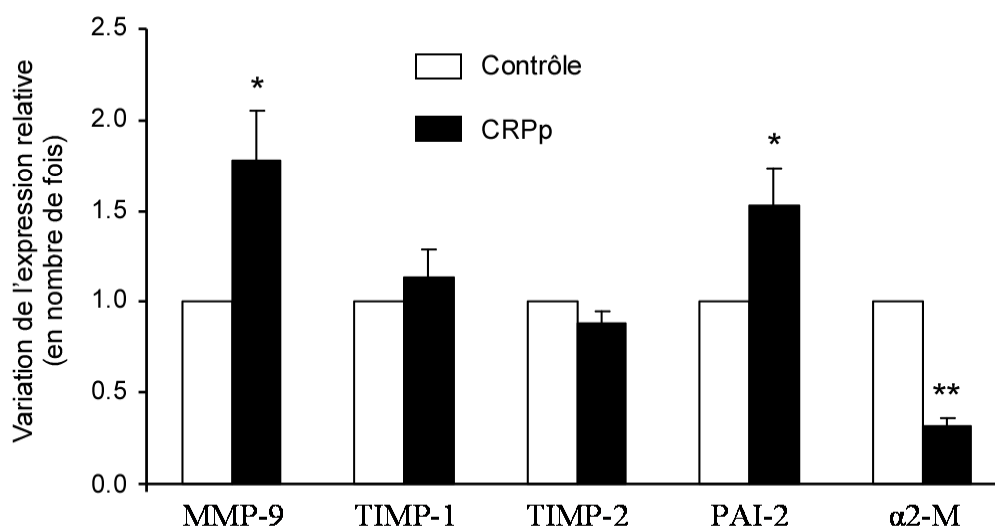
**Figure 34** : Impact de l'azide de sodium sur la variation de l'expression en ARNm de l'IL-1 $\beta$  avec les PBMC. Les PBMC sont cultivés 20H puis traités 24H avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée (CRPp), 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée débarrassée de l'azide de sodium (CRPcolonne) ou avec 0,1% d'azide de sodium durant 24 heures. Les résultats obtenus à partir de 3 échantillons différents par PCR quantitative en temps réel par rapport au gène de référence RPS29 sont exprimés en moyenne de variation de l'expression en ARNm du gène de l'IL-1 $\beta$  +/- écart-type. \*  $p < 0,05$  (test de Mann-Whitney) par rapport au témoin.

Nous observons que l'augmentation de la quantité d'ARNm de l'IL-1 $\beta$  initialement observée avec la CRP purifiée dans les PBMC est en réalité due à l'azide de sodium présent dans la solution commerciale de CRP utilisée dans notre étude. En effet, la CRP purifiée commerciale débarassée de l'azide de sodium n'induit plus d'augmentation de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$ . Il reste à confirmer l'implication de l'azide de sodium dans les variations d'expression en ARNm de l'IL-1 $\alpha$ , du TNF- $\alpha$  ainsi que de l'IL-6.

### II.3 Étude des effets potentiels de la CRP sur la biologie de certaines enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire

#### II.3.a Approche transcriptionnelle

Nous avons mesuré les effets de la CRPp sur l'expression génique d'une enzyme clé du remodelage de la matrice vasculaire, la MMP-9 ainsi que quelques-uns de ces différents inhibiteurs TIMP-1, TIMP-2 et  $\alpha$ 2-M. Nous avons également étudié un marqueur de la fibrinolyse, PAI-2 (Figure 35). Les ADNc sont obtenus de la même manière qu'en II.1.b.



**Figure 35** : Effets de la CRPp sur l'expression en ARNm de MMP-9, de ses inhibiteurs TIMP-1, TIMP-2 et  $\alpha$ 2-M ainsi que de PAI-2 avec les PBMC. Les PBMC sont cultivées pendant 20 heures puis traitées ou non durant 24H avec 25 $\mu$ g/mL de CRPp. L'expression des gènes est quantifiée par PCR quantitative en temps réel et normalisée par rapport à l'expression du gène de référence RPS29. Les résultats proviennent de 9 échantillons différents et sont exprimés en moyenne de variation +/- écart-type. \* p<0,05 par rapport au contrôle (test de Mann-Whitney).

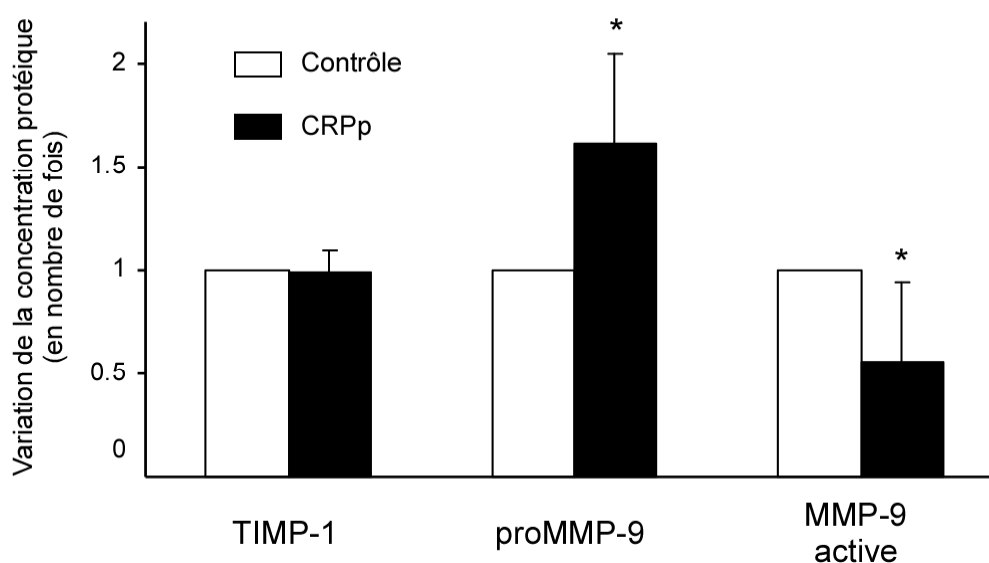


L'expression des ARNm de MMP-9 est significativement augmentée en présence de CRPp (1,8 fois). Nous n'observons aucune variation de l'expression des inhibiteurs TIMP-1 (1,1 fois) et TIMP-2 (1,1 fois) mais une diminution significative de l' $\alpha$ 2-M (0,3 fois), l'inhibiteur plasmatique de la MMP-9. Nous notons également une surexpression de PAI-2 (1,5 fois) en présence de CRPp.

### II.3.b Approche protéique

#### II.3.b.a Dosages par test ELISA

Les concentrations des protéines proMMP-9, MMP-9 active et leur principal inhibiteur tissulaire TIMP-1 ont été dosées par test ELISA dans les surnageants de culture de PBMC cultivées 20H puis traitées ou non durant 24H avec 25 $\mu$ g/mL de CRPp (Figure 36).



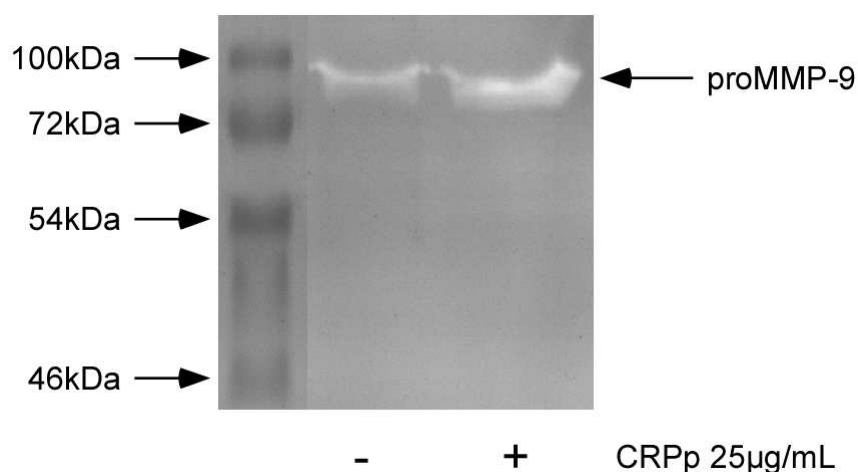
**Figure 36** : Effets de la CRP sur les concentrations protéiques de proMMP-9, MMP-9 active et TIMP-1 dans les surnageants de culture de PBMC. Les PBMC ont été cultivées 20 heures puis incubées ou non avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée pendant 24H. Les concentrations mesurées après incubation avec la CRPp ont été normalisées par rapport aux concentrations obtenues sans traitement. Ces résultats correspondent à la moyenne de trois à neuf échantillons distincts. La valeur contrôle (sans traitement) a été fixée à 1. \*p<0,05 par rapport au contrôle (test de Mann-Whitney).

La CRP purifiée à une concentration de 25 $\mu$ g/mL induit pour les PBMC en culture une augmentation significative de la protéine proMMP-9 dans les surnageants de culture (1,6 fois). *A contrario*, nous observons une diminution de la concentration de sa forme active (0,6 fois). Comme observé au niveau transcriptionnel, aucune variation de TIMP-1 n'est à noter.

### II.3.b.β Mesure de l'activité gélatinase de MMP-9

En plus de la mesure des concentrations protéiques de proMMP-9 et de MMP-9 active par ELISA, nous avons testé l'activité catalytique de cette enzyme par zymographie dans les surnageants des cultures de PBMC cultivées 20H puis traitées ou non durant 24H avec 25µg/mL de CRPp (Figure 37).

En présence de 25 µg/mL de CRP purifiée, nous observons bien une augmentation de l'activité gélatinase de la proMMP-9 dans les surnageants de culture de PBMC. Aucun signal n'apparaît cependant pour la MMP-9 active. Les concentrations protéiques de MMP-9 active observées lors des dosages ELISA étant très faibles, la sensibilité de la technique de zymographie ne permet sans doute pas de visualiser cette forme de MMP-9 sur gel d'acrylamide.



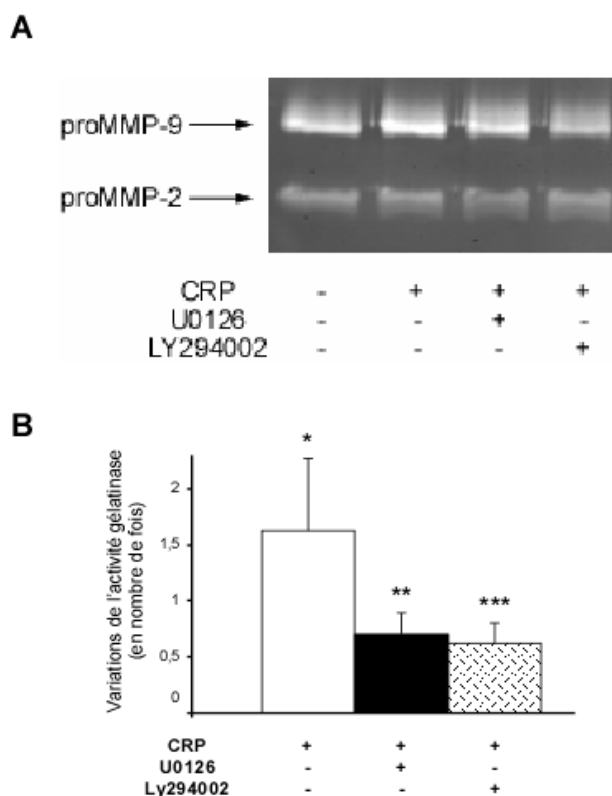
**Figure 37 :** Zymographie représentative de l'augmentation de l'activité catalytique de MMP-9 dans les surnageants de culture de PBMC traitées (+) ou non (-) avec 25µg/mL de CRPp durant 24H. Quel que soit le traitement, un volume identique de surnageant de culture est prélevé, concentré et repris dans le tampon d'échantillon avant dépôt sur gel. Des résultats similaires ont été obtenus dans 12 échantillons différents.

## II.4 Étude des voies de transduction impliquées dans l'augmentation de proMMP-9 induite par la CRP

### II.4.a Inhibiteurs et activité catalytique de la MMP-9

Il existait de nombreuses incertitudes sur la nature des récepteurs de la CRP et très peu d'études avaient tenté de décrire les voies de signalisation utilisées par cette protéine lorsque

nous avons débuté de travail. Nous avons donc tenté de définir par quels mécanismes la CRP induisait la synthèse et la libération de proMMP-9 en suivant l'activité gélatinase en présence de différents inhibiteurs protéiques (Figure 38). Nous avons ainsi pu bloquer, de manière indépendante, la voie MEK grâce à l'inhibiteur U0126 (inhibiteur spécifique de MEK1/2) et la voie PI3-Kinase grâce à l'inhibiteur Ly294002 (inhibiteur spécifique de la protéine PI3-Kinase).



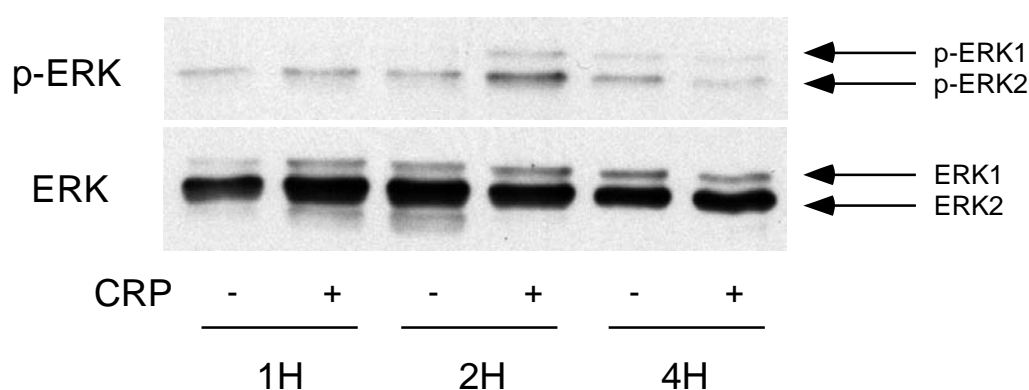
**Figure 38** : En A, zymographie représentative de l'activité gélatinase de la MMP-9 et de la MMP-2 dans les surnageants de culture de PBMC cultivées durant 20H puis traitées ou non pendant 24H avec 25µg/mL de CRPp en présence ou non des inhibiteurs de la voie MEK1/2 (U0126) ou de la voie PI3-Kinase (Ly294002). Pour toutes les conditions, un volume similaire de surnageant de culture est prélevé, concentré puis repris dans le tampon d'échantillon zymographie. L'analyse densitométrique de la digestion enzymatique par MMP-9 est représentée en B. Les résultats représentent la moyenne +/- écart-type de quatre à sept donneurs différents. La valeur contrôle sans traitement est fixée à 1. \*  $p < 0,05$  par rapport au témoin, \*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*  $p < 0,01$  par rapport à CRP seule (test de Mann-Whitney).

Nous observons la même augmentation de l'activité gélatinase en présence de CRP par rapport au témoin. L'effet de la CRP est très fortement diminué en présence de l'inhibiteur de la PI3-Kinase. Nous observons également un effet inhibiteur de U0126 mais moins important que pour Ly294002. Il n'y a aucune variation de l'activité gélatinase MMP-2 dans les surnageants de PBMC quel que soit le traitement, Ly294002 ou U0126.

#### II.4.b Confirmation de l'activation de la voie MEK par la CRP

A la vue des résultats concernant l'inhibition, par U0126, de l'activité gélatinase de la MMP-9 induite par la CRP, nous avons voulu confirmer l'implication de la voie MEK par la CRP. Après extraction des protéines totales, nous avons détecté, par western-blot, une phosphorylation dès la deuxième heure après contact entre les PBMC et la CRP (Figure 39).

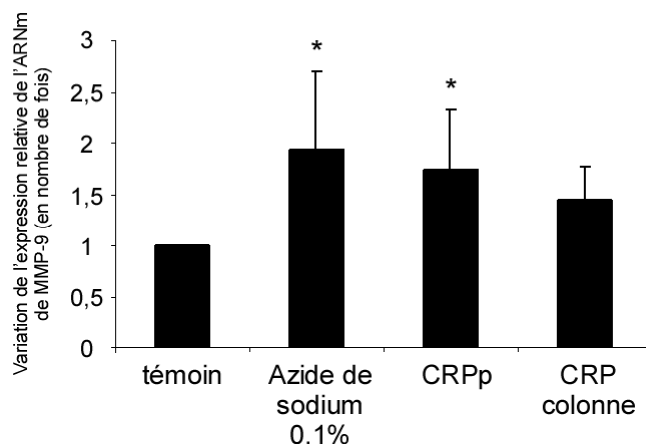
Les quantités de protéines ERK totales (ERK) étant les mêmes, nous pouvons donc comparer les niveaux de phosphorylation.



**Figure 39** : Western-blot représentatif de la phosphorylation des protéines ERK1/2 induite par 25µg/mL de CRPp sur des PBMC. Après purification et mise en culture durant 20H, les PBMC sont traitées (+) ou non (-) avec 25µg/mL de CRP purifiée pendant 1H, 2H et 4H. Les protéines phosphorylées ERK (p-ERK1 et p-ERK2) ainsi que les protéines ERK totales (ERK1 et ERK2) sont détectées par western-blot.

#### II.5 Effets des contaminants potentiellement présents dans les solutions de CRP

Tous les résultats sur les PBMC présentés ci-dessus ont été obtenus avant la mise en évidence par différentes équipes de l'action de l'azide de sodium et des endotoxines contenus dans les solutions commerciales de CRP. C'est donc à posteriori que nous avons dû effectuer les contrôles nécessaires. L'expression en ARNm de MMP-9 a été suivie après traitement des PBMC avec une solution d'azide à 0,1%, concentration correspondante à celle utilisée dans la solution de CRP purifiée commerciale. Une seconde expérience de contrôle a consisté au traitement des PBMC avec une solution de CRP débarrassée de l'azide de sodium après passage sur colonne (Figure 40).



**Figure 40** : Effet de l'azide de sodium sur l'expression en ARNm de MMP-9 dans les PBMC. Les cellules ont été cultivées durant 20H puis ont été traitées ou non durant 24H avec 25µg/mL de CRP purifiée (CRPp), avec 25µg/mL de CRP purifiée débarrassée de l'azide de sodium (CRP colonne) ou avec une solution d'azide de sodium à 0,1%. L'expression de l'ARNm de MMP-9 est mesurée par PCR quantitative en temps réel et normalisée par rapport à l'expression du gène de référence RPS29. Les résultats de trois expériences distinctes sont présentés sous forme de moyenne de variation d'expression en ARNm +/- écart-type. \*  $p < 0,05$  par rapport au témoin dont la valeur est fixée à 1.

Ces résultats démontrent que l'azide de sodium à 0,1% provoque dans les PBMC une augmentation de la quantité d'ARNm de MMP-9 identique à celle observée avec la solution commerciale de CRP purifiée. L'augmentation, même si elle persiste, n'est plus significative lorsque l'azide de sodium a été retiré de la solution de CRP. Dans notre cas, ce n'est donc pas la CRP qui augmente l'ARNm de MMP-9 ou la stabilise mais l'azide de sodium contenu dans les préparations de CRP purifiée commerciales.

## II.6 Résumé des effets de la CRP sur les PBMC

Nous avons pu démontrer dans un premier temps que l'exposition des PBMC à la CRPp s'accompagnait de la modification de l'expression (en ARNm et protéines) de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6) mais aussi de protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (PAI-2, proMMP-9, MMP-9 active,  $\alpha$ 2-M). Les expériences de contrôle effectuées a posteriori ont révélé que les variations en MMP-9 n'étaient pas dues à la CRP mais à l'azide de sodium présent en faible quantité dans les solutions de CRP commerciales utilisées. Des tests complémentaires doivent donc à présent être prévus afin de vérifier l'implication de l'azide de sodium sur l'expression des facteurs pro-inflammatoires ainsi que sur PAI-2 et  $\alpha$ 2-M, et les voies de transduction du signal.

### **III. Étude des effets de la CRP sur les monocytes humains**

A la suite de l'étude sur les PBMC, nous avons voulu étudier l'impact de la CRP sur un seul type cellulaire, en l'occurrence les monocytes, impliqués dans l'initiation de la physiopathologie de l'athérosclérose.

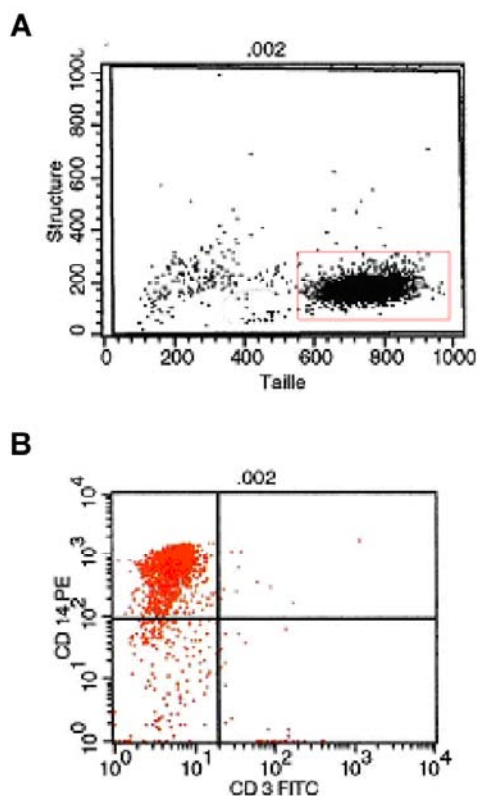
#### **III.1 Obtention des monocytes à partir de sang humain**

##### *III.1.a Purification des monocytes*

Le sang est prélevé dans des tubes traités au citrate de sodium puis les PBMC sont isolées par gradient de Ficoll. Les monocytes sont sélectionnés à partir des PBMC par tri sélectif magnétique positif à l'aide d'anticorps anti-CD14 (Fiche technique 17).

##### *III.1.b Contrôle de la pureté des monocytes*

Après purification, un aliquot des monocytes est analysé par cytométrie en flux (FACS) en utilisant un double marquage anti-CD3 humain-FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et anti-CD14 humain-PE (phycoérythrine). Les monocytes sont caractérisés par un phénotype CD14<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> et les éventuels lymphocytes contaminants par un phénotype CD14<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup> (Figure 41). La pureté des monocytes après tri cellulaire est au moins supérieure à 90% à chaque fois.

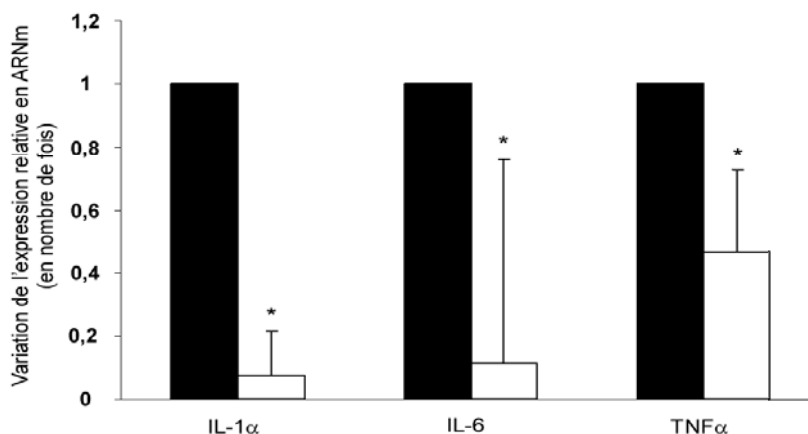


**Figure 41** : Analyse de la pureté des monocytes par cytométrie en flux. En A : la distribution des cellules selon leur taille (en abscisses) et leur structure (en ordonnée) permet d'identifier d'éventuelles sous-populations dans l'échantillon. L'encadré rouge représente la population monocyttaire sans les débris. En B : Mesure de la pureté des monocytes par le double marquage CD3/CD14. Le graphique représente la distribution cellulaire selon l'intensité de fluorescence émise par la phycoérythrine (PE) en fonction de l'intensité de fluorescence émise par le FITC.

### *III.1.c Suivi du stress cellulaire engendré par la purification*

Au même titre que les PBMC, les monocytes peuvent subir une phase de "stress" durant la purification. Nous avons mesuré l'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-6 et TNF $\alpha$  par PCR quantitative en temps réel juste après purification et après 20 heures de culture (Figure 42).

Si le niveau d'expression des ARNm mesuré juste après purification est estimé à 1, le niveau d'expression des ARNm après 20H de culture diminue de 92% pour l'IL-1 $\alpha$ , 88% pour l'IL-6 et 53% pour le TNF $\alpha$ . Ces variations sont indépendantes de celle de la viabilité cellulaire.



**Figure 42** : Impact de la purification sur l'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  et IL-6 par les monocytes isolés par tri sélectif magnétique positif après 20H de culture. Les résultats obtenus à partir de 3 échantillons distincts sont exprimés en variation de l'expression en ARNm du gène de la cytokine au bout de 20H de culture comparée à l'expression juste après purification (barres blanches). La valeur arbitraire de 1 a été attribuée pour visualiser l'expression en ARNm du gène juste après purification (barres noires). \* p<0,05 par rapport à la valeur témoin juste après purification.

Après 20H de culture, l'expression en ARNm des trois cytokines testées revient donc à un niveau faible et stable, effaçant ainsi l'augmentation de synthèse ou la stabilisation des ARNm observée suite à l'étape de purification cellulaire par tri magnétique.

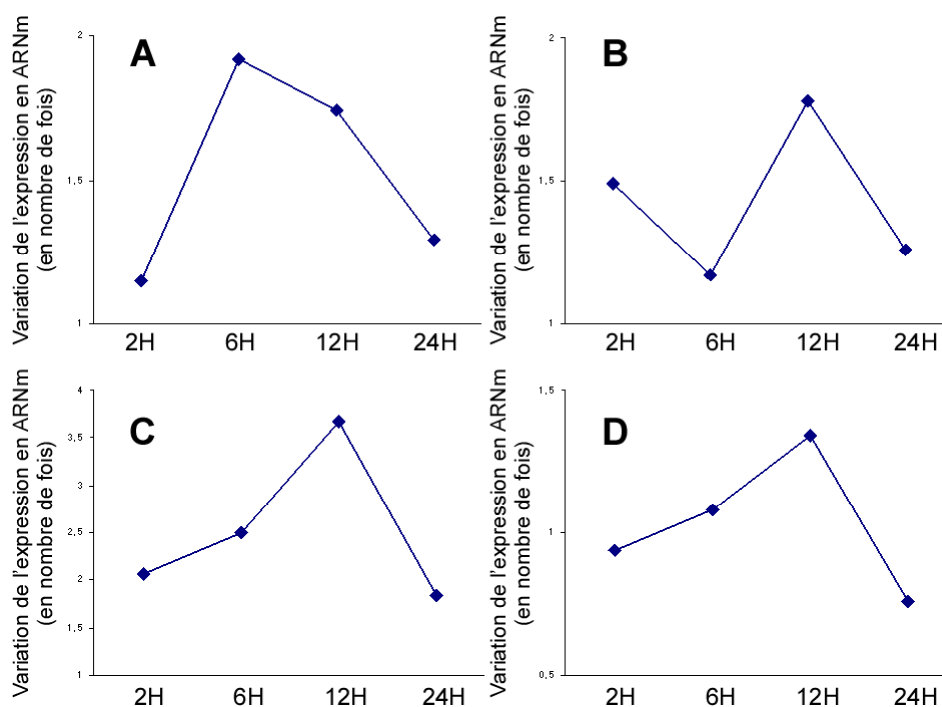
### **III.2 Effets de la CRP sur l'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes**

#### *III.2.a Profils temporels d'expression de cytokines pro-inflammatoires par la CRP avec les monocytes*

De nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont exprimées de manière cyclique lorsque leur synthèse est activée par un agent externe. C'est pourquoi il nous a semblé nécessaire de suivre la cinétique de réponse de certaines d'entre elles en réponse à la CRP sur des monocytes humains (Figure 43).

La majorité des cytokines pro-inflammatoires étudiées ont un pic d'expression en ARNm après 12H d'exposition à la CRP. Afin de visualiser les variations d'un maximum de cytokines pro-inflammatoires, nous avons donc choisi ce temps de culture pour nos futures expériences.



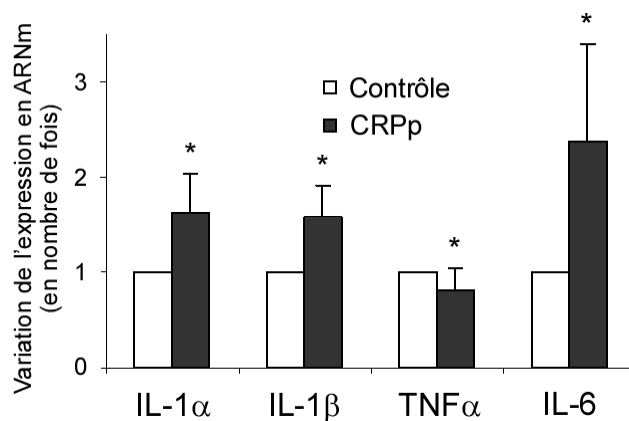


**Figure 43** : Variation en fonction du temps de l'expression en ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes purifiés à partir d'un échantillon sanguin, cultivés 20H puis traités avec 25µg/mL de CRP purifiée pendant 2H, 6H, 12H ou 24H. Les expressions de l'ARNm de l'IL-1 $\alpha$  (graphique A), de l'IL-1 $\beta$  (graphique B), de l'IL-6 (graphique C) et du TNF $\alpha$  (graphique D) sont quantifiées aux différents temps de culture (en abscisses) par PCR quantitative en temps réel par rapport au gène de référence RPS29.

### III.2.b Expression des cytokines pro-inflammatoires

La CRP induit dans les monocytes, après 12H de culture, une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  (1,6 fois), IL-1 $\beta$  (1,6 fois) et IL-6 (2,4 fois). Seule l'expression du TNF $\alpha$  est diminuée après 12H de culture (Figure 44). Nous pensons que le pic d'expression du TNF $\alpha$  a pu ne pas être correctement estimé lors de la cinétique d'expression.

Nous démontrons que les monocytes isolés répondent à la CRP en modulant la synthèse de certaines cytokines pro-inflammatoires. Aucune expérience concernant une potentielle implication de l'azide de sodium n'a été effectuée pour le moment.

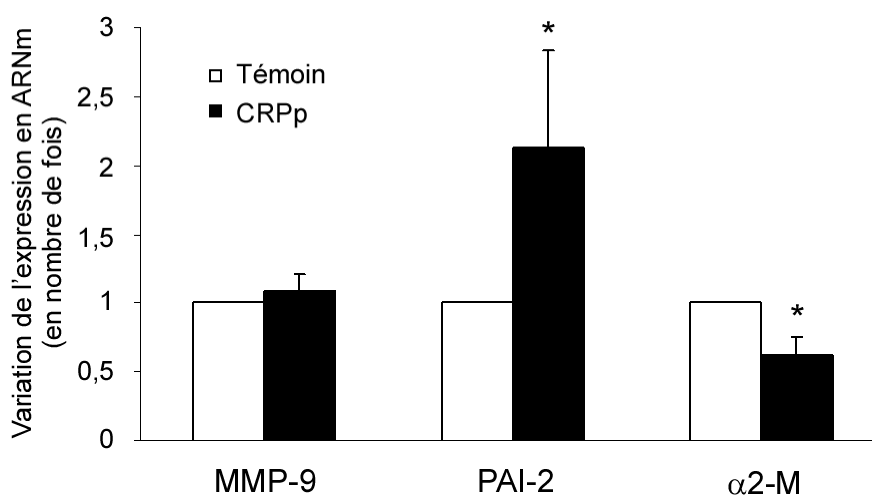


**Figure 44 :** Variation de l'expression en ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes cultivés 20H puis traités (CRPp) ou non (Contrôle) avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée durant 12 heures. Les résultats obtenus à partir de 11 à 16 échantillons différents par PCR quantitative en temps réel par rapport au gène de référence RPS29 sont exprimés en moyenne de variation de l'expression en ARNm du gène +/- écart-type. \*  $p < 0,05$  (test de Mann-Whitney) par rapport au témoin sans CRP.

### III.3 Effets de la CRP sur le remodelage de la paroi artérielle

#### III.3.a Approche transcriptionnelle

Afin de vérifier si la CRP a également un effet activateur sur la synthèse de molécules impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans les monocytes, nous avons suivi, en RT-PCR quantitative en temps réel, l'expression en ARNm de MMP-9,  $\alpha$ 2-M et PAI-2 sous l'influence de la CRP (Figure 45).



**Figure 45 :** Effets de la CRP purifiée (CRPp) sur l'expression en ARNm de MMP-9, PAI-2 et  $\alpha$ 2-M dans les monocytes isolés, mis au repos durant 20 heures et traités pendant 12 heures avec 25 $\mu$ g/mL de CRPp. Les résultats obtenus par PCR quantitative en temps réel à partir de 16 à 20 échantillons différents ont été normalisés par rapport au gène de référence RPS29 et sont exprimés en moyenne de variation par rapport aux monocytes non traités avec la CRPp. \*  $p < 0,05$  (test de Mann-Whitney) par rapport au contrôle (sans traitement à la CRP).

Nous observons une augmentation significative de l'expression en ARNm de PAI-2 et une diminution significative de l'expression en ARNm de l' $\alpha$ 2-M, comme nous l'avons noté dans les PBMC. Nous n'observons cependant aucune variation de la synthèse d'ARNm de MMP-9 dans les monocytes isolés en présence de CRP à ce temps de mesure.

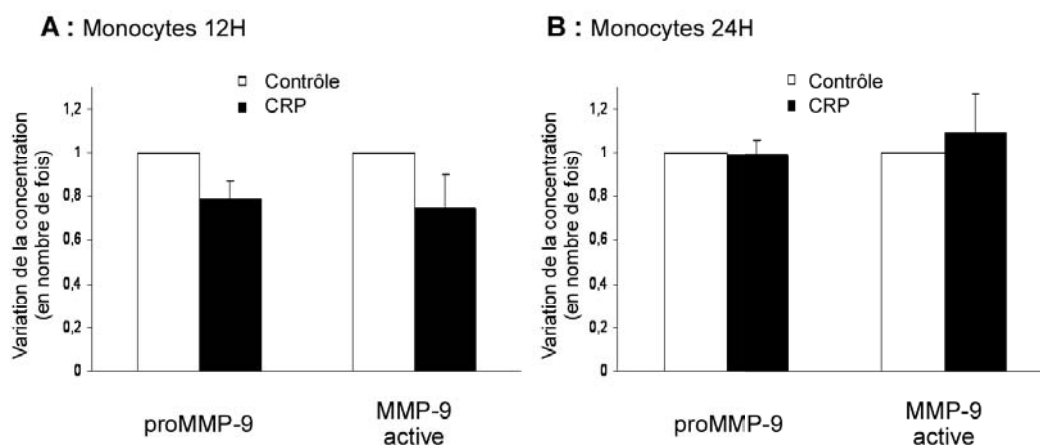
### III.3.b Approche protéique

Nous avons voulu confirmer si l'absence de régulation de l'expression en ARNm de MMP-9 dans les monocytes traités 12H avec la CRP purifiée était conservée au niveau de la protéine.

#### III.3.b.a Dosage de la MMP-9 par test ELISA

Par dosage ELISA, nous avons déterminé les variations de concentration en proMMP-9 et en MMP-9 active dans les surnageants de culture de monocytes incubés 12H ou 24H avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée (Figure 46).

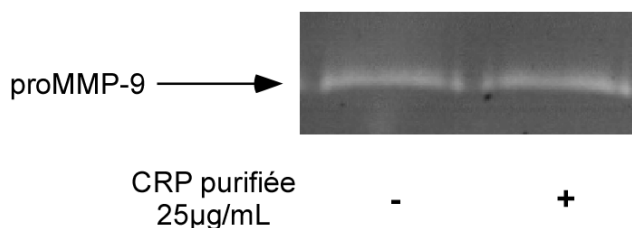
Nous observons une légère diminution de la proMMP-9 et de la MMP-9 active dans les surnageants de monocytes incubés 12H avec la CRP (Figure 46A) mais ces variations ne sont pas significatives. A 24H (Figure 46B), cette tendance n'est plus du tout observée.



**Figure 46** : Effets de la CRP sur l'expression de proMMP-9 et MMP-9 active dans les surnageants de culture de monocytes isolés. Les monocytes ont été cultivés 12H (graphique A) ou 24H (graphique B) en présence de 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée et les dosages ont été effectués par test ELISA sur les surnageants des cultures cellulaires. Les variations observées à partir de 3 à 6 échantillons distincts sont exprimées en moyenne +/- écart-type.

### III.3.b.β Mesure de l'activité gélatinase de la MMP-9

Aucune variation n'ayant été démontrée dans les monocytes sur le niveau d'expression de MMP-9 en ARNm et en protéines, nous avons voulu confirmer cette observation en suivant l'influence de la CRP sur l'activité catalytique de la MMP-9 dans les surnageants de culture de monocytes isolés (Figure 47).



**Figure 47** : Zymogramme représentatif de l'activité gélatinase de la MMP-9 dans des surnageants de culture de monocytes traités (+) ou non (-) avec 25µg/mL de CRP purifiée pendant 12H. Les mêmes résultats sont obtenus après 12H (pour 8 échantillons) ou 24H (pour 3 échantillons) de culture en présence ou non de CRP.

Nous confirmons, par zymographie, que la CRP n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de la MMP-9, ce qui nous permet de conclure que la CRP n'exerce aucune action sur les monocytes isolés en ce qui concerne la régulation de la MMP-9.

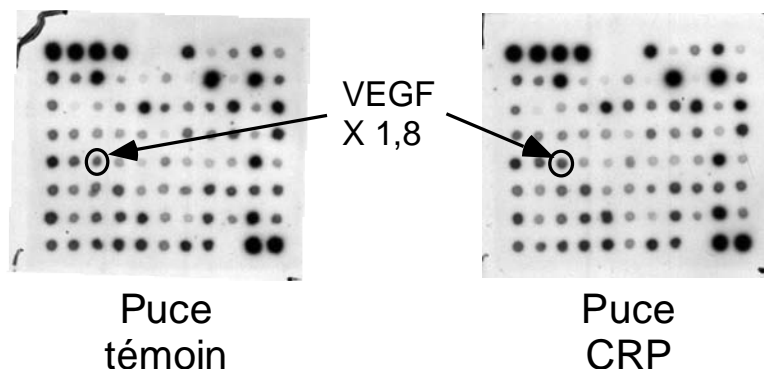
### III.4 Approche globale de la régulation protéique par la CRP dans les monocytes

L'absence de régulation de la MMP-9 observée avec les monocytes isolés nous a conduit à élargir notre champ d'étude protéique afin de déterminer si la CRP pouvait réguler l'expression d'autres protéines.

#### III.4.a Utilisation de puces à protéines

Nous avons testé dans les surnageants de culture de monocytes traités ou non avec 25µg/mL de CRP purifiée pendant 24H, l'expression de 79 protéines différentes pouvant intervenir dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Cette étude globale a pu être réalisée à l'aide de puces à protéines RayBio™ Human Cytokine Array V (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Après hybridation, détection et normalisation, nous avons pu mettre en évidence dans un premier temps, entre autres, une surexpression du VEGF (1,8 fois) par la CRP purifiée dans les surnageants de culture de monocytes (Figure 48). D'autres protéines

telles que MCSF, MCP-2, SDF-1 et PBGF-BB semblent être en quantité plus abondante en présence de CRP purifiée. Par contre, quelques protéines, dont GRO $\alpha$  et MIG, voient leurs expressions diminuer en présence de CRP purifiée.



**Figure 48** : Résultat représentatif de deux puces détectant 79 protéines différentes dans les surnageants de culture de monocytes isolés, mis au repos pendant 20 heures puis traités durant 24 heures avec 25 $\mu$ g/mL de CRPp. Les monocytes d'un même individu sont traités ou non avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée. Les surnageants des cultures sont récupérés, traités avec un cocktail d'anti-protéases et déposés chacun sur une puce. Après révélation, l'intensité des signaux est comparée entre la puce témoin et la puce CRP d'un même donneur. L'analyse densitométrique à partir de 3 donneurs différents a révélé une quantité protéique de VEGF en moyenne 1,8 fois plus importante dans les surnageants de monocytes traités avec la CRP par rapport aux surnageants témoins.

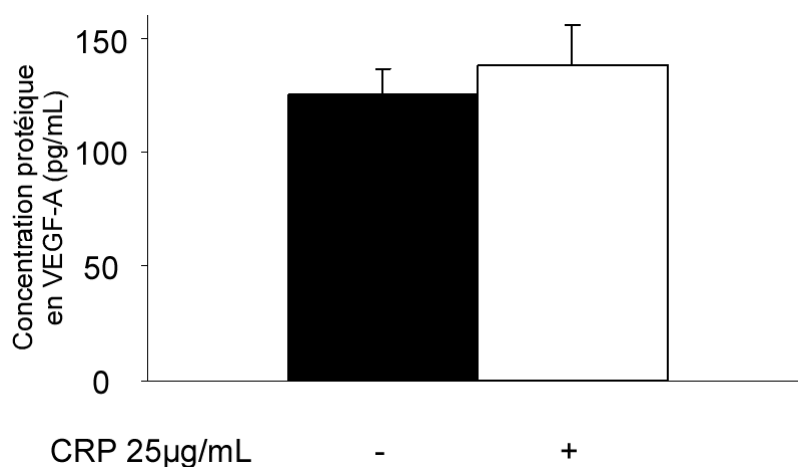
Après 24 heures de culture en présence de CRP, nous n'observons pas de variations de la quantité des protéines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 dans les surnageants de culture de monocytes. Nous ne pouvons pas, à ce niveau de l'étude, établir de corrélation entre la CRP purifiée et la synthèse de ces protéines. Seules les variations en ARNm après 12 heures de contact avec la CRP purifiée ont pu être démontrées. Des expériences complémentaires effectuées avec des temps de traitement avec la CRP purifiée inférieurs mais aussi supérieurs à 24 heures pourraient permettre, si elle existe, la mise en évidence d'une régulation de leurs synthèses protéiques par la CRP.

Cette approche globale par puces à protéines nous a donc permis de mettre en évidence de nouvelles régulations de la CRP dans les monocytes dont celle du VEGF.

#### *III.4.b Confirmation de la surexpression du VEGF-A par test ELISA*

La technologie de puces à protéines ne permettant pas de quantifier aisément et précisément les variations observées, nous avons voulu confirmer par test ELISA l'augmentation protéique du VEGF-A dans les surnageants de culture de monocytes traités avec la CRP purifiée. Sachant que le fournisseur des puces à protéines était dans l'incapacité de nous préciser si les anticorps immunoabsorbés détectaient de manière spécifique le

VEGF-A ou l'ensemble des formes du VEGF, nous avons choisi de quantifier le VEGF-A par ELISA car cette forme est ultramajoritaire dans les monocytes (Figure 49).

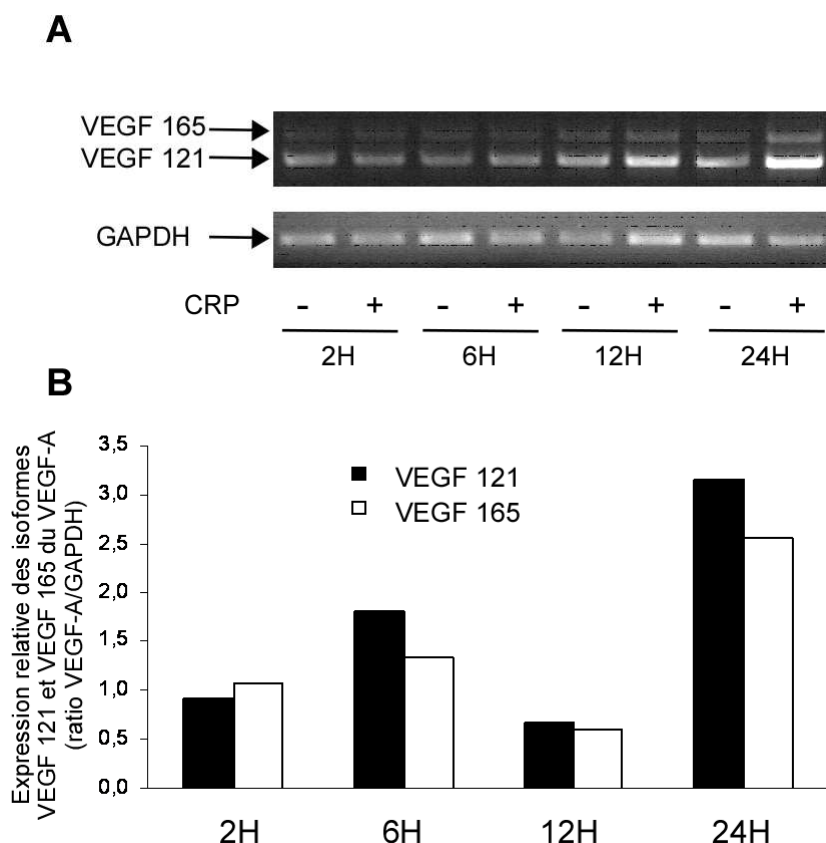


**Figure 49** : Variations du VEGF-A mesurées par test ELISA dans les surnageants de culture de monocytes traités ou non avec 25µg/mL de CRP purifiée durant 24H. La moyenne des variations de 3 échantillons différents est représentée avec leur écart-type. \*  $p < 0,05$  par rapport au contrôle (cellules non traitées)

Après 24H de culture en présence de 25µg/mL de CRP purifiée, nous n'observons pas d'augmentation significative de la concentration en VEGF-A dans les surnageants de culture des monocytes. Le nombre d'échantillons pour ce dosage étant faibles, il nous est possible d'émettre une réserve quant au résultat obtenu. Nous observons une tendance à l'augmentation qui pourrait devenir significative si le nombre d'échantillons testés était plus important. Des expériences complémentaires sur un plus grand nombre d'échantillons à différents temps de culture permettraient de répondre à cette question.

#### *III.4.c Étude de la régulation transcriptionnelle du VEGF-A par la CRP*

Bien que nous n'ayant pas pu confirmer pour le moment l'augmentation protéique du VEGF-A par test ELISA, nous nous sommes tout de même intéressés à une éventuelle régulation transcriptionnelle du VEGF-A par la CRP purifiée. Pour cela, nous avons étudié l'expression en ARNm du VEGF-A en RT-PCR sur une cinétique de culture de monocytes traités ou non avec 25µg/mL de CRP purifiée (Figure 50).



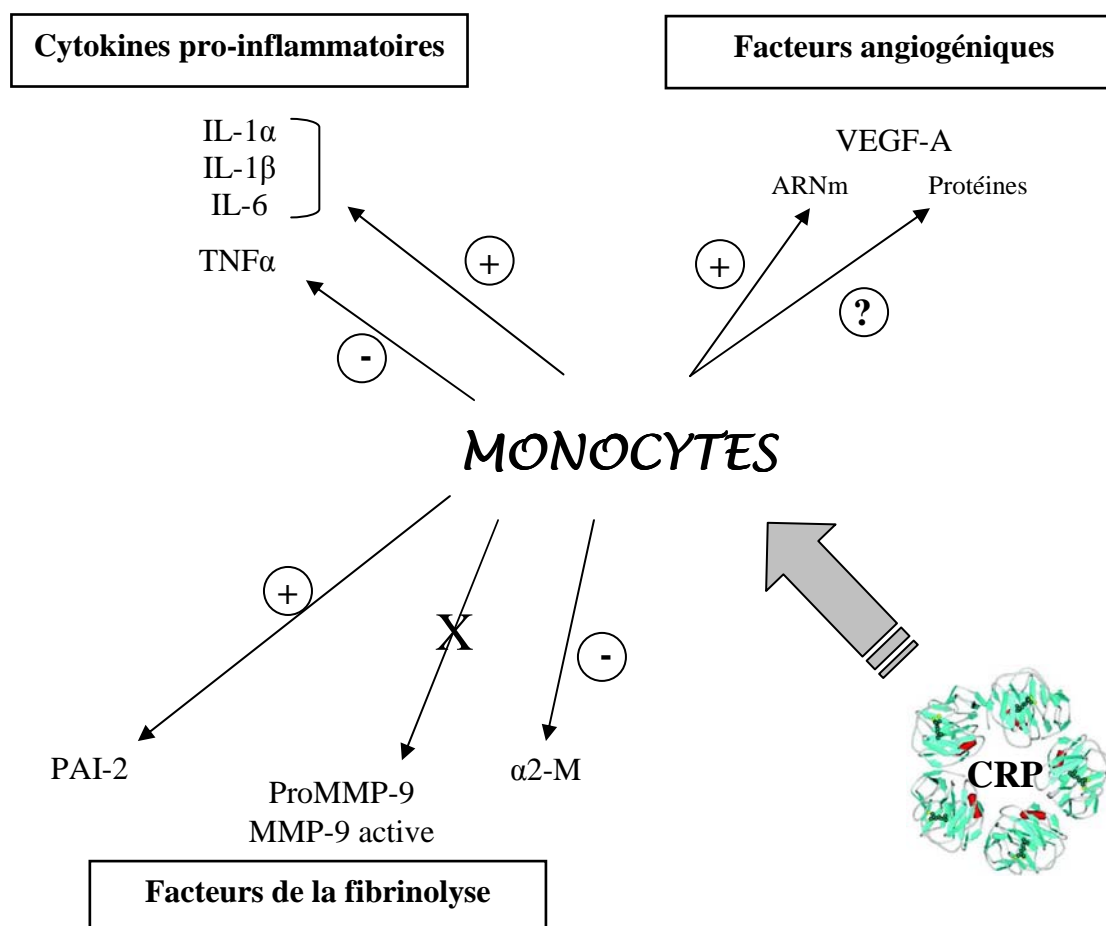
**Figure 50** : Profil d'expression du VEGF-A (formes prédominantes VEGF 121 et VEGF 165) obtenu par RT-PCR dans les monocytes traités avec 25 $\mu$ g/mL de CRP purifiée pendant 2, 6, 12 ou 24 heures. Les produits PCR obtenus pour un échantillon sont visualisés sous UV après migration sur gel d'agarose-BET (Figure A). L'expression du VEGF-A est rapportée à celle du gène de la GAPDH après analyse densitométrique des signaux (Figure B).

Les deux isoformes prédominantes du VEGF-A (VEGF165 et VEGF121) étudiées varient d'une manière similaire en présence de CRP purifiée. L'augmentation de l'expression du VEGF-A par la CRP purifiée semble s'effectuer de manière cyclique avec un premier pic d'expression à 6H puis un second plus important à 24H.

La CRP régule donc l'expression en ARNm du VEGF-A dans les monocytes.

### III.5 Résumé des effets de la CRP sur les monocytes

Nous avons pu mettre en évidence, dans les monocytes isolés, que la CRP régule la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Aucune variation de la MMP-9 n'a pu être détectée contrairement aux PBMC. Nous avons par ailleurs pu démontrer que l'expression du VEGF-A et en particulier de ses deux isoformes prédominantes (VEGF 121 et VEGF 165) est augmentée par la CRP purifiée au niveau de son ARNm (Figure 51). La modification au niveau protéique n'a pas encore pu être confirmée.



**Figure 51** : Résumé des différents effets de la CRP observés sur les monocytes isolés. Les signes "+" désignent une activation, les signes "-" une répression et X indique l'absence de régulation de MMP-9 par rapport aux PBMC.

Il nous faut à présent comprendre les mécanismes de régulation existant entre la CRP et le VEGF-A.

#### IV. Étude des effets de la CRP sur la lignée monocyttaire humaine THP-1

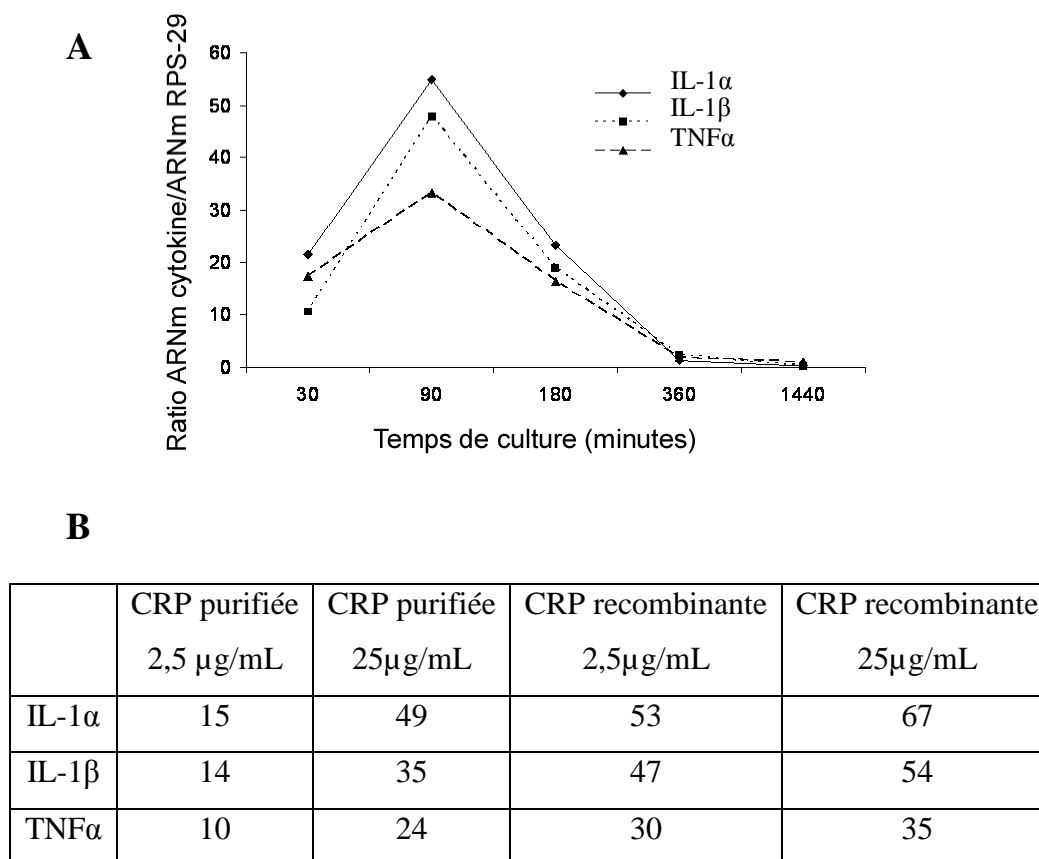
Afin de contourner les problèmes liés au prélèvement sanguin et à la purification des monocytes (variabilité inter-individuelle importante, faible proportion de ces cellules dans le sang), nous avons utilisé un modèle cellulaire afin d'étudier les mécanismes de régulation du VEGF-A par la CRP. Nous avons choisi la lignée cellulaire THP-1 qui se rapproche phénotypiquement et génétiquement le plus des monocytes utilisés dans la précédente étude. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les cellules THP-1 répondaient de manière similaire aux monocytes à un traitement par la CRP purifiée.



## IV.1 Effets de la CRP sur la synthèse de cytokines par les cellules THP-1

### IV.1.a Cinétique d'expression des cytokines pro-inflammatoires

Nous nous sommes intéressés à l'influence des CRP purifiée et recombinante à 2,5µg/mL et 25µg/mL sur l'expression des ARNm IL-1α, IL-1β et TNFα des cellules THP-1 que nous avons analysée par PCR quantitative en temps réel (Figure 52).



**Figure 52** : Cinétiques d'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires pour des cellules THP-1 traitées avec 2,5 µg/mL de CRP recombinante (A). L'expression des cytokines IL-1α, IL-1β et TNFα a été suivie par RT-PCR quantitative en temps réel en fonction du temps de culture. Des profils identiques ont été obtenus dans trois expériences distinctes. En B, les ratios ARNm cytokine/ARNm RPS-29 sont résumés à partir de 3 expériences différentes pour les trois cytokines étudiées après 1H30 de traitement des cellules THP-1 avec 2,5µg/mL ou 25µg /mL de CRP purifiée ou recombinante.

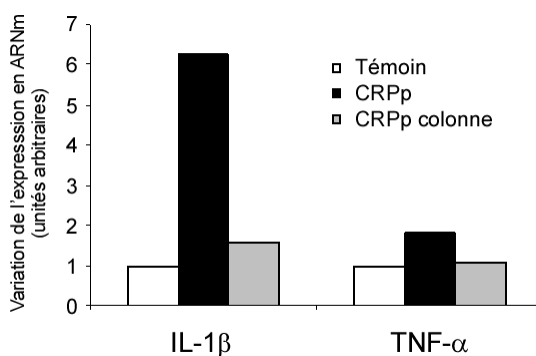
Le traitement des cellules THP-1 avec 2,5µg/mL de CRP recombinante induit l'expression en ARNm des cytokines IL-1α, IL-1β et TNFα dès 30 minutes avec un pic d'expression à 90 minutes. La CRP purifiée à 2,5µg/mL donne exactement le même profil d'expression mais avec une amplitude de réponse moindre (Figure 52B). L'utilisation de 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante permet de retrouver une cinétique d'expression identique mais avec une synthèse d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires accrue. On

retrouve alors des ratios d'expression beaucoup plus élevés que lors de l'utilisation de CRP à 2,5µg/mL (Figure 52B).

Comme dans les monocytes isolés, la CRP favorise une augmentation de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . Il apparaît que l'induction de synthèse de ces cytokines est CRP dose-dépendante et dépend du type de CRP utilisé. En effet, le traitement avec la CRP recombinante potentialise la surexpression par rapport à la CRP purifiée. De plus, nous montrons l'existence d'un effet dose-dépendant dans l'expression de ces cytokines pour des concentrations de 2,5 et 25µg/mL de CRP.

#### IV.1.b Effet de l'azide de sodium sur l'expression de l'IL-1 $\beta$ et du TNF- $\alpha$ dans les cellules THP-1

Nous avons étudié l'effet éventuel de l'azide de sodium sur l'expression des deux cytokines pro-inflammatoires, IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ , dans les cellules THP-1. Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de la solution de CRP purifiée commerciale ou avec cette même solution débarrassée de l'azide de sodium après passage sur colonne. Nous avons suivi l'expression de certaines cytokines par PCR quantitative en temps réel (Figure 53).

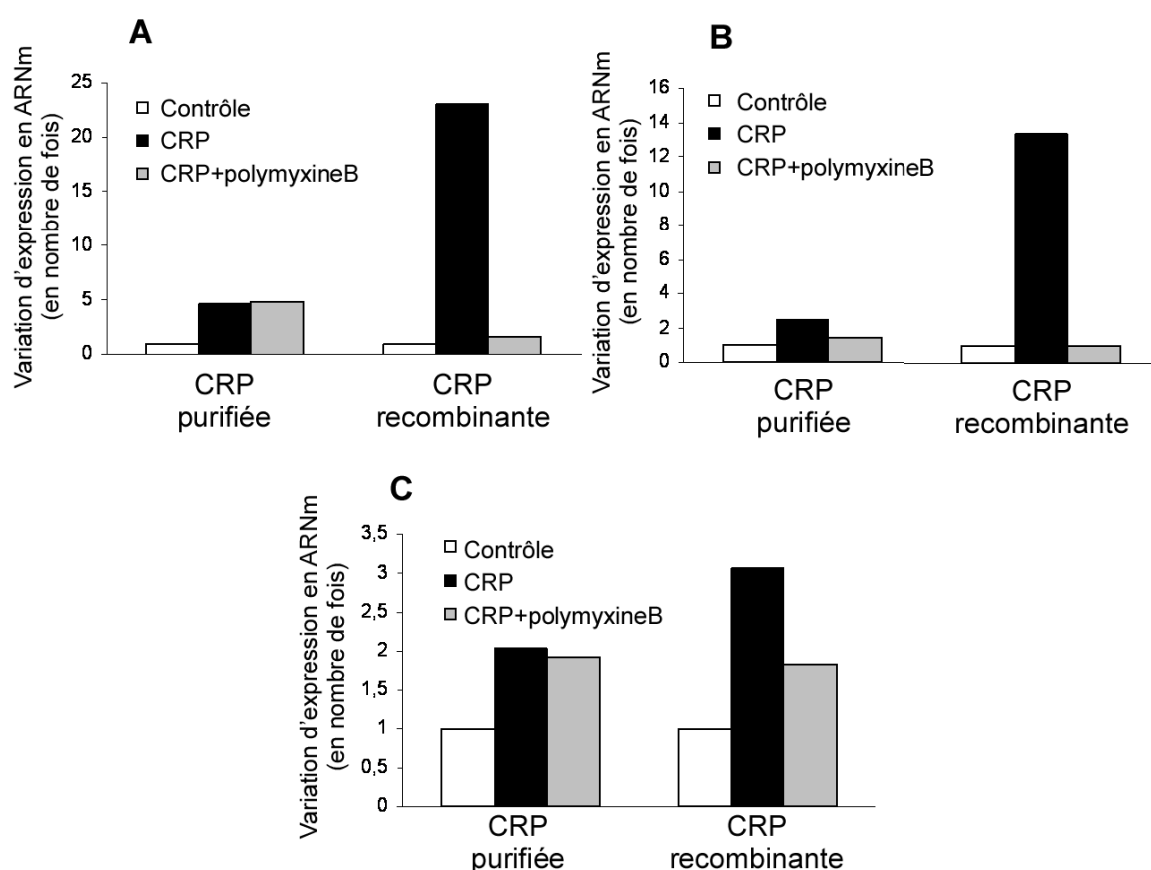


**Figure 53** : Effet de l'azide de sodium sur l'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  dans des cellules THP-1. Les cellules ont été traitées durant 90 minutes avec 25 µg/mL de CRP purifiée débarrassée (CRP colonne) ou non (CRP) de l'azide de sodium. Les expressions en ARNm de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  ont été mesurées par PCR quantitative en temps réel et normalisées par rapport au gène de référence RPS29.

Pour les deux cytokines testées, l'effet observé avec la CRP commerciale est annulé lorsque l'azide de sodium est retiré. L'augmentation initiale serait donc due à la présence d'azide de sodium et non à la CRP tout comme avec les PBMC.

#### IV.1.c Effet du LPS pouvant contaminer les préparations de CRP commerciales sur les cellules THP-1

Les effets ou une partie des effets observés sur certains types cellulaires traités par les CRP commerciales seraient dûs, de l'avis de certains auteurs, à la présence d'endotoxine (LPS) dans les solutions. Nous avons donc testé les effets de 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante sur l'expression en ARNm de l'IL-1α, l'IL-1β et du TNFα en présence ou non de 50µg/mL de polymyxine B, fixateur et inactivateur du LPS, sur les cellules THP-1 (Figure 54).



**Figure 54** : Variations de l'expression en ARNm de cytokines pro-inflammatoires des cellules THP-1 en présence ou non de 50µg/mL de polymyxine B et traitées ou non pendant 3 heures avec 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante. L'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1α (graphique A), IL-1β (graphique B) et TNFα (graphique C) a été suivie par RT-PCR quantitative en temps réel et rapportée au gène de référence RPS29. Des résultats similaires ont été observés dans deux expériences distinctes.

La pré-incubation des cellules THP-1 avec la polymyxine B, 30 minutes avant l'ajout de la CRP, ne semble pas modifier l'effet de la CRP purifiée sur l'expression en ARNm de l'IL-1α et du TNFα. L'expression en ARNm de l'IL-1β est plus sensible à la présence

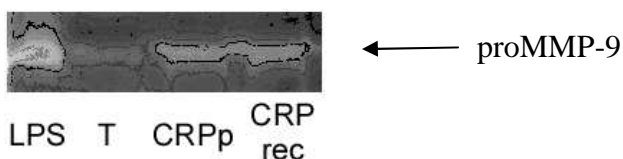
d'endotoxines car l'augmentation notée avec 25µg/mL de CRP purifiée n'est plus observée en présence de polymyxine B.

D'autre part, l'augmentation de l'expression en ARNm de ces cytokines induit par la CRP recombinante chute littéralement en présence de polymyxine B ce qui laisse à penser qu'il existe des endotoxines dans les solutions commerciales de CRP recombinante responsables d'une forte expression de l'IL-1α et de l'IL-1β. L'expression en ARNm du TNFα, bien que diminuée en présence de polymyxine B, semble être moins dépendante de la présence d'endotoxines en comparaison avec l'IL-1α et l'IL-1β.

## IV.2 Influence de la CRP sur l'activité de MMP-9 dans les cellules THP-1

### IV.2.a Mise en évidence de l'activité MMP-9

Par zymographie, nous avons étudié l'effet de la CRP sur l'activité MMP-9 dans les surnageants de cellules THP-1 traitées avec 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante (Figure 55).

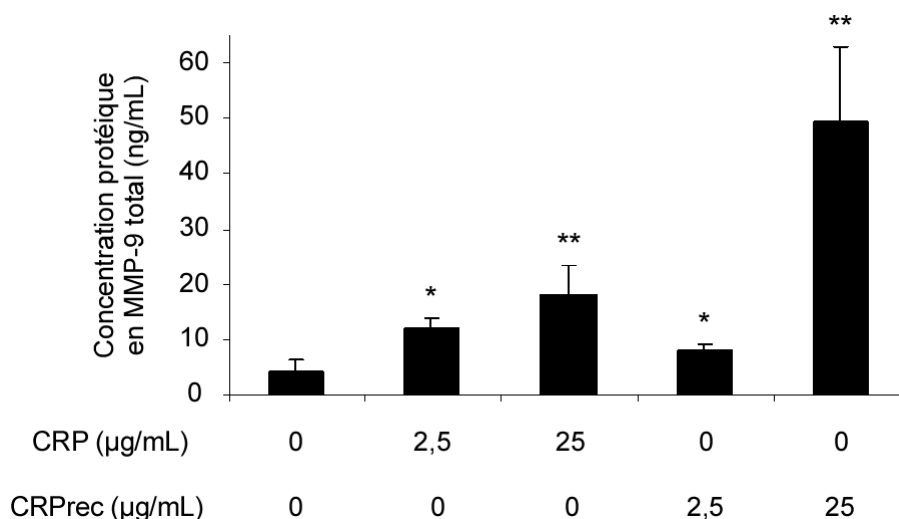


**Figure 55** : Variations de l'activité MMP-9 observée par zymographie dans les surnageants de cellules THP-1 traitées ou non avec 25µg/mL de CRP purifiée (CRP) ou recombinante (CRP<sub>rec</sub>) pendant 24 heures. Les surnageants des cellules THP-1 traitées avec 1ng/mL de LPS (LPS) font office de contrôle positif. T : témoin sans traitement. Des résultats similaires ont été observés dans deux expériences distinctes.

Contrairement aux monocytes, nous observons une augmentation de l'activité proMMP-9 sous l'effet de la CRP et l'amplitude d'induction semble identique pour les deux types de CRP.

### IV.2.b Confirmation par dosage ELISA

Les surnageants de cultures de cellules THP-1 traitées ou non avec 2,5µg/mL ou 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante ont été utilisés afin de mesurer les concentrations de MMP-9 total et de confirmer les observations obtenues par zymographie (Figure 56).

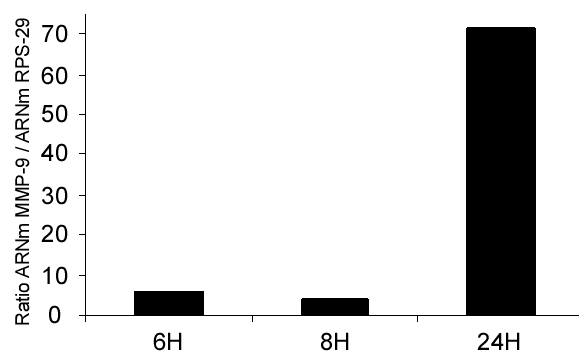


**Figure 56** : Variations des concentrations protéiques en MMP-9 total dans les surnageants des cellules THP-1 traitées ou non avec 2,5µg/mL ou 25µg/mL de CRP purifiée (CRP) ou recombinante (CRPrec) pendant 24 heures. Les résultats des dosages ELISA sont présentés sous forme de moyennes +/- écart-type de 4 à 8 expériences différentes. \* p<0,05 et \*\* p<0,01 par rapport au témoin sans CRP (test de Mann-Whitney).

Les résultats présentés en figure 56 démontrent que les deux types de CRP activent la synthèse protéique de MMP-9 et ceci de manière dose-dépendante.

#### IV.2.c Approche par mesure de la quantité d'ARNm MMP-9

Nous avons étudié en parallèle si l'augmentation protéique de la MMP-9 était liée ou non à une néosynthèse. Pour cela, nous avons suivi en PCR quantitative en temps réel les variations de la quantité d'ARNm de MMP-9 sous l'action de la CRP (Figure 57).



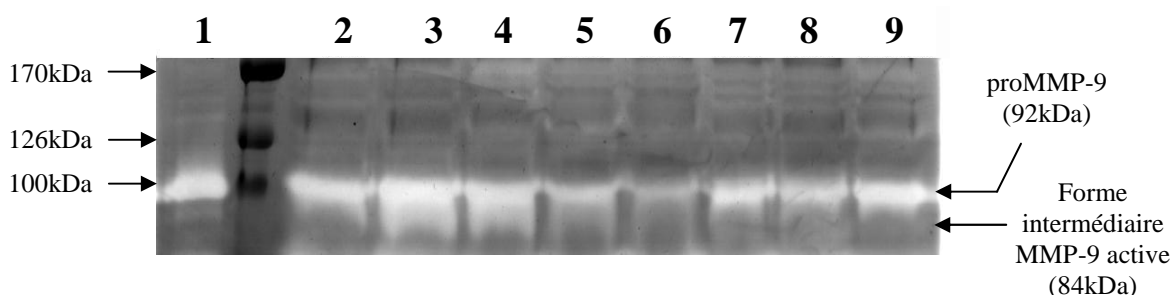
**Figure 57** : Variations au cours du temps de l'expression en ARNm de MMP-9 avec les cellules THP-1 traitées avec 2,5µg/mL de CRP recombinante (CRPrec).

Nous retrouvons une augmentation de la quantité d'ARNm du gène MMP-9 dès 6 heures de contact avec la CRP recombinante avec un maximum d'induction à 24H avec une

expression de l'ARNm MMP-9 environ 70 fois supérieure à la normale. La régulation par la CRP semble donc s'effectuer également au niveau de l'ARNm de MMP-9.

#### IV.2.d Voies de signalisation impliquées

Nous avons également testé, par zymographie, les variations protéiques de MMP-9 dans les surnageants de culture de cellules THP-1 traitées avec différents inhibiteurs enzymatiques (Figure 58). Les inhibiteurs étant solubilisés dans du DMSO, nous avons testé s'il existait un effet éventuel du DMSO sur l'activité MMP-9 dans les cellules THP-1.



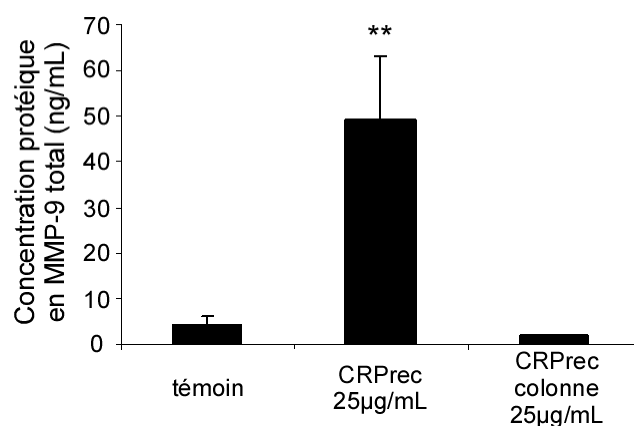
**Figure 58** : Influence de certains inhibiteurs enzymatiques sur les variations de l'activité MMP-9 pour des cellules THP-1 traitées avec 25µg/mL de CRP recombinante (CRPrec) durant 24 heures (n=2). Les surnageants des cellules THP-1 traitées avec 1ng/mL de LPS (piste 1) font office de contrôle positif. Piste 2 : DMSO 0,1% ; piste 3 : DMSO 0,1% + CRPrec 25µg/mL; piste 4 : CRPrec 25µg/mL ; piste 5 : CRPrec 25µg/mL+PD98059 10µM ; piste 6 : CRPrec 25µg/mL+Ly294002 10µM ; piste 7 : CRPrec 25µg/mL+SB203580 20µM ; piste 8 : CRPrec 25µg/mL+SB202190 20µM ; piste 9 : THP-1 non traitées. Les résultats obtenus sont identiques avec 25µg/mL de CRP purifiée.

Nous observons que la présence de DMSO augmente la quantité de MMP-9 induite par la CRP alors que le DMSO seul n'a aucun effet significatif. L'activité gélatinase est réduite de 40% avec l'inhibiteur de MEK1/2 (PD98059), et de 70% avec l'inhibiteur de la phosphatidyl inositol-3 kinase (Ly294002) en comparaison avec l'activité mesurée en présence de 25µg/mL de CRP recombinante. Ces deux observations ont été confirmées en PCR quantitative en temps réel (résultats non présentés). On note que les inhibiteurs de p38MAPKinase (SB203580 et SB202190) ne bloquent pas de manière significative la production de MMP-9 (environ 15% de baisse en moyenne par rapport à l'activité CRP seule).

Il semblerait donc que la production de MMP-9 soit régulée par la CRP et ce, par l'intermédiaire des voies MEK1/2 et PI3-Kinase sans passer par la voie p38MAPKinase.

#### IV.2.e Effet de l'azide de sodium sur la synthèse de MMP-9

Suite à la parution de plusieurs articles attribuant certains effets de la CRP aux contaminants présents dans les solutions commerciales et non à la protéine elle-même, nous sommes intéressés à l'impact de l'azide de sodium dans la synthèse protéique de MMP-9 total. Une fraction de la CRP recombinante a été débarrassée de l'azide de sodium après passage sur des colonnes de purification (CRPrec colonne). Les cellules THP-1 ont été traitées avec 25µg/mL de CRP recombinante ou de CRPrec colonne. Les résultats sont présentés figure 59.



**Figure 59** : Influence de l'azide de sodium sur la synthèse protéique de MMP-9 total dans les surnageants de cellules THP-1 cultivées durant 24H avec 25µg/mL de CRPrec ou 25µg/mL de CRPrec débarrassée de l'azide de sodium (CRPrec colonne). Les concentrations en MMP-9 total sont déterminées par dosage ELISA et sont exprimées en moyenne +/- écart-type de 4 à 8 expériences distinctes. \*\* p<0,01 par rapport au témoin sans traitement.

Nous retrouvons l'effet activateur de la CRP recombinante que nous avons mis en évidence en zymographie et en PCR quantitative. Cet effet n'est plus du tout observé lorsque l'azide de sodium est retiré de la solution de CRP recombinante. Il semble donc que l'augmentation de MMP-9 total observée initialement ne soit pas due à la CRP mais à l'azide de sodium présent dans la solution, tout comme les PBMC.

### IV.3 Effets de la CRP sur la synthèse de VEGF-A

Afin d'approfondir notre étude sur l'induction du VEGF-A par la CRP, deux doses ont été testées (2,5µg/mL et 25µg/mL) sur les cellules THP-1 en utilisant les CRP purifiée et recombinante. Après lyse des cellules et extraction des ARN totaux, l'expression du VEGF-A total a été étudiée par RT-PCR.

IV.3.a Influence de la CRP sur l'expression du VEGF-A

L'expression en ARNm du VEGF-A a été suivie par RT-PCR après différents temps d'exposition avec 2,5 ou 25µg/mL de CRP purifiée ou recombinante (Figure 60).

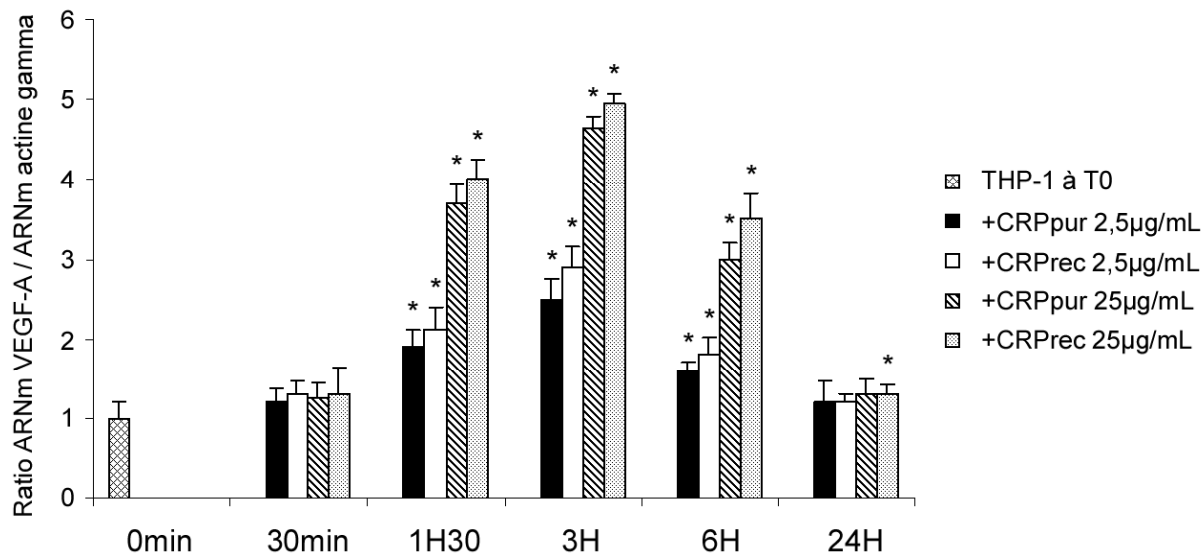


Figure 60 : Variations de l'expression en ARNm du VEGF-A dans les cellules THP-1 après traitement avec 2,5 ou 25µg/mL de CRP purifiée (CRP) ou recombinante (CRPrec). L'actine gamma est utilisée comme gène rapporteur et la valeur de 1 a été attribuée de manière arbitraire au témoin sans CRP à 0min. Les résultats présentés ont été obtenus dans trois expériences différentes.

Nous observons un pic d'expression de l'ARNm VEGF-A total après 3H de contact entre les cellules THP-1 et 2,5µg/mL ou 25µg/mL de CRP recombinante. Les résultats sont similaires lors du traitement avec les mêmes doses de CRP purifiée.

Dans cette étude, nous montrons qu'il existe une augmentation de l'expression en ARNm du VEGF-A total quel que soit le type de CRP utilisé. Nous observons qu'une concentration en CRP de 2,5µg/mL est suffisante pour induire une augmentation significative de la quantité d'ARNm du VEGF-A. Cette augmentation est peut-être due à une néosynthèse d'ARNm, à une stabilisation accrue de l'ARNm ou les deux. De même, il existe un effet concentration-réponse car une dose de 25µg/mL de CRP optimise l'augmentation d'expression observée à 2,5µg/mL.



IV.3.b Effets de la CRP sur l'expression protéique du VEGF-A dans les surnageants des cultures de cellules THP-1

Les concentrations protéiques de VEGF-A dans les surnageants des cultures de cellules THP-1 ont été déterminées par test ELISA afin d'évaluer l'impact des différents traitements sur la concentration de la protéine (Figure 61).

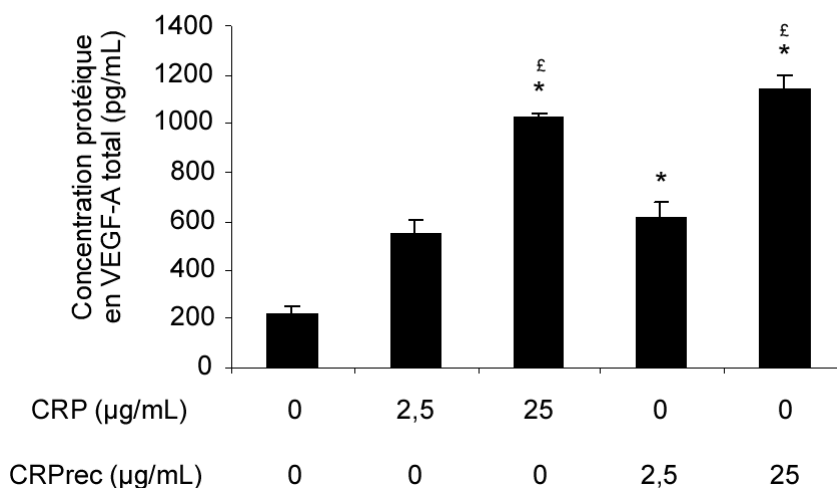


Figure 61 : Effet dose-réponse de la CRP sur la libération de VEGF-A dans les surnageants de culture de cellules THP-1 traitées durant 24H avec 2,5 ou 25µg/mL de CRP purifiée (CRP) ou de CRP recombinante (CRPrec). Les résultats obtenus par dosage ELISA représentent les moyennes de concentration en VEGF-A +/- écart-type de 3 expériences différentes. \* p<0,05 par rapport au témoin sans CRP ; £ p<0,05 par rapport à la dose 2,5µg/mL (test de Mann-Whitney).

Nous observons une augmentation de la concentration en VEGF-A dans les surnageants de culture de cellules THP-1 traitées avec la CRP. Il existe également, comme au niveau transcriptionnel, un effet dose de la CRP sur la libération de VEGF-A.

Nous confirmons par ce test et par les expériences en RT-PCR que la CRP induit la surexpression du VEGF-A total au niveau de l'ARNm et au niveau protéique sur les cellules THP-1.

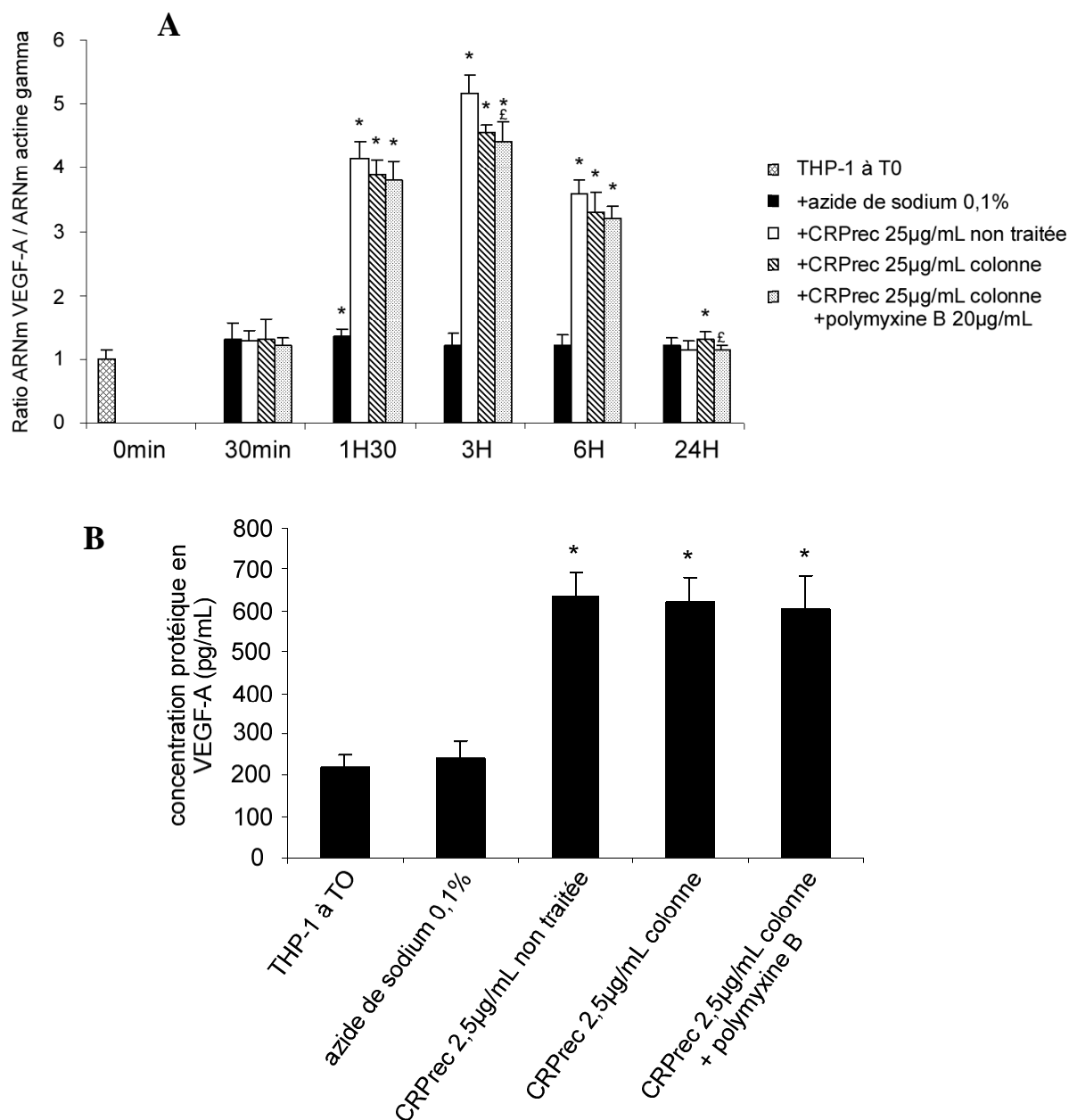
*IV.3.c Effet des contaminants de la CRP sur l'expression du VEGF-A*

Nous avons étudié de manière cinétique l'influence éventuelle de l'azide de sodium et du LPS sur l'expression du VEGF-A par RT-PCR et par ELISA. Pour cela, une solution d'azide de sodium à 0,1% correspondant à la concentration utilisée dans les solutions de CRP a été testée sur les cellules THP-1. En parallèle, l'augmentation de l'expression en ARNm et en protéines du VEGF-A a été suivie après traitement avec la solution de CRP recombinante à 25µg/mL mais également avec cette même solution préalablement purifiée sur colonnes (BioSpin columns puis Detoxi-gel Endotoxin Removal columns) traitée ou non avec 20µM de polymyxine B (Figure 62).

La solution d'azide de sodium à 0,1% n'augmente pas significativement l'ARNm et les protéines du VEGF-A. De plus, la CRP passée sur colonnes, donc débarrassée de l'azide de sodium et du LPS contaminants, augmente toujours l'expression du VEGF-A (ARNm et protéines) de manière identique à la CRP non traitée. Ces deux expériences confirment donc l'absence d'effet de l'azide de sodium dans l'expression du VEGF-A par la CRP.

Les endotoxines ne modifient pas l'augmentation du VEGF-A observée. Après passage sur les deux colonnes, en présence ou non de polymyxine B, la CRP recombinante induit l'augmentation de la synthèse du VEGF-A en ARNm et en protéines d'une manière identique à celle de la CRP recombinante non traitée. Si des contaminants existent dans les solutions de CRP recombinante, ils ne sont donc pas responsables des effets observés sur la synthèse du VEGF-A par la CRP.

Nous pouvons donc affirmer que les effets décrits sur la synthèse du VEGF-A sont bien dûs à la CRP et non pas à des éléments contaminants tels que l'azide de sodium et/ou le LPS.



**Figure 62** : Effet des contaminants de la solution commerciale de CRP sur l'expression du VEGF-A en ARNm dans les cellules et en protéines dans les surnageants des cultures de cellules THP-1 traitées avec 2,5 ou 25µg/mL de CRP recombinante (CRPrec non traitée). Une partie de la solution commerciale de CRPrec a été débarrassée de l'azide de sodium et des endotoxines par passages successifs sur deux colonnes (BioSpin columns puis Detoxi-gel Endotoxin Removal columns) puis a été ajoutée à des concentrations de 2,5µg/mL ou 25µg/mL aux cultures cellulaires (CRPrec colonne). En guise de contrôle, une solution de polymyxine B à 20µg/mL a complété le traitement avec la CRPrec colonne. A : Cinétique d'expression en ARNm du VEGF-A par RT-PCR. Le gène de l'actine gamma fait office de gène de référence. B : Dosage ELISA du VEGF-A dans les surnageants des cultures de cellules THP-1 traitées durant 24H avec 2,5µg/mL de CRPrec. Des résultats similaires ont été obtenus avec 25µg/mL de CRPrec. Les résultats présentés sont exprimés en moyennes +/- écart-type de 3 expériences différentes. \* p<0,05 par rapport aux THP-1 à T0 (cellules sans traitement à 0min), £ p<0,05 par rapport à CRPrec colonne (test de Mann-Whitney).

#### **IV.4 Étude des voies de signalisation impliquées dans la synthèse du VEGF-A par la CRP**

Nous avons démontré que les cellules THP-1 et les monocytes isolés répondaient de manière identique à la CRP en augmentant leur synthèse de VEGF-A. Nous avons donc utilisé les cellules THP-1 afin d'étudier les voies de signalisation activées par la CRP lors de l'augmentation de la synthèse du VEGF-A. Au vu de la littérature, nous avons étudié quatre voies de signalisation susceptibles d'être activées par la CRP : la voie MEK1/2, la voie PI3-Kinase, la voie p38MAPKinase et la voie NFkB.

##### *IV.4.a Approche par l'utilisation de différents inhibiteurs de transduction du signal*

Les cellules THP-1 ont été pré-traitées avec un inhibiteur spécifique de la voie MEK1/2 (PD98059), de la voie PI3Kinase (Ly294002) ou de la voie p38MAPKinase (SB203580 ou SB202190). Une expérience parallèle a été réalisée en utilisant un inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide. Après une heure d'incubation avec l'inhibiteur, la CRP recombinante est ajoutée à une concentration finale de 2,5µg/mL. Nous avons testé par dosage ELISA sur les surnageants des cultures, l'influence de ces inhibiteurs sur la synthèse du VEGF-A induite par la CRP. Les quatre inhibiteurs des voies de signalisation étant solubilisés dans du DMSO, nous avons vérifié que ce dernier n'influe pas sur la synthèse de VEGF-A (Figure 63).

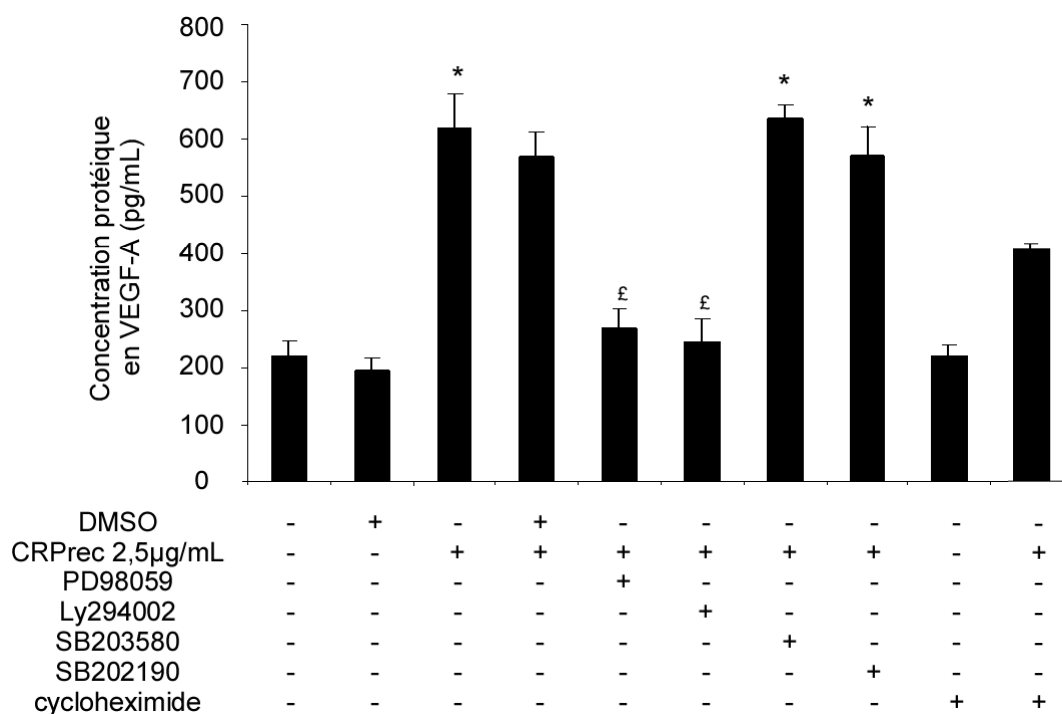


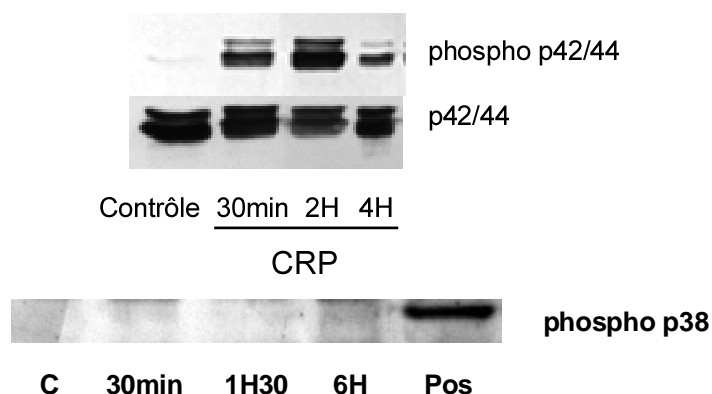
Figure 63 : Effet des inhibiteurs PD98059, Ly294002, SB203580, SB202190 et cycloheximide sur la synthèse protéique de VEGF-A induite par la CRP recombinante à 2,5µg/mL après 24H de traitement. Les résultats des dosages par ELISA pour trois expériences différentes sont exprimés sous forme de moyenne de concentration en VEGF-A +/- écart type. \* p<0,05 par rapport aux contrôles sans CRP, avec et sans DMSO ; £ p<0,05 par rapport au traitement CRP 2,5µg/mL seule.

Dans un premier temps, nous confirmons une augmentation de la concentration du VEGF-A sous l'influence de la CRP recombinante à 2,5µg/mL sur les cellules THP-1. Le DMSO présent dans les solutions d'inhibiteurs n'a pas d'effet significatif sur l'augmentation de la concentration protéique de VEGF-A initiée par la CRP. Un prétraitement avec SB203580 ou SB202190 ne modifie pas de manière significative l'augmentation de concentration protéique du VEGF-A sous l'effet de la CRP aux concentrations utilisées. Par contre, PD98059 et Ly294002 inhibent pratiquement totalement l'augmentation de VEGF-A induite par la CRP.

Ces résultats démontrent que la CRP augmente la synthèse du VEGF-A par l'intermédiaire des voies de signalisation MEK1/2 et PI3-Kinase dans la lignée cellulaire THP-1. La voie p38MAPKinase ne semble pas utilisée car les inhibiteurs de cette voie qui ont été testés ne modifient pas les effets de la CRP. La synthèse du VEGF-A n'étant diminuée que de moitié en présence de cycloheximide, ceci implique que l'augmentation de VEGF-A observée n'est pas exclusivement issue d'une synthèse *de novo*.

## IV.4.b Approche par Western-blot

Nous avons voulu confirmer les observations effectuées par test ELISA en démontrant une activation effective par la CRP de la voie MEK1/2 par la phosphorylation des protéines ERK1/2 (p42 et p44). Nous avons également tenté de détecter la protéine p38 phosphorylée, résultat de l'activation de la voie p38MAPKinase (Figure 64).



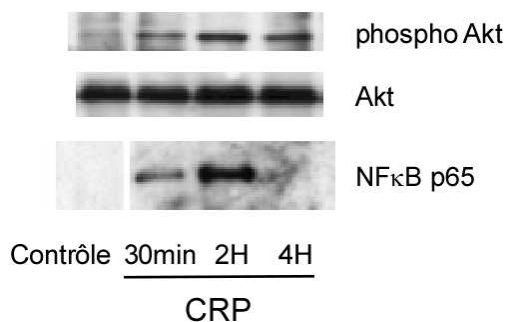
**Figure 64** : Analyse par Western-blot des voies de signalisation ERK et p38MAPK dans les cellules THP-1 traitées avec la CRP. Les protéines ERK1/2 (p42/44) phosphorylées, p38 phosphorylées ainsi que les protéines p42/44 totales ont été détectées à partir des cellules THP-1 sans traitement (C ou contrôle) ou traitées avec 2,5µg/mL de CRP recombinante pendant 30 minutes, 2 heures ou 4 heures. Le contrôle positif de la phosphorylation de p38 (Pos) correspond aux cellules THP-1 traitées avec 100ng/mL de LPS.

L'analyse densitométrique a permis de démontrer que les protéines p42/44 sont phosphorylées dès la trentième minute après ajout de la CRP. Cette phosphorylation augmente à 2H puis est diminuée à 4H. Aucune phosphorylation de la protéine p38 n'a été détectée dans les cellules THP-1 traitées ou non avec la CRP.

Nous confirmons ainsi que la CRP augmente la synthèse du VEGF-A en activant la voie de signalisation MEK1/2. La voie p38 n'intervient pas dans cette régulation.

Nous avons par ailleurs testé, en Western-blot, l'influence de la CRP sur l'état d'activation des protéines Akt et NFκB (Figure 65).

La phosphorylation de la protéine Akt, effectuée en aval de l'activation de la PI3-Kinase, a été suivie afin d'avoir une preuve indirecte de l'activation de la voie PI3-Kinase par la CRP. En terme d'activation de la voie NFκB, il nous a semblé plus judicieux de suivre l'internalisation de la protéine NFκB p65 dans le noyau des cellules THP-1 traitées avec la CRP.



**Figure 65** : Analyse par Western-blot des voies de signalisation Akt et NFκB dans les cellules THP-1 traitées avec la CRP. Les protéines Akt phosphorylées et Akt totales ont été mises en évidence dans les cellules THP-1 traitées pendant 30minutes, 2 heures et 4 heures avec 2,5μg/mL de CRP recombinante. L'internalisation de la protéine NFκBp65 dans le noyau des cellules THP-1 a été suivie dans les mêmes conditions de traitement des cellules. Le dépôt de 10μg de protéines nucléaires obtenues à partir de cellules THP-1 traitées ou non a permis la détection par western-blot de la protéine NFκB p65. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences différentes.

Nous observons une phosphorylation de la protéine Akt dès 30 minutes après l'ajout de la CRP recombinante. Cette phosphorylation devient plus importante après 2 heures de traitement avec la CRP puis stagne après 4 heures de contact. Nous démontrons ainsi que la voie Akt est activée par la CRP. Il reste à présent à démontrer l'association entre la phosphorylation de la protéine Akt, l'activation de la voie PI3-Kinase et la synthèse de VEGF-A par la CRP.

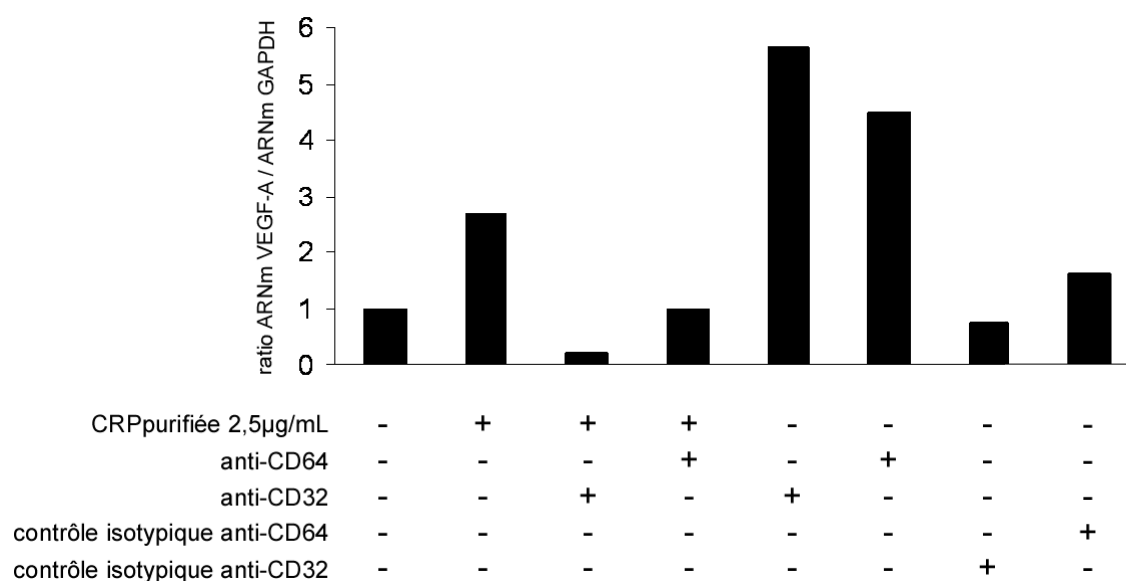
Nous mettons également en évidence une internalisation de la protéine NFκB p65 dans les noyaux des cellules THP-1 à partir de 30 minutes après ajout de 2,5μg/mL de CRP recombinante. Cette internalisation est maximale après 2 heures de contact avec la CRP et n'est plus observée après 4 heures. La CRP active donc la voie NFκB dans les cellules THP-1 pouvant ainsi favoriser la synthèse de VEGF-A.

#### **IV.5 Activation de la synthèse du VEGF-A par la CRP via les récepteurs FcγR**

Les voies de signalisation PI3-Kinase, MEK et NFκB dans les cellules monocytaires THP-1 sont utilisées par la CRP pour augmenter la synthèse du VEGF-A. Les récepteurs FcγRI et FcγRII étant décrits comme pouvant lier la CRP, nous nous sommes interrogés sur leur implication dans cette régulation. Nous avons donc commencé à réaliser des expériences en RT-PCR quantitative et en cytométrie de flux.

IV.5.a Implication des récepteurs *FcγRI* (CD64) et *FcγRIIa* (CD32) dans l'expression des ARNm VEGF-A par la CRP

Les cellules THP-1 ont été incubées durant 3 heures avec un anticorps anti-CD64 ou un anticorps anti-CD32 en présence ou non de 2,5µg/mL de CRP purifiée. Une condition expérimentale supplémentaire a été effectuée en utilisant les contrôles isotypiques de ces deux anticorps. Après extraction de l'ARN total et rétrotranscription, l'expression en ARNm du VEGF-A a été mesurée en PCR quantitative en temps réel (figure 66).



**Figure 66 :** Implication des récepteurs *FcγRI* et *FcγRII* dans l'expression de l'ARNm du VEGF-A sous l'action de la CRP. Les cellules THP-1 ont été traitées pendant 3 heures en présence de 400ng/mL d'anticorps anti-CD64 ou anti-CD32 ou avec leur contrôle isotypique (respectivement IgG1 et IgG2 de souris). La CRP purifiée a été ajoutée à une concentration de 2,5µg/mL en présence ou non des anticorps anti-CD64 ou anti-CD32. L'expression en ARNm du VEGF-A a été mesurée par PCR quantitative et rapportée à la valeur de l'expression de la GAPDH. Les résultats présentés correspondent à une expérience.

Nous voyons que la CRP augmente l'expression de l'ARNm VEGF-A comme déjà observé. Les anticorps anti-CD64 et anti-CD32 utilisés séparément augmentent aussi cette expression. Comme les cellules utilisées possèdent des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, nous avons vérifié par les contrôles isotypiques si ce phénomène était lié au fragment Fc des anticorps ou à leur partie Fab. La figure 66 montre que ces 2 contrôles n'ont aucune action sur l'ARNm VEGF-A. Donc les deux anticorps anti-CD64 et anti-CD32, en se fixant par leurs parties variables chacun sur leur récepteur, augmente l'expression de l'ARNm du VEGF-A.



Nous avons alors mis ensemble la CRP et l'un des anticorps pour tenter de comprendre quel récepteur utilisait la CRP. Nous nous attendions à un effet additif ou à obtenir au moins le résultat minimal (obtenu avec la CRP) or pas du tout. De façon étonnante, les 2 types de molécules semblent se gêner pour la liaison aux récepteurs et l'augmentation initialement observée est perdue. A nos yeux, trois hypothèses non exclusives sont possibles :

- la CRP et l'anticorps se gênent pour se fixer au récepteur : il y a encombrement stérique
- la CRP pentamérique (voire monomérique) et l'anticorps divalent se gênent mutuellement pour se fixer aux récepteurs. C'est-à-dire qu'il y a un encombrement généralisé à la surface de la cellule pour atteindre les récepteurs.
- la CRP et l'anticorps rentrent en interaction directe et cette liaison les empêche alors de se fixer au récepteur.

#### IV.5.b Etude protéique de la fixation de la CRP sur FcγRI et FcγRIIa

Nous avons alors réalisé des expériences de cytométrie de flux avec les mêmes concentrations en CRP et en anticorps que lors de l'étude de l'expression en ARNm du VEGF-A. Les cellules THP-1 ont été traitées avec la CRP purifiée en présence ou non de l'anticorps anti-CD64 ou anti-CD32. Après ajout d'un anticorps secondaire anti-IgG couplé au FITC, nous avons mesuré la fluorescence émise par cytométrie en flux (figure 67).

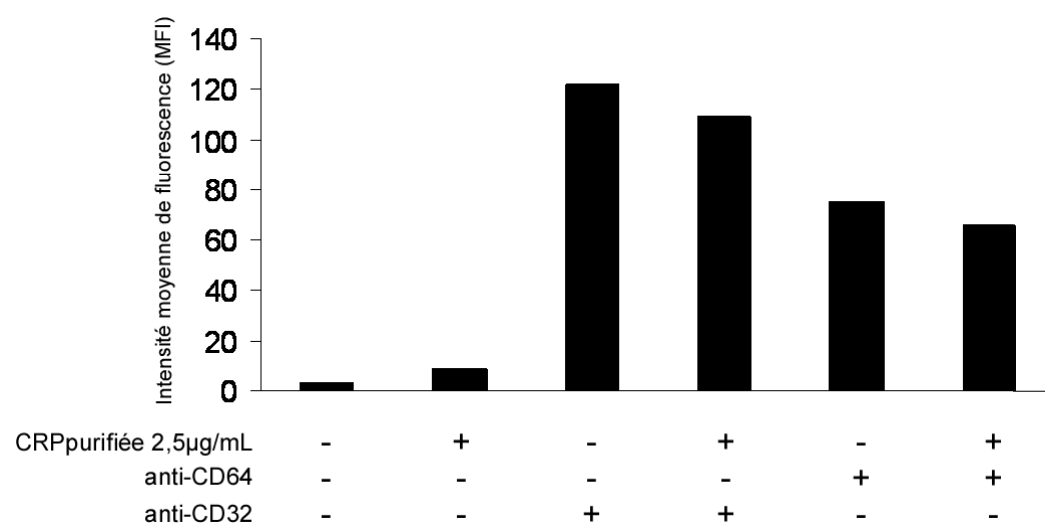


Figure 67 : Mesure par cytométrie en flux de la fixation de la CRP sur les récepteurs FcγRI et FcγRII pour les cellules THP-1. Les cellules THP-1 ont été traitées pendant 30 minutes avec 400ng/mL d'IgG anti-CD64 ou anti-CD32 en présence ou non de 2,5μg/mL de CRP purifiée. La fluorescence émise par l'anticorps secondaire anti-IgG couplé au FITC est mesurée par cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée trois fois.

En présence conjointe de CRP et d'un anticorps anti-CD64 ou anti-CD32, les intensités de fluorescence mesurées diminuent par rapport à celles enregistrées avec les anticorps seuls. Ceci semble indiquer une compétition entre la CRP et les anticorps anti-CD64 ou anti-CD32 au niveau du site de fixation des récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RII.

L'expérience n'a cependant pas permis de confirmer ou d'infirmer les 3 hypothèses énoncées dans le paragraphe IV.5.a. Néanmoins, dans la littérature, il n'a jamais été décrit d'interaction directe entre anticorps et CRP donc nous pouvons privilégier les 2 premières hypothèses qui peuvent bien sûr co-exister. Plusieurs expériences sont envisageables pour les tester :

- Utiliser des anticorps anti-CD64 ou anti-CD32 qui se lient à leur antigène sans entraîner d'effet sur le VEGF-A. Les résultats seront alors plus faciles à analyser.
- Utiliser des Ac de type Fab'2 donc sans leur partie Fc pour avoir moins d'encombrements possibles et donc là encore plus de facilité à analyser les phénomènes.
- Faire varier les quantités de CRP ou d'Ac en laissant l'autre molécule en quantité fixe. Cela permettra de mieux voir s'il y a une compétition, un encombrement stérique, etc.

#### **IV.6 Résumé des effets de la CRP sur les cellules THP-1**

Nous avons démontré que les cellules THP-1 se comportaient de la même manière que les monocytes isolés lorsqu'elles sont mises en contact avec la CRP et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ainsi que TNF $\alpha$ . Pour les THP-1, ces variations ne sont en fait pas dues à la CRP mais à la présence d'azide de sodium et de LPS dans les solutions commerciales de CRP. L'IL-6 n'a pas pu être mise en évidence par nos techniques dans les cellules THP-1.

Les augmentations d'expression de MMP-9 induites par la CRP et initialement observées sont également dues à la présence d'azide de sodium dans les solutions de CRP commerciales.

La CRP régule de manière positive l'expression du VEGF-A des monocytes. Nous avons retrouvé les mêmes effets avec les cellules THP-1. L'augmentation d'expression du VEGF-A passe par l'activation des voies de signalisation PI3-kinase et MEK1/2 (Figure 68). Les voies AKT et NF $\kappa$ B sont également activées par la CRP mais leur liaison à la synthèse de VEGF-A reste à démontrer. De plus, des expériences préliminaires indiquent que la CRP utilise les récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa pour augmenter cette expression.



**Figure 68** : Résumé des effets observés dans les cellules THP-1 en présence de CRP. Les signes "+" désignent une activation.

## V. Résumé des effets de la CRP dans les trois types cellulaires étudiés

Nous nous sommes intéressés à l'action de la CRP sur trois types cellulaires que sont les PBMC, les monocytes et les cellules THP-1.

Les variations d'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ) et de MMP-9 dans les trois types cellulaires ont été initialement attribuées à la CRP. Ils sont en fait dûs aux endotoxines (LPS) et/ou à l'azide de sodium présents dans les solutions de CRP commerciales utilisées.

Dans nos études, seule la synthèse de VEGF-A est véritablement induite par la CRP dans les monocytes et les cellules THP-1. Pour les THP-1, cette régulation de la synthèse du VEGF-A se produit via la fixation de la CRP aux récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa, déclenchant ainsi l'activation des voies PI3-kinase, MEK1/2 et potentiellement Akt et NF $\kappa$ B.

***Discussion***

# Discussion méthodologique

## I. Le problème des contaminants de la CRP

Depuis 2003, plusieurs équipes ont montré que certains effets observés à partir de cellules endothéliales et musculaires lisses traitées avec les solutions commerciales de CRP étaient des artéfacts dus à la présence de LPS ou d'azide de sodium dans les solutions [259, 261, 269, 270]. Depuis ces mises en évidence, les solutions de CRP commerciales ou récupérées à partir de liquide pleural ont été systématiquement "purifiées" par passage sur colonnes de détoxification et/ou par dialyse afin de d'enlever toute trace d'azide de sodium [259, 270, 308, 309]. L'utilisation de ces solutions "purifiées" a permis de démontrer que la CRP pouvait induire une apoptose des cellules endothéliales ainsi qu'une production de MMP-9 par des PBMC et des cellules THP-1 [308]. Il a pu également être mis en évidence l'existence d'une implication de la CRP sur la libération de certaines cytokines chimioattractantes ou non par des cellules endothéliales aortiques humaines [310]. Dans cette étude, la régulation par la CRP n'est en aucun cas affectée par le blocage du récepteur au LPS (TLR4), ce qui exclue une possible intervention du LPS dans ce cas précis.

Il faut donc être très prudent quant à l'utilisation des solutions de CRP commerciales et plus particulièrement à la présence d'azide de sodium et éventuellement de traces de LPS. C'est pour cette raison que nous avons testé l'influence de l'azide de sodium et des endotoxines sur nos différents modèles cellulaires dès la parution des premiers articles sur ce sujet.

### I.1 Cas de l'azide de sodium

Pour les cellules THP-1 utilisées dans notre étude, l'azide de sodium seul, à une concentration de 0,1% (concentration maximale indiquée dans les solutions commerciales de CRP testées), n'a aucun effet sur l'expression en ARN et protéines du VEGF-A. La même observation a été faite avec les PBMC pour l'expression en ARN de l'IL-1 $\beta$ . A l'inverse, pour les PBMC, l'expression de l'ARNm MMP-9 est modifiée en présence d'azide de sodium à 0,1%.

Après traitement des cellules avec des solutions de CRP débarrassées de l'azide de sodium par passage sur colonne, l'augmentation initiale des ARNm de l'IL1- $\beta$  et de MMP-9

observée avec la solution de CRP commerciale est perdue dans les PBMC. Pour les cellules THP-1, l'utilisation de la CRP purifiée sur colonne fait disparaître l'augmentation initiale de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  au moins en ARNm et de MMP-9 au moins au niveau protéique.

Dans notre cas, l'azide de sodium présent dans les solutions de CRP commerciales semble donc impliqué dans l'augmentation d'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  ainsi que de la métalloprotéase MMP-9 pour les deux types cellulaires testés (PBMC et cellules THP-1). L'implication de l'azide de sodium n'est pas systématique puisqu'aucune variation du VEGF-A ne lui est attribuée pour les cellules THP-1.

Il nous faut à présent étendre l'étude de l'influence de l'azide de sodium sur les autres ARNm dont l'expression est modifiée par les solutions de CRP commerciales. Ceci regroupe pour les PBMC, les ARNm IL-1 $\alpha$ , IL-6 et TNF $\alpha$  et pour les cellules THP-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et MMP-9. Une étude complète doit également être effectuée pour les monocytes isolés.

## **I.2 Cas des endotoxines**

Elles sont contenues surtout dans les solutions commerciales de CRP recombinante et leur concentration varie beaucoup d'un lot à l'autre [311]. La polymyxine B fixe les endotoxines telles que le LPS et empêche ainsi la fixation de celles-ci à leur récepteur "Toll-like receptor 4" (TLR4). Elle inhibe ainsi, entre autres, l'activation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires engendrée habituellement par ces endotoxines. La présence d'endotoxines dans les solutions commerciales de CRP recombinante nous a donc conduit à tester sur des cellules THP-1 les conséquences de l'ajout de CRP et de polymyxine B à 50 $\mu$ g/mL sur l'expression en ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . Une concentration similaire en polymyxine B a été utilisée dans un grand nombre d'études explorant la voie de signalisation du LPS et a été estimée suffisante au regard de la littérature pour inhiber cette voie d'activation et la synthèse associée d'IL-1 et de TNF $\alpha$ .

Les résultats diffèrent selon le type de CRP utilisé. Dans les cellules THP-1, en présence conjointe de CRP purifiée et de polymyxine B, il y a persistance de l'augmentation de l'ARNm pour IL-1 $\alpha$  et TNF $\alpha$ . On observe une très légère diminution pour IL-1 $\beta$ . Avec la CRP recombinante, la présence de polymyxine B inhibe totalement l'augmentation en ARNm de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ . L'augmentation en ARNm du TNF $\alpha$  est diminuée mais pas totalement annulée. Cette différence de réponse à la polymyxine B entre les deux types de CRP peut s'expliquer par leurs origines respectives. La CRP purifiée est issue de plasma

humain et contient peu voire pas d'endotoxines alors que la CRP recombinante est obtenue par génie génétique chez *E.coli* dont la paroi est très riche en endotoxines de type LPS. De plus, la quantité d'endotoxines dépend énormément des lots de solutions de CRP commerciale recombinante. Nous avons pu observer des quantités d'endotoxines jusqu'à 15 fois différentes d'un lot de CRP recombinante à l'autre (résultats non présentés). Nous pouvons également supposer que l'activité d'opsonisation de la CRP recombinante pourrait être beaucoup plus importante et expliquer ainsi la différence d'amplitude de réponse entre la CRP recombinante et la CRP purifiée. Dans le cas de la CRP recombinante, il pourrait se produire une double activation : celle de la voie de signalisation de la CRP mais également celle du LPS, activée par les endotoxines libres ou fixées à la CRP recombinante. Les variations d'expression sur les cytokines testées seraient la résultante des deux signaux. Lors de l'ajout de polymyxine B, les endotoxines sont neutralisées, ce qui ramène la réponse à l'effet unique de la CRP recombinante, réponse qui se rapproche alors de celle de la CRP purifiée. Il est nécessaire à présent d'augmenter le nombre d'échantillons afin de confirmer ces premières données.

## II. Le choix des cellules

Nous avons choisi de tester les effets de la CRP sur 3 types cellulaires différents : les PBMC, les monocytes isolés et la lignée cellulaire THP-1. Notre première étude a été effectuée sur les PBMC car l'obtention de ces cellules est relativement aisée, peu onéreuse et nécessite de faibles quantités de sang. De plus, les résultats observés résultent des interactions directes et indirectes entre les lymphocytes (environ 80% des PBMC) et les monocytes (environ 20% des PBMC) ce qui nous rapproche des conditions observées *in vivo*. Le seul inconvénient réside dans l'interprétation des résultats, du fait de la présence de deux types cellulaires. C'est pourquoi nous avons complété cette étude par l'analyse de monocytes isolés à partir des PBMC. Cette approche nécessite de plus grandes quantités de sang en raison du faible pourcentage de monocytes circulants mais décrit un rôle spécifique du monocyte isolé. Nous pouvions par ailleurs nous appuyer sur un certain nombre de parutions décrivant le rôle des lymphocytes dans la pathologie de l'athérosclérose [312].

Les nouvelles régulations mises en évidence dans les monocytes isolés nous ont conduits à explorer les voies de signalisation activées par la CRP. Les quantités de monocytes isolés nécessaires devenant trop importantes pour cette phase de l'étude, nous avons dû utiliser un modèle cellulaire proche. Notre choix s'est donc porté sur la lignée monocyttaire

THP-1 et nous avons pu ainsi nous affranchir du manque de matériel biologique. L'utilisation de cette lignée nous a également permis d'éviter les variations interindividuelles observées lors des études sur les PBMC et les monocytes. Malgré tout, les cellules THP-1 ne miment pas parfaitement tous les effets observés avec les monocytes isolés notamment parce qu'elles sont d'origine leucémique et promonocytaire. Il sera donc nécessaire de confirmer pour les monocytes certains résultats obtenus avec la lignée cellulaire.

### III. Le choix des concentrations

Les concentrations de 25µg/mL de CRP utilisées peuvent représenter une limitation dans ces études. De telles concentrations circulantes ne sont retrouvées *in vivo* que dans le cadre d'une inflammation aiguë. Nous avons cependant choisi cette concentration de 25µg/mL de CRP comme compromis entre la durée de l'expérience et l'amplitude des effets observés. Une concentration identique voire supérieure a été utilisée et même décrite comme minimale dans d'autres études *in vitro* pour induire l'activation des monocytes et leur adhésion aux cellules endothéliales [245, 313].

De plus, il a été suggéré que les concentrations de CRP circulante ne reflétaient pas celles retrouvées dans les tissus [279, 314] et qu'une élévation locale des niveaux de CRP à l'intérieur des plaques d'athérome serait suffisante pour favoriser une aggravation de l'athérosclérose [315]. La CRP peut être produite *in situ*, notamment par les cellules musculaires lisses ou par les macrophages au niveau des lésions athéromateuses [30, 31]. Il en résulte des concentrations fortes en CRP au niveau du site d'inflammation qui peuvent donc se rapprocher des concentrations utilisées dans nos expériences.

Comme il a été rapporté que les effets de la CRP purifiée pouvaient être dues aux immunoglobulines contaminantes [52, 57], nous avons comparé deux types de CRP sur les cellules THP-1 : purifiée et recombinante. La CRP recombinante étant obtenue par génie génétique chez *Escherichia coli*, aucune contamination par des immunoglobulines n'est possible. Nous avons noté que les tendances décrites dans notre étude sont identiques pour les deux types de CRP vis-à-vis du VEGF-A. Par contre, l'expression des cytokines pro-inflammatoires testées est majoritairement plus élevée avec la CRP recombinante qu'avec la CRP purifiée mais cette variation, nous l'avons vue, est due à la présence de contaminants de type endotoxines dans la solution de CRP recombinante.



## **ÉTUDE N° 1 : Effets de la protéine C-réactive sur l'expression du facteur angiogénique VEGF-A**

L'angiogénèse est un phénomène dont le VEGF (ou facteur de perméabilité vasculaire) est l'un des acteurs majeurs. Les effets du VEGF peuvent être observés en conditions normales lors du développement embryonnaire et post-natal précoce [316, 317], lors de la croissance squelettique [318] ou de l'angiogénèse ovarienne [319] mais également dans des conditions pathologique lors de tumeurs [320, 321], de syndromes de néovascularisation intraoculaire [322, 323], dans l'œdème cérébral après ischémie [324] ou lors du syndrome ovarien polycystique [325]. L'inhibition du VEGF a même été considérée dans certaines pathologies en tant que possible thérapie. L'angiogénèse dans les pathologies cardiovasculaires, en particulier dans l'athérosclérose, est un phénomène étudié depuis peu.

La néovascularisation de la plaque d'athérome, associée à la présence du VEGF, accompagne une inflammation chronique des larges vaisseaux sanguins et est associée à la formation d'un réseau de capillaires qui se forment à partir des vasa vasorum de l'adventice et s'étendent jusqu'à l'intima [326, 327]. Ces capillaires facilitent l'entrée des leucocytes et de composants plasmatiques (dont la CRP, certains facteurs du complément et des LDL) à l'intérieur de la lésion mais peuvent aussi causer une hémorragie intraplaque [328].

Même si l'augmentation du taux de VEGF a été corrélée statistiquement avec celui de la CRP dans diverses pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde [329], l'infarctus myocardique aigu [330] ou le myélome multiple [331], très peu d'études décrivent des associations directes entre la CRP et le VEGF et ce, malgré leur colocalisation au sein des plaques d'athérome. Les principaux effets observés concernent une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une inhibition de la migration induite par le VEGF sur des cellules progénitrices endothéliales (EPC) sous l'action de la CRP [258]. Il a également été rapporté une inhibition par la CRP, de l'adhésion des EPC sur des cellules HUVEC par diminution de l'expression du ligand de la sélectine-P, de la sélectine-L, de LFA-1 et de l'intégrine- $\alpha$ 4 [246, 258]. D'autres études ont permis de démontrer que la CRP inhibe la migration des cellules endothéliales et des EPC initiée par le VEGF et qu'elle provoque une réduction de la

formation de tubes capillaires induite par le VEGF en empêchant les EPC d'intégrer l'endothélium et de participer à la néovascularisation [247]. Il faut rester prudent quant à ces conclusions car aucune de ces études n'a pris en compte l'effet potentiel de certains éléments présents dans les solutions de CRP utilisées tels que l'azide de sodium ou les endotoxines. Aucune étude n'a jusqu'à présent démontré une relation directe entre la CRP, la synthèse de VEGF et les cellules du système immunitaire. Parmi les cinq formes du VEGF connues à ce jour, le VEGF-A est le plus impliqué et le mieux décrit dans le cadre de l'angiogénèse car il est majoritaire. Les autres formes du VEGF, découvertes plus récemment et moins bien documentées, semblent être impliquées de manière plus restreintes que le VEGF-A [332, 333]. Il nous a donc paru important d'étudier les effets éventuels de la CRP sur la synthèse du VEGF-A dans les monocytes et les cellules monocytaires THP-1.

## **I. La CRP induit une augmentation de l'ARNm du VEGF-A**

Nous démontrons, pour la première fois, que la CRP induit une augmentation de la quantité d'ARNm du VEGF-A dans les cellules THP-1 mais également dans les monocytes isolés. Le pic d'expression en ARNm du VEGF-A est différé dans le temps entre les deux types cellulaires. Il est maximal après 3H d'incubation avec la CRP pour les cellules THP-1 alors qu'il n'apparaît qu'à 6H puis à 24H pour les monocytes isolés. Il faut cependant rappeler que les cellules THP-1 sont issues d'un clone monocyttaire d'un patient atteint de leucémie aiguë. De ce fait, ces cellules tumorales pourraient être davantage sensibles aux stimuli externes et pourraient réagir plus rapidement par rapport à des cellules saines comme les monocytes isolés qui n'ont plus aucun contact, direct (par contact cellulaire) ou indirect (par l'intermédiaire de molécules régulatrices), avec leur environnement naturel. De même, les capacités de prolifération sont totalement différentes entre les deux types cellulaires. On peut donc penser qu'il en est de même pour leur différenciation éventuelle.

## **II. La CRP induit la synthèse protéique du VEGF-A**

La surexpression en ARNm du VEGF-A a été confirmée au niveau protéique pour les cellules THP-1 après 24H de contact avec la CRP purifiée. Une augmentation a également été mesurée dans les surnageants des cultures de monocytes mais un nombre trop faible d'échantillons n'a pas permis d'effectuer des tests statistiques interprétables. Il est possible

que les dosages protéiques du VEGF-A dans les surnageants de monocytes n'aient pas été réalisés au meilleur moment. Les mesures ont en effet été effectuées 24H après ajout de CRP, soit au niveau de l'augmentation maximale de l'ARNm du VEGF-A. Il serait judicieux d'effectuer des dosages ELISA du VEGF-A plus tardifs après 36 ou 48 heures afin d'observer éventuellement une variation de la concentration protéique de VEGF-A dans les surnageants des monocytes. Le pic en ARNm VEGF-A de 24H étant d'amplitude plus importante que celui de 6H, nous pouvons nous attendre à une synthèse protéique associée également plus importante pour les monocytes.

De plus, les concentrations protéiques en VEGF-A mesurées en ELISA dans les surnageants de culture des monocytes sont extrêmement faibles par rapport à celles obtenues avec les surnageants de culture des cellules THP-1. Pakala et al. ont mesuré des concentrations de VEGF-A libérées par des monocytes similaires aux nôtres [334]. Cette différence est encore probablement due au caractère tumoral des cellules THP-1 et leur sensibilité aux stimuli externes. D'autres lignées cellulaires leucémiques telles que HL-60 et U937 présentent également de fortes libérations de VEGF-A en culture. Nous avons pu vérifier ce point lors d'une étude préliminaire sur des cellules HL-60 traitées avec la CRP (résultats non présentés).

L'emploi d'une technique autre que l'ELISA (puces à protéines) nous a permis d'observer une augmentation protéique moyenne en VEGF d'un facteur de 1,8 dans les surnageants de monocytes traités durant 24H avec la CRP purifiée. Il nous est malheureusement impossible de savoir précisément ce que reconnaît l'anticorps immunoabsorbé sur la puce. Ni le fabricant, ni le distributeur de la puce n'ont pu nous donner cette information. Cet anticorps ou le mélange d'anticorps peut donc reconnaître le VEGF-A de manière sélective mais il peut aussi reconnaître d'autres formes de VEGF (VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D) voire toutes. Eventuellement, des molécules proches en structure du VEGF telles que le PlGF pourraient également être reconnues. Vu les concentrations de VEGF-A mesurées par ELISA, nous pouvons donc supposer que ce qui est détecté sur la puce ne correspond pas uniquement au VEGF-A mais probablement au VEGF total.

Peu d'études ont été faites sur l'origine et les fonctions des protéines VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D et une augmentation possible de leur expression par les monocytes sous l'effet de la CRP ne peut pas être exclue. La présence des formes VEGF-C et VEGF-D dans les lésions athérosclérotiques ainsi que dans les monocytes, les macrophages et d'autres types cellulaires a d'ailleurs été décrite [335].

Une étude complémentaire de l'effet éventuel de la CRP sur l'expression (ARNm et protéines) de chaque forme de VEGF est à envisager et permettrait peut-être d'expliquer la différence des résultats entre les dosages par technique ELISA et l'approche par puces à protéines.

### **III. Les protéines VEGF-A ne sont pas toutes néosynthétisées suite à l'action de la CRP**

L'utilisation de cycloheximide à 10 $\mu$ M permet de réduire mais pas d'abolir l'augmentation protéique du VEGF-A provoquée par la CRP sur les cellules THP-1. Les protéines de VEGF-A libérées dans le surnageant des cultures ne seraient donc pas toutes issues d'une synthèse *de novo*. Environ 50% de ces protéines seraient donc déjà synthétisées et potentiellement stockées à l'intérieur des cellules ou fixées à la surface cellulaire [325, 336, 337] en attente d'un stimulus capable de provoquer leur libération. La CRP ferait donc office de déclencheur pour la néosynthèse mais également pour la libération de VEGF-A dans les cellules THP-1. Il faut malgré tout noter que nous n'avons testé qu'une seule concentration de cycloheximide. Une étude dose-réponse serait alors nécessaire afin de pouvoir conclure définitivement sur ce point.

Des expériences d'immuno-histochimie pourraient également être envisagées à partir de lignées cellulaires THP-1 mises en culture avec ou sans CRP afin de localiser le VEGF-A. Nous pourrions ainsi déterminer si le VEGF-A est stocké dans les cellules à l'intérieur de granules, s'il est fixé à la surface des cellules ou bien les deux. Il serait également possible d'effectuer des tests ELISA de façon cinétique en stimulant les cellules avec la CRP pendant 15 mn, 30 mn, 1h, 2h 4h, 6h etc et mesurer le VEGF-A relargué. Cette approche nous permettrait de mettre en évidence s'il existe, un relargage de VEGF-A très précoce (qui ne pourrait donc pas être dû à une néosynthèse d'ARNm/de protéines) qui serait ensuite suivi d'une néosynthèse et excrétion.

Une étude supplémentaire pourrait porter sur la régulation de la biodisponibilité du VEGF-A par la CRP. Nous pourrions ainsi observer si la CRP peut induire le clivage des formes du VEGF-A fixées à la matrice extracellulaire en favorisant l'action d'une ou plusieurs protéines comme par exemple les MMPs.

#### **IV. L'action de la CRP sur la synthèse de VEGF-A est concentration-dépendante**

L'augmentation de la synthèse en VEGF-A est CRP concentration-dépendante. En effet, nous observons pour les cellules THP-1 une augmentation d'expression environ deux fois supérieure pour une concentration en CRP de 25µg/mL par rapport à 2,5µg/mL et ceci quelque soit le type de CRP utilisé (purifiée ou recombinante). Cette différence est observée au niveau du pic d'expression en ARNm du VEGF-A mais également de part et d'autres (1H30 et 6H). Cet effet concentration-réponse est également retrouvé au niveau protéique avec un facteur assez proche. Les deux concentrations en CRP utilisées dans notre étude sont associées à un risque modéré (2,5µg/mL) et élevé (25µg/mL) de développer un événement cardiovasculaire. Il apparaît donc qu'une association pourrait exister entre risque cardiovasculaire élevé et angiogénèse accrue. Il a d'ailleurs été démontré que le VEGF détecté dans les zones adjacentes aux microvaisseaux issus des vasa vasorum peut augmenter leur perméabilité et induire leur rupture [336].

#### **V. Effets des contaminants des solutions de CRP**

##### **V.a L'azide de sodium**

Nous avons testé l'effet de l'azide de sodium sur la synthèse de VEGF-A aux concentrations équivalentes à celles indiquées dans les préparations de CRP utilisées. Que ce soit en RT-PCR ou en dosage ELISA, aucune variation statistiquement significative de la synthèse de VEGF-A liée à l'azide de sodium n'a été mesurée. De plus, les effets de la CRP débarassée de son azide de sodium après passage sur colonne sont similaires à ceux observés avec la CRP sans purification. Dans notre cas, l'azide de sodium contenu dans les solutions de CRP n'est pas responsable des effets observés sur la synthèse de VEGF-A. Doronzo et al. ont également démontré une absence d'effet de ce stabilisateur sur la synthèse et la libération de MMP-2 par la CRP dans des cellules musculaires lisses [338]. L'azide de sodium n'est donc pas systématiquement responsable des effets observés lors de l'utilisation de solutions de CRP commerciales. Son implication semble donc dépendre du type cellulaire utilisé et des cibles étudiées.

### **V.b Les endotoxines**

La relation entre l'augmentation de synthèse du VEGF-A et certaines endotoxines comme le LPS par l'intermédiaire du récepteur CD14 a été largement documentée dans les monocytes/macrophages et les cellules monocytaires THP-1 [339-341]. La présence possible d'endotoxines dans les solutions de CRP utilisées lors de notre étude a donc nécessité un certain nombre d'expériences de contrôle. Les solutions de CRP commerciales purifiées sur colonne (Biospin columns) puis traitées à la polymyxine B, un chélateur d'endotoxines, activent la synthèse de VEGF-A de la même manière que la CRP non traitée. Les endotoxines potentiellement présentes dans les solutions de CRP utilisées n'ont donc aucun rôle significatif dans l'augmentation de synthèse du VEGF-A observée ici. Ceci est confirmé par l'absence d'activation de la voie p38MAPKinase lors de notre étude, voie empruntée lors de l'augmentation de la synthèse du VEGF-A dans des macrophages traités au LPS [342].

### **V.c Les immunoglobulines**

Seule la solution de CRP purifiée peut présenter ce type de contaminants. Cette CRP étant isolée à partir de plasma humain, la présence d'immunoglobulines et d'autres éléments plasmatiques après purification est toujours possible. Il a été reporté que les effets de la CRP purifiée pouvaient être dues aux immunoglobulines contaminantes [52, 57]. La CRP recombinante est, quant à elle, obtenue par génie génétique chez *Escherichia coli*. Son origine limite donc de manière significative la présence d'immunoglobulines dans les solutions commerciales. L'utilisation conjointe des deux types de CRP et les résultats similaires observés nous permettent donc d'exclure un possible effet des immunoglobulines sur l'augmentation de l'expression du VEGF-A par la CRP purifiée.

## **VI. Les voies de signalisation activées par la CRP**

Une étude pharmacologique avec différents inhibiteurs nous a permis de définir les voies de signalisation activées par la CRP lors de l'augmentation de la synthèse en VEGF-A pour les cellules THP-1.

L'utilisation d'un inhibiteur de la PI3-Kinase (Ly290042) entraîne une baisse significative de la synthèse du VEGF-A en ARNm et en protéines induite par la CRP. En aval de la PI3-kinase dans la cascade de phosphorylation, plusieurs voies sont susceptibles d'être activées : la voie Akt, la voie de la protéine MEK et celle de la p38MAPKinase. L'augmentation du VEGF-A sous l'action de la CRP est totalement annulée avec l'ajout d'un inhibiteur de l'activation de la protéine MEK (PD98059 à 10 $\mu$ M). Par ailleurs, ni SB202190 à 10 $\mu$ M (inhibiteur spécifique des isoformes p38 $\alpha$  et p38 $\beta$ ), ni SB203580 (inhibiteur de la stimulation de la p38MAPKinase pour la MAPKAPK2) à la même concentration ne parviennent à réduire significativement la synthèse de VEGF-A. L'approche en Western-blot nous a permis de confirmer pour les cellules THP-1 les données en RT-PCR et en ELISA en démontrant une activation de la voie PI3Kinase par la mise en évidence d'une phosphorylation de la protéine Akt, de la voie ERK mais pas de la voie p38MAPKinase par la CRP. L'absence de signal de phosphorylation de la p38MAPKinase observé en Western-blot n'est pas due à un problème technique puisque l'ajout de 100ng/mL de LPS, connu pour activer cette voie, nous permet de visualiser cette phosphorylation.

Nos résultats sont confortés par la mise en évidence par d'autres équipes de l'implication de la voie PI3-kinase dans la synthèse du VEGF-A dans d'autres types cellulaires comme certaines cellules tumorales [343] ou les kératinocytes [344]. L'utilisation de la voie MEK-ERK a également été documentée pour des cellules tumorales [343, 345], des cellules musculaires lisses [346, 347] ou des cellules endothéliales [348]. L'activation de la voie p38MAPKinase semble être type cellulaire-dépendant et activateur-dépendant pour la synthèse de VEGF-A. Elle est empruntée lors de la synthèse de VEGF-A par des macrophages traités au LPS [349], par les cellules de Leydig activées par des gonadotropines [350] ou encore par certaines cellules tumorales après contact avec l'IL-1 $\beta$  [345] mais n'est pas impliquée dans les cellules musculaires lisses traitées avec de l'acide rétinoïque ou du PDGF [346, 347]. Même si l'activation par la CRP de la voie p38MAPKinase a été observée dans les PBMC [273], nous ne l'avons pas mise en évidence dans les cellules monocytaires THP-1. Le signal pourrait donc provenir des lymphocytes.

Nous avons pu également démontrer que la CRP permet une activation de la voie NF $\kappa$ B rejoignant ainsi l'étude de l'équipe de Kiriakidis qui associe activation de cette voie et synthèse de VEGF-A dans des macrophages [351]. La régulation par la voie NF $\kappa$ B semble donc s'effectuer de manière indirecte puisqu'aucun élément de réponse à ce facteur de transcription n'est présent dans le promoteur du gène VEGF-A [352].

## VII. Augmentation de la synthèse du VEGF-A par liaison de la CRP aux récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa

L'activation des voies PI3-Kinase, MEK et NF $\kappa$ B dans les cellules monocytaires THP-1 suggère que la CRP peut activer la synthèse du VEGF-A par l'intermédiaire des récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa présents à la surface de ces cellules [353]. Comme décrit plus haut, la CRP est capable de se fixer sur ces deux types de récepteurs et les activations des voies NF $\kappa$ B [354], PI3kinase [54] et MEK-ERK [355] ont été décrites en aval de ces récepteurs. Williams et al. ont déjà démontré une augmentation de l'expression de la MMP-1 par la CRP par l'intermédiaire des récepteurs Fc $\gamma$ RII [277] et il semble donc tout à fait possible que la régulation du VEGF-A se produise d'une manière similaire.

Nos expériences préliminaires sur les cellules THP-1 indiquent que la CRP régule l'expression du VEGF-A par l'intermédiaire des récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa. En effet, il existe une compétition de fixation aux récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa entre la CRP et les anticorps anti-CD64 et anti-CD32. La présence conjointe de la CRP et des anticorps anti-CD64 ou anti-CD32 a pour conséquence d'inhiber l'augmentation de l'ARNm du VEGF-A induite par la CRP seule, sans doute par encombrement stérique. Cette mesure a été effectuée après 3 heures de traitement car c'est à ce moment que l'on a observé le pic d'expression du VEGF-A en présence de CRP. La faible augmentation de l'expression en ARNm du VEGF-A observée avec l'utilisation d'un contrôle isotypique anti-CD64 peut alors être la résultante d'une fixation de cet anticorps par sa partie Fc au récepteur Fc $\gamma$ RI. Une telle observation a déjà été décrite avec des complexes immuns contenant des LDL oxydées capables de se fixer aux Fc $\gamma$ RI et d'activer la voie MAPKinase à l'aide des cellules THP-1 [356].

Nos expériences menées en FACS confirment que la CRP utilise effectivement ces récepteurs car la présence de CRP diminue la quantité d'anticorps anti-CD64 ou anti-CD32 fixés aux récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa des cellules THP-1.

La CRP augmente donc la synthèse du VEGF-A en se fixant aux récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa, ce qui se traduit par une activation des voies de signalisation PI3-Kinase, MEK et NF $\kappa$ B dans les cellules THP-1. Ces résultats concordent avec de précédents travaux portant sur les conditions de fixation et d'activation de la CRP sur ces deux types de récepteurs [59-61, 83].



Des études complémentaires seront nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. Une première approche pourrait consister à bloquer ces récepteurs par exemple par ARN interférence et suivre l'expression du VEGF-A sous l'action de la CRP.

### **VIII. Autres récepteurs impliqués ?**

Il existe malgré tout un paramètre que nous n'avons pas contrôlé dans notre étude et qui concerne les LDL contenus dans les milieux de culture utilisés lors des expériences avec les monocytes et les cellules THP-1. La CRP est capable de se fixer aux VLDL et aux LDL [91], plus particulièrement aux LDL oxydées ou modifiées de manière enzymatique [70, 92]. Ces LDL seront captées par les récepteurs CD36 présents à la surface des monocytes/macrophages. La fixation au récepteur CD36 peut alors induire et réguler la cascade du complément mais également activer la fonction phagocytaire des macrophages et favoriser leur transformation en cellules spumeuses. D'autre part, les LDL oxydées sont capables d'augmenter l'expression et la sécrétion de VEGF-A par les cellules THP-1 et par les cellules endothéliales par l'intermédiaire de PPAR $\gamma$  ou de ces activateurs [357] et par les macrophages par une voie p38MAPKinase dépendante [349]. Même si la voie p38MAPKinase n'est pas activée dans notre cas, nous ne pouvons pas exclure complètement, à notre niveau d'étude, une possible interaction entre la CRP et les LDL dans l'augmentation de la synthèse de VEGF-A.

L'utilisation de sérums à faible teneur lipidique comparé à des sérums normaux permettrait de répondre à cette question. De même, l'utilisation d'inhibiteurs de PPAR $\gamma$  dans les cellules THP-1 traitées avec la CRP pourrait alors nous permettre d'impliquer ou non les LDL dans l'augmentation de la synthèse de VEGF-A observée.

### **IX. Conclusion et perspectives**

Nous avons mis en évidence un nouveau rôle pour la CRP dans les cellules monocytaires (THP-1). La CRP est en effet capable d'augmenter l'expression (ARNm et protéines) du VEGF-A par l'intermédiaire de la voie PI3-Kinase, AKT et MEK-ERK en se fixant aux récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIa.

Il nous reste cependant à explorer plus en détail la voie empruntée en aval de la phosphorylation de la protéine AKT. La voie NFκB, également activée, peut participer à cette synthèse.

Ces données impliquent donc la CRP dans un nouveau rôle pro-angiogénique, potentiellement activateur de la néovascularisation, et ce, par l'intermédiaire de la surexpression du VEGF-A par les cellules monocytaires.

Vu les conséquences néfastes de la néovascularisation sur l'instabilité de la plaque d'athérome, néovascularisation illustrée par la formation de *vasa vasorum*, il serait nécessaire de mieux comprendre les mécanismes liant le VEGF-A à la formation des néovaisseaux et le degré d'implication de la CRP dans ce mécanisme.

Une première approche consiste à considérer directement la CRP comme cible. Il a déjà été démontré que les statines, connues pour leurs effets hypocholestérolémiants, diminuaient les taux plasmatiques de CRP. L'augmentation de la synthèse de VEGF-A étant CRP dose-dépendante, il serait intéressant de voir si les statines peuvent également diminuer l'augmentation du taux de VEGF-A induite par la CRP. Dans le cas d'une réponse positive, un traitement par statines lors de la phase précoce de l'athérosclérose pourrait présenter un nouveau moyen de contrôle de la néovascularisation et ainsi prévenir l'évolution de la plaque d'athérome.

Une seconde approche impliquant la régulation de la synthèse et des effets du VEGF-A avec des agents anti-angiogéniques a déjà été testée. Dans le cas de tumeurs, l'utilisation de différents traitements anti-VEGF avec ou sans complément de chimiothérapie ou radiothérapie ont permis une régression des tumeurs [358, 359]. L'action, sur le VEGF, d'inhibiteurs de l'angiogénèse a par ailleurs été décrite. La protéine suppressive de tumeurs p53 réduit la production de VEGF et favorise la sécrétion de thrombospondine-1, un inhibiteur de l'angiogénèse qui module diverses fonctions endothéliales [360, 361]. Dans la pathologie de l'athérosclérose, l'angiostatine et l'endostatine inhibent la prolifération des cellules endothéliales, l'angiogénèse et la croissance tumorale [326]. D'autres médiateurs solubles montrent une ou plusieurs actions inhibitrices sur les fonctions endothéliales [362].

Il est également possible de déterminer certaines cibles potentielles lors des phénomènes observés en aval de la synthèse du VEGF et qui favorisent la formation ou l'instabilité de la plaque d'athérome. Les interactions entre VEGF et MMP-9 méritent donc

d'être étudiées plus en détail. En effet, l'implication du VEGF et de MMP-9 dans la formation et l'instabilité de la plaque d'athérome n'est plus à démontrer. Une surexpression parallèle du VEGF et de MMP-9 a même été décrite dans les cellules inflammatoires au niveau des lésions de plaques néovascularisées [363]. De plus, le VEGF induit l'expression de MMP-9 qui va provoquer la dégradation de la membrane basale et diminuer l'expression de ses inhibiteurs TIMP-1 et TIMP-2, ce qui permettra la migration des cellules endothéliales [364] et donc l'initiation de la formation de la plaque d'athérome.

Avant de conclure quant à la probabilité du VEGF-A en tant que cible potentielle thérapeutique, il faudra tout d'abord tenter de généraliser les résultats obtenus en déterminant si les observations effectuées pour les cellules THP-1 sont transposables à d'autres lignées mais surtout aux monocytes humains et aux neutrophiles *ex-vivo*. Nous avons déjà pu vérifier l'augmentation de l'expression en ARNm du VEGF-A dans les monocytes mais les études au niveau protéique sont encore à confirmer. Par ailleurs, les premières études réalisées dans notre laboratoire sur la lignée promyélocytaire HL-60 montrent que la CRP augmente également la synthèse et la sécrétion de VEGF-A par une voie de transduction de signal PI3K-MEK-ERK dépendante et p38MAPKinase indépendante.

Notre seconde approche sera de vérifier que le VEGF-A produit par les monocytes et les cellules THP-1 a bien une action sur les cellules environnantes et en particulier sur les cellules endothéliales. En effet, les inducteurs de l'angiogénèse, dont le VEGF, peuvent agir directement sur les cellules endothéliales ou indirectement par l'intermédiaire des monocytes, des mastocytes ou des lymphocytes T et induisent la progression de la lésion athéromateuse [365, 366]. Le VEGF peut induire 4 types de réponse sur les cellules endothéliales : une migration cellulaire, un effet anti-apoptotique, leur prolifération et une augmentation de la perméabilité membranaire [367].

A l'aide de systèmes de co-cultures directes ou indirectes entre cellules THP-1 ou monocytes (stimulés par la CRP ou non) et cellules endothéliales, il serait possible de déterminer quels effets sont engendrés par le VEGF-A sur les cellules endothéliales (synthèse de TF, MMP-9, prolifération cellulaire...) et leurs implications dans l'athérosclérose. Les protéines et l'étude des voies de signalisation impliquées pourraient aboutir à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques en aval du VEGF. Le contrôle de ces cibles potentielles permettrait de réguler la néovascularisation excessive observée lors de la pathologie de l'athérosclérose.

A partir des études en co-cultures, il sera également possible de vérifier si le VEGF-A libéré peut être responsable de la transmigration des cellules monocytaires à travers la barrière endothéliale en suivant directement la transmigration à l'aide de monocouches de cellules endothéliales et/ou par la mise en évidence de la présence d'intégrines à la surface des cellules monocytaires [368].

La découverte de cette nouvelle régulation par la CRP ouvre donc un terrain de recherche très vaste et très prometteur dans la lutte contre l'athérosclérose et plus particulièrement lors de sa phase précoce.

## **ÉTUDE N° 2 : Implication de la protéine C-réactive dans l'expression des métalloprotéases impliquées dans l'évolution de la plaque d'athérome**

Les MMP se divisent en différentes familles classées selon la matrice qu'elles sont susceptibles de dégrader. On trouve ainsi les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11), la matrilysine (MMP-7), la métalloélastase (MMP-12) et les MT-MMP (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-17). Leurs activités diverses ont été décrites dans le développement des organes, la guérison de lésions, l'inflammation [369]. Elles ont également un rôle dans les cancers et lors des pathologies cardiovasculaires [201]. Depuis la transmigration des monocytes et des lymphocytes à travers la barrière endothéliale jusqu'à la rupture de la plaque d'athérome, on observe l'intervention des métalloprotéinases matricielles (MMP) à de nombreux stades du processus athéromateux.

Dans un premier temps, certaines MMP favorisent le recrutement des cellules inflammatoires. Les MMP-9 produites par les leucocytes leur permettent de traverser la membrane basale sous-endothéliale et les barrières de matrice extracellulaire afin de pénétrer dans les tissus [370].

Les MMP-3, MMP-9, MMP-10 et les MT-MMP produites par les leucocytes et les cellules endothéliales interviennent également dans la migration et la prolifération de ces dernières en participant à la dégradation de la membrane basale [371]. Ces métalloprotéases favorisent ainsi l'angiogénèse et la néovascularisation lors de la genèse de la plaque.

Les MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 favorisent la diminution des interactions des cellules musculaires lisses avec la matrice extracellulaire facilitant ainsi la migration de ces cellules [238]. Une accélération de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires a été démontrée par stimulation de la MMP-9 sous l'action du VEGF [372]. La prolifération des cellules musculaires lisses [373, 374] et leur apoptose [375] peut également être induite par ces MMP. Une surexpression de TIMP-1, un inhibiteur des MMP, dans les cellules musculaires lisses de rat inhibe la prolifération et la migration de ces cellules [376].

La phase terminale du processus athéromateux est également sous le contrôle des MMP avec un rôle dans la rupture de la plaque [92, 377]. Il existe une très forte surexpression locale des MMP dans les régions vulnérables de la plaque [194]. La dégradation protéolytique

de la matrice provoque un amincissement de la plaque avec la présence de grandes quantités de cellules spumeuses dérivées de macrophages [378, 379]. Parmi toutes les MMP, la MMP-9 semble la plus impliquée dans l'ensemble de ces régulations et son expression est augmentée parallèlement à celle du VEGF dans les cellules inflammatoires au niveau des lésions de la plaque néovascularisée [363].

Les MMP-9 ou gélatinases B appartiennent à une famille d'endopeptidases zinc dépendant qui sont soit secrétées, soit liées aux protéines "core" des chondroïtines sulfate des protéoglycanes de certaines cellules dont la lignée THP-1 [380]. Il a également été mis en évidence la formation d'un complexe entre la proMMP-9 et la lipocaline qui protégerait la MMP-9 d'une dégradation de son pro-domaine régulant ainsi l'activité de la MMP-9 [381]. Leur activation s'effectue *in vivo* par clivage de leur pro-domaine par d'autres protéases comme la plasmine ou les MT-MMP. Il peut également se produire un phénomène d'autocatalyse du pro-domaine suite à un changement conformationnel de la protéine [201]. *In vitro*, d'autres protéases telles que la trypsine, la chymase, la kallikréine tissulaire ainsi que les MMP-2, MMP-3, MMP-7 et MMP-13 sont également capables d'activer la proMMP-9 [382]. Les MMP-9 actives ont le potentiel de dégrader certains composants de la matrice extracellulaire (collagène de type IV, laminine, gélatine, élastine, fibronectine, et protéoglycanes) [383, 384].

## **I. Corrélation entre la CRP et l'augmentation de proMMP-9**

Nos premiers résultats ont démontré que la CRP purifiée à une concentration de 25µg/mL augmentait l'ARNm MMP-9 dans les PBMC. Cette augmentation de l'ARNm conduit à une sécrétion protéique de la proMMP-9, forme inactive de la MMP-9, qui est incapable de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Cette régulation de la pro-forme de MMP-9 par la CRP a déjà été mise en évidence dans des cellules HUVEC [257].

D'autre part, nous n'observons aucune variation de proMMP-9 dans les monocytes isolés. Nous ne pouvons pas exclure qu'une possible augmentation se produise avant ou après notre temps de mesure mais à ce stade, nous pouvons supposer que l'augmentation de synthèse de MMP-9 des PBMC peut être due soit à une réponse des lymphocytes seuls, soit à la résultante d'interactions lymphocytes, monocytes. Une interaction grâce aux récepteurs CD40 et CD40L a d'ailleurs été décrite entre les deux types cellulaires et semble responsable de l'induction de l'expression de la MMP-9 par les monocytes [385]. Dans ce cas, l'activation

des lymphocytes par une cellule présentatrice d'antigène ou par un agent externe comme la CRP pourrait induire la synthèse de CD40L à leur surface. Ces lymphocytes deviendraient alors capables d'activer les monocytes porteurs du récepteur CD40 lors de contacts directs cellule-cellule et d'induire la synthèse de MMP-9 par les monocytes. L'interaction directe entre monocytes et lymphocytes par CD40-CD40L pourrait donc être une étape essentielle dans la synthèse de MMP-9 que nous avons observée pour les PBMC. Des études complémentaires portant sur l'expression de CD40L par les lymphocytes traités avec la CRP et sur l'expression de MMP-9 par les monocytes isolés sous l'action de CD40L pourraient apporter une première réponse à cette hypothèse.

Nous observons également, contrairement aux monocytes isolés, une augmentation de l'expression en ARNm MMP-9 et de l'excrétion de proMMP-9 pour la lignée THP-1 avec les deux types de CRP et aux 2 concentrations testées (2,5µg/mL et 25µg/mL). Il est probable que la synthèse de proMMP-9 par les monocytes isolés existe mais à des temps plus précoces ou plus tardifs que ceux mesurés dans nos expériences.

Les cellules THP-1 sont issues d'un clone monocyttaire humain de leucémie aiguë et du fait de leur caractère cancéreux, ces cellules synthétisent de grandes quantités de proMMP-9, contrairement aux cellules saines que sont les monocytes.

La forte augmentation de proMMP-9 observée pour ces cellules contrairement aux monocytes peut également s'expliquer par l'existence, pour les THP-1, de liaisons entre les proMMP-9 et les protéines "core" des chondroïtines sulfate des protéoglycanes. Cette forme de proMMP-9 serait relarguée par un clivage calcium-dépendant [380]. Une telle observation n'a pas été décrite pour les monocytes. La CRP pourrait alors être responsable d'un flux calcique qui permettrait le relargage des protéines proMMP-9 des THP-1. Différentes mesures dans le temps du calcium intra et extracellulaire avec des monocytes et des cellules THP-1 traités avec la CRP pourraient peut-être alors nous permettre de définir un nouveau mode de régulation de la CRP sur la libération de la proMMP-9.

## **II. Implication de la CRP dans la régulation MMP-9/proMMP-9**

### **II.a Approche à l'aide des PBMC**

Avec les PBMC, une diminution de la concentration extracellulaire en MMP-9 active est mesurée, ce qui résulte d'une interaction cellulaire monocytes, lymphocytes ou des

lymphocytes seuls. En effet, aucune variation de la concentration en MMP-9 active n'est mesurée pour les monocytes seuls. Des expériences complémentaires à des temps de culture plus précoces et plus tardifs devront malgré tout être effectuées afin de confirmer si la CRP est capable ou non de réguler la synthèse de MMP-9 ou la balance MMP-9/proMMP-9 dans les monocytes isolés. Gough et al. ont démontré chez des souris que les macrophages présents dans les lésions d'athérosclérose avancées sécrétaient préférentiellement la pro-forme de MMP-9 et non la forme active [386]. Pour les PBMC, cette baisse de la concentration en MMP-9 active pourrait être la résultante d'une diminution de la quantité de protéines MMP-9 totales, d'une dégradation des protéines MMP-9 actives dans le milieu extracellulaire mais également à une augmentation d'inhibition des MMP-9 actives par fixation à leurs inhibiteurs naturels TIMP-1, TIMP-2 et  $\alpha$ 2-M. La régulation aboutissant à la diminution des protéines MMP-9 active s'effectue à un niveau post-traductionnel ou est liée à une diminution des enzymes comme les MT-MMP qui clivent proMMP-9 puisque nous observons une augmentation en ARNm de MMP-9 sous l'effet de la CRP. Les mesures effectuées par ELISA dans les surnageants des cultures de PBMC traitées 24 heures avec la CRP ne montrent aucune variation des MMP-9 totales (données non présentées). Ce n'est donc pas une inhibition de la synthèse d'ARNm MMP-9 qui est responsable de la diminution des concentrations de MMP-9 active.

Les inhibiteurs tissulaires de la MMP-9, TIMP-1 et TIMP-2, ne semblent pas être régulés par la CRP pour les PBMC. Ces deux protéines sont malgré tout présentes dans le milieu extracellulaire et capables de fixer les proMMP-9 libérées, pouvant ainsi moduler l'activation de la pro-forme de la MMP-9. Cette absence de changement d'expression de TIMP-1 et TIMP-2 par la CRP peut tout de même correspondre à une forme de régulation. Si aucune néosynthèse de TIMP-1 et TIMP-2 ne se produisait, il s'en suivrait un déséquilibre de la balance MMP/TIMP en défaveur des TIMP si aucune compensation n'existe par les MT-MMP. Les protéines proMMP-9 libérées pourraient alors être clivées pour prendre leur forme active. Nous n'excluons cependant pas une possible régulation de leur expression à des temps plus précoces ou plus tardifs.

Il faut également noter une augmentation de l'expression en ARNm de PAI-2, ce qui laisse penser que la CRP pourrait réguler négativement l'activation de la MMP-9 mais également bloquer la fibrinolyse en inhibant la synthèse du plasminogène en plasmine dans la paroi artérielle. Nous spéculons que la CRP pourrait être responsable d'un "priming" cellulaire favorisant la formation d'un "pool" extracellulaire de proMMP-9 qui serait maintenu dans son état inactif par la surexpression de PAI-2. Afin d'optimiser l'action



dégradatrice des MMP-9 lors de la future activation de ce pool, la synthèse de l' $\alpha$ 2-M, l'inhibiteur plasmatique majeur de la MMP-9, serait diminuée. Des études cinétiques de l'expression de ces différentes protéines régulatrices sous l'effet de la CRP pourraient nous permettre de mieux corréler leur action avec l'activation des protéines proMMP-9.

### **II.a Approche à l'aide des monocytes isolés**

Même si aucune modification de la synthèse de MMP-9 n'a pu être mise en évidence après 12H et 24H de contact avec la CRP, les variations des ARNm PAI-2 et  $\alpha$ 2-M sont conservées dans les monocytes isolés. Il semblerait que la CRP puisse jouer un rôle dans la modulation de cette activation en intervenant directement sur la régulation de la synthèse de certains inhibiteurs de l'activation de la proMMP-9. Aucune variation des ARNm TIMP-1 et TIMP-2 n'a été mise en évidence par notre équipe lors d'expériences parallèles à l'aide de puces à oligonucléotides (résultats non présentés). Il reste cependant à déterminer les niveaux protéiques de PAI-2,  $\alpha$ 2-M, TIMP-1 et TIMP-2 avant de conclure définitivement sur ce point. La CRP pourrait également favoriser la synthèse de la proMMP-9 mais exclusivement dans le cadre d'une coopération cellulaire.

### **III. Régulation de la synthèse de MMP-9 par les voies PI3-Kinase et MEK**

Nous avons pu démontrer que les voies de signalisation PI3-Kinase et MEK sont impliquées dans la synthèse de MMP-9 par la CRP. Pour les PBMC et les cellules THP-1, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie MEK (PD98059 ou U0126) diminue significativement la quantité de proMMP-9 produite. Il en est de même lorsque l'on utilise un inhibiteur de la voie PI3-Kinase (Ly294002). Ces deux voies ont déjà été impliquées dans la sécrétion de MMP-9 par stimulation avec l'IL-1 $\beta$  de cellules issues d'une lignée fibroblastique murine [387], ce qui conforte nos résultats. *A contrario*, la présence d'inhibiteur de la p38MAPKinase (SB203580 ou SB202190) aux concentrations utilisées n'a aucun effet significatif sur les cellules THP-1 et doit être vérifié sur les PBMC. L'ensemble de cette étude des voies de signalisation devra également être étendue aux monocytes isolés.

#### **IV. Effets de l'azide de sodium contenu dans les solutions de CRP sur la synthèse de MMP-9**

Toutes nos expériences démontrant une activation de la synthèse de MMP-9 par la CRP ont été effectuées avant la mise en évidence dans plusieurs études d'une possible action de l'azide de sodium contenu dans les solutions de CRP commerciales sur des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses [259-263]. Même si aucune étude n'a pour le moment attribué les effets de la CRP à l'azide de sodium sur les monocytes et les PBMC, nous avons commencé à vérifier son implication réelle dans nos expériences.

Après retrait de l'azide de sodium d'une solution de CRP purifiée à 25µg/mL, l'augmentation de la quantité d'ARNm de MMP-9 mesurée initialement avec les PBMC est perdue. La même constatation a pu être faite au niveau protéique avec les cellules THP-1 traitées avec la CRP recombinante à 25µg/mL débarrassée de l'azide de sodium. Les effets de l'azide de sodium semblent donc indépendants du type de CRP. Des expériences similaires sur les PBMC avec la CRP recombinante débarrassée de l'azide de sodium ainsi que sur les cellules THP-1 avec la CRP purifiée débarrassée de l'azide de sodium nous conforteraient dans cette hypothèse. Il reste également à vérifier, par dosage ELISA ou par zymographie, si l'azide de sodium agit également sur l'expression protéique de proMMP-9 pour les PBMC. Une seconde confirmation sera à effectuer avec les cellules THP-1 en suivant par RT-PCR si l'azide de sodium est impliqué ou non dans l'augmentation d'expression en ARNm de MMP-9.

Les niveaux de MMP-9 ne variant pas pour les monocytes sous l'effet de la CRP purifiée, nous n'avons pas testé l'implication de l'azide de sodium sur ces cellules. Il semble malgré tout intéressant de l'étudier car si la présence d'azide de sodium peut induire une augmentation de la synthèse en MMP-9 des PBMC, il est donc tout à fait probable que la CRP puisse avoir un effet inhibiteur sur cette même synthèse dans les monocytes. Ce que nous observons dans nos expériences pourrait alors être la résultante de deux phénomènes opposés d'amplitude sensiblement identique à savoir une activation par l'azide de sodium et une inhibition par la CRP.

Des expériences complémentaires seront aussi nécessaires afin de déterminer si les variations de PAI-2 et  $\alpha$ -2M sont dues à la CRP ou à des contaminants. Des données préliminaires semblent faire apparaître que l'azide de sodium n'est pas impliqué dans l'augmentation de la quantité d'ARNm de PAI-2 avec les PBMC. Pour les monocytes isolés,

le retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP semblerait diminuer l'amplitude de l'augmentation de l'ARNm de PAI-2. Des expériences complémentaires nous permettront d'évaluer si cette augmentation reste significative.

Concernant  $\alpha$ -2M, nos premières expériences de contrôle avec les PBMC semblent indiquer que la CRP purifiée, après retrait de l'azide de sodium, n'agisse plus en tant qu'inhibiteur de synthèse de  $\alpha$ -2M mais en tant qu'activateur. L'effet de l'azide de sodium sur l'expression en ARNm de  $\alpha$ -2M avec les monocytes isolés semble beaucoup plus modéré d'après nos premières expériences. L'absence d'azide de sodium dans la solution de CRP purifiée provoquerait une diminution accrue de l'expression en ARNm de  $\alpha$ -2M comparée à celle mesurée avec la CRP purifiée commerciale.

Si ces données sont confirmées, nous pourrions à nouveau avancer l'hypothèse d'une coopération cellulaire entre lymphocytes et monocytes qui aboutirait à une surexpression de PAI-2 mais également de  $\alpha$ 2-M afin d'établir un équilibre entre synthèse de MMP-9 activées et contrôle de leur libération.

Il sera malgré tout nécessaire de confirmer toutes ces observations avec un plus grand nombre d'échantillons pour les deux types cellulaires et étendre ces contrôles aux cellules THP-1. Des études cinétiques en ARNm et en protéines devront également compléter les résultats.

## V. Conclusion

Même si nos premières expériences ont démontré une implication de la CRP dans la synthèse et la sécrétion de MMP-9 pour les PBMC et les cellules THP-1, il s'est ensuite avéré que l'effet observé n'était pas dû à la CRP mais à l'azide de sodium présent dans les solutions commerciales utilisées. Tous les résultats obtenus à partir de cette conclusion initiale et présentés ci-dessus sont donc également remis en cause.

Cette partie de notre étude s'est donc soldée par une réponse négative en ce qui concerne une probable implication de la CRP dans la synthèse de MMP-9 pour les PBMC et les cellules THP-1.

Cependant, pour les monocytes isolés, des expériences complémentaires nous permettront de conclure quant à un effet inhibiteur ou non de la CRP sur l'expression de la MMP-9. Les quelques études sur l'implication de la CRP dans la synthèse de MMP-9 parues ces dernières années n'ont bénéficié d'aucun contrôle sur le caractère effectif et potentiel des

contaminants présents dans les solutions de CRP commerciales utilisées [257]. Nous ne pouvons donc pas nous appuyer sur ces études. Seules deux études récentes utilisant des solutions de CRP sans azide de sodium ni endotoxines ont permis de démontrer que la CRP induisait la production de MMP-9 dans les macrophages et les PBMC [308, 309].

Même si la synthèse de MMP-9 ne semble pas être sous l'influence de la CRP, il semble intéressant d'approfondir l'implication réelle de la CRP sur les systèmes de régulation de la protéine MMP-9 en suivant, en particulier, les expressions dans le temps de PAI-2 et  $\alpha$ -2M.

## ÉTUDE N° 3 : Protéine C-réactive et implication dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires

L'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-6 ont une large panoplie d'action lors du phénomène pro-inflammatoire, de la mise en place de la défense face à un pathogène aux lésions tissulaires [218]. Ces cytokines pro-inflammatoires sont très largement impliquées dans le processus athéromateux et leur contribution a été largement documentée [160, 218]. Elles favorisent également la synthèse de CRP [10] ce qui peut maintenir un environnement inflammatoire au site de la lésion.

Nos premiers résultats ont démontré que la solution commerciale de CRP purifiée à 25 $\mu$ g/mL augmentait la synthèse des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$  dans les PBMC. Cette augmentation a été retrouvée dans les monocytes isolés pour les ARNm de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  ainsi que l'IL-6. Contrairement aux PBMC, la quantité d'ARNm du TNF $\alpha$  diminue en présence de CRP dans les monocytes isolés. Il est possible que le temps d'exposition de 12H à la CRP ne corresponde pas véritablement au pic d'expression du TNF $\alpha$  pour les monocytes isolés. Le choix de ce temps d'étude a été fait à partir des résultats de cinétique d'expression en ARNm sur les monocytes d'un seul patient et le fait de ne pas retrouver l'augmentation en ARNm de TNF $\alpha$  lors de notre étude nous pousse à émettre des doutes sur la valeur représentative de notre cinétique d'expression.

Des expériences cinétiques complémentaires à partir de monocytes d'autres patients pourraient permettre de conclure quant au pic d'expression en ARNm du TNF $\alpha$ . La différence d'expression en ARNm du TNF $\alpha$  observée ici entre les PBMC et les monocytes sous l'effet de la CRP peut également être due à une interaction entre lymphocytes et monocytes. La diminution en ARNm du TNF $\alpha$  observée dans les monocytes peut être due à une dégradation des ARNm existants et peut être pas à une véritable diminution de synthèse. Une collaboration entre monocytes et lymphocytes sous l'effet de la CRP serait alors nécessaire pour augmenter la quantité d'ARNm du TNF $\alpha$  et/ou stabiliser ces ARNm.

Une augmentation de l'ARNm pour l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  a pu être confirmée pour les cellules THP-1 avec les deux types de CRP commerciale (purifiée et recombinante) et pour les deux concentrations testées (2,5 $\mu$ g/mL et 25 $\mu$ g/mL). L'ARNm de l'IL-6 n'est pas mesurable pour les cellules THP-1 quelque soit la technique et le traitement utilisé. Nous

pouvons cependant exclure tout problème technique puisque les amorces utilisées en RT-PCR quantitative sont identiques dans toutes nos expériences et qu'aucun polymorphisme du gène de l'IL-6 n'a été décrit entre les trois types cellulaires utilisés.

Les trois types cellulaires présentent une similarité quant à l'augmentation de la quantité d'ARNm observée pour l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  impliquant un effet activateur de la CRP pour ces deux cytokines et rejoignent quelques études anciennes qui ont démontré une influence de la CRP sur la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6 avec des monocytes et des macrophages alvéolaires [272, 388]. Ces conclusions ainsi que nos premiers résultats ont été effectués avant la mise en évidence de l'implication de l'azide de sodium ainsi que des endotoxines dans certains effets attribués initialement à la CRP.

Nos expériences de contrôle effectuées avec les cellules THP-1 démontrent clairement un effet de l'azide de sodium sur l'augmentation de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$ . L'activation de cette augmentation en ARNm de l'IL-1 $\beta$  dans les PBMC a également été associée à la présence d'azide de sodium. L'augmentation initialement observée et attribuée à la CRP est donc partiellement due à la présence d'azide de sodium dans la solution commerciale de CRP. Il reste néanmoins à tester l'impact de l'azide de sodium sur la quantité d'ARNm de l'IL-1 $\alpha$  dans les trois types cellulaires de notre étude, de l'IL-1 $\beta$  dans les monocytes ainsi que du TNF $\alpha$  dans les PBMC et les monocytes.

Par ailleurs, une implication des endotoxines a pu être mise en évidence dans les variations en ARNm IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  obtenues en présence de CRP avec les cellules THP-1. Cette observation reste CRP type-dépendant et cytokine-dépendante. En effet, pour tous les lots utilisés, la solution de CRP recombinante contenait davantage d'endotoxines contaminantes que la solution de CRP purifiée. L'utilisation de polymyxine B inhibe totalement l'augmentation en ARNm IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  initialement observée avec la CRP recombinante alors qu'une dose similaire de polymyxine B atténuée mais n'annule pas totalement l'effet de la CRP purifiée. Les endotoxines présentes dans les solutions de CRP ne semblent avoir qu'un effet partiel sur l'expression du TNF $\alpha$  puisque la présence de polymyxine B n'inhibe pas totalement l'augmentation d'expression en ARNm quelsoit la CRP utilisée. Ces résultats concordent avec les travaux de nombreuses équipes qui ont décrit une implication des endotoxines sur l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules THP-1. L'ajout de LPS sur des cellules THP-1 est capable d'activer la synthèse de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ , indépendamment de tout autre facteur [389].

Ces dernières expériences contredisent donc nos premiers résultats. L'augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  n'est donc pas due à la CRP mais à l'azide de sodium et aux endotoxines présents dans les solutions commerciales de CRP.

Malgré tout, des expériences complémentaires semblent indispensables puisque Nabata et Al. viennent de démontrer que la CRP sans azide de sodium et débarrassée des endotoxines activait la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans les PBMC [308].

## Conclusions et perspectives générales

Nous avons démontré dans un premier temps que la CRP, en plus de ses propriétés de marqueur indépendant du risque cardiovasculaire, avait un véritable rôle effecteur sur les PBMC, les monocytes et les cellules THP-1. La CRP semblait responsable de l'augmentation de la synthèse et de la libération de cytokines pro-inflammatoires favorisant ainsi le maintien d'un cadre inflammatoire. Après des expériences de contrôle, il s'est avéré que les effets observés étaient dûs pour beaucoup à la présence d'endotoxines et d'azide de sodium dans les solutions de CRP utilisées. Ces données sont en contradiction avec une récente étude effectuée sur des PBMC et des cellules THP-1 qui conclut à un effet positif de la CRP sur la synthèse d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  [308]. Des expériences complémentaires devront être effectuées car les temps d'incubation des cellules avec la CRP entre les deux équipes sont différents.

Nous avons été confrontés à la même problématique concernant l'expression de MMP-9. Une première série d'expériences avec les solutions de CRP commerciales avaient démontré une activation de l'expression de l'ARNm et de la libération protéique de MMP-9 par les PBMC et les cellules THP-1. Ces augmentations étaient en fait le résultat de la présence d'azide de sodium dans les solutions de CRP. Pour les monocytes, nous n'avons pas observé de modifications concernant MMP-9 mais l'impact de l'azide de sodium sur cette observation reste à vérifier. Ces premiers résultats s'opposent à de récentes parutions démontrant une augmentation protéique de MMP-9 totales ou actives provoquée par la CRP avec l'utilisation de PBMC, de cellules THP-1 ou de macrophages de rats [308, 309]. L'extension de nos expériences de contrôle reliant les effets de l'azide de sodium et des endotoxines sur l'expression et la libération de MMP-9 et ce, avec les mêmes temps d'incubation en présence de CRP que ceux utilisés dans ces études, devrait nous permettre de conclure définitivement sur la réelle implication de ces deux molécules dans notre étude.

La première de nos études montrant une absence d'implication de l'azide de sodium et des endotoxines lors d'un traitement avec les solutions de CRP commerciales concerne l'augmentation de la quantité d'ARNm et de protéines du VEGF-A dans les cellules THP-1. Cette augmentation n'a été mesurée qu'au niveau transcriptionnel dans les monocytes isolés et l'association protéique reste à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons. La favorisation de la néovascularisation de la plaque envisagée avec la surexpression du VEGF-A par la CRP dans les monocytes (et les cellules THP-1) permettrait alors l'afflux de leucocytes supplémentaires et amplifierait, proportionnellement au nombre de néovaisseaux,



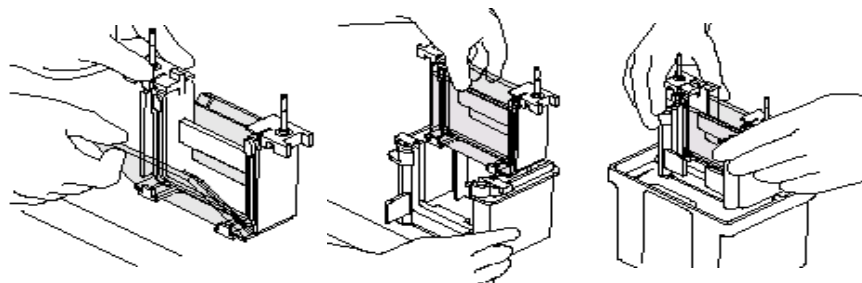
le nombre de leucocytes candidats à la transmigration. Cette néovascularisation augmentant avec l'évolution de la plaque jusqu'à la rupture de cette dernière, il n'est pas impossible que la CRP, présente à de fortes concentrations au niveau de la plaque, participe également à la rupture de néovaisseaux (provoquant ainsi une hémorragie intraplaque) ou de la plaque elle-même par l'action des MMP-9.

L'ensemble de ces résultats apporte une vision supplémentaire dans la recherche de cibles thérapeutiques afin de lutter contre la formation, l'évolution et la rupture de la plaque d'athérome. Une première approche vient à viser la CRP elle-même. Il a déjà été démontré que les statines, connues pour leurs effets hypocholestérolémiants, diminuaient les taux plasmatiques de CRP. Mieux connaître le fonctionnement de la CRP nous a d'ores et déjà permis, à partir de ces travaux, d'imaginer une autre cible potentielle qu'est le VEGF-A. Nous restons intimement persuadés que nous ne sommes qu'au début d'une liste que nous espérons élargir prochainement. En effet, une étude parallèle dans notre laboratoire a permis de définir une seconde cible potentielle, le LXR $\alpha$  dont l'expression est régulée positivement par la CRP. Nous avons pu démontrer dans les monocytes et les cellules THP-1 que la CRP induit une augmentation des ARNm et des protéines LXR $\alpha$  ainsi qu'une translocation nucléaire de la protéine. Cette régulation de LXR $\alpha$  par la CRP semble être médiée par la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B, l'activation des protéines ERK, MAPkinases et Akt Kinases et est accompagnée d'une augmentation de l'expression en ARNm ABCA1, un gène cible de LXR $\alpha$ .

***Fiches Techniques***

## Electrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) <sup>(1)</sup>

- Fixer les plaques de verre sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage.
- Couler le gel de séparation <sup>(2)</sup> entre les plaques de verre jusqu'à environ une hauteur de 5cm et recouvrir d'eau distillée.
- Laisser polymériser environ 15 minutes.
- Retirer l'eau distillée par inversion du socle.
- Couler le gel de concentration <sup>(3)</sup> et positionner le peigne en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser entre 10 et 15 minutes.
- Retirer les peignes et rincer soigneusement chaque puits avec de l'eau distillée ou le tampon de migration.
- Assembler les deux supports de gel sur le système central d'électrodes et insérer l'ensemble dans la cuve à électrophorèse :



- Remplir le réservoir central ainsi qu'environ 1/3 du réservoir externe avec du tampon de migration <sup>(4)</sup>.
- Préparer les échantillons en ajoutant 1 volume de tampon de charge <sup>(5)</sup> pour 1 volume d'échantillon.
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 3min.
- Charger les puits du gel avec les échantillons et le marqueur de taille <sup>(6)</sup>.
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration s'effectue à 100V pour une durée variable selon les expériences.

---

<sup>(1)</sup> Appareil d'électrophorèse MiniProtean III (BioRad).

<sup>(2)</sup> Gel de séparation: 10% ou 12% (v/v) acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) (Euromedex, Mundolsheim, France) dans tampon Tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS 0,4% et polymérisé avec 0,5% (v/v) de persulfate d'ammonium à 10% et 0,1% (v/v) de TEMED.

<sup>(3)</sup> Gel de concentration : 4% (v/v) acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) (Euromedex) dans tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8, SDS 0,4% polymérisé avec 0,5% (v/v) de persulfate d'ammonium à 10% et 0,1% (v/v) de TEMED.

<sup>(4)</sup> Tampon de migration : 29mM Tris-Base, 192mM Glycine, 0,1% SDS.

<sup>(5)</sup> Tampon de charge : 125mM Tris-HCl pH6,8, 4% SDS, 20% Glycérol, 0,004% bleu de bromophénol, 10% 2-mercaptoéthanol.

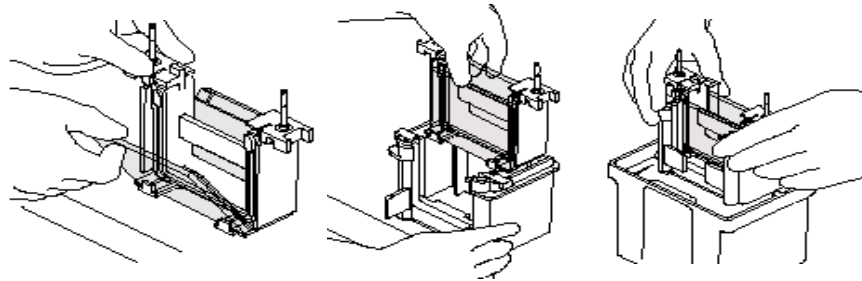
<sup>(6)</sup> Prestain Protein Ladder (MBI Fermentas) : 11kDa, 17kDa, 24kDa, 35kDa, 46kDa, 54kDa, 72kDa, 100kDa, 126kDa, 170kDa.

## **Coloration au bleu de Coomassie**

- Dès la fin de l'électrophorèse, laver 2 fois le gel dans 100mL d'eau distillée (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) sous agitation pendant 15min.
- Retirer l'eau distillée et ajouter un volume suffisant de Biosafe Coomassie (BioRad) afin de recouvrir le gel.
- Incuber sous agitation lente une heure pour obtenir le maximum de coloration.
- Rincer le gel dans 100mL d'H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> pendant 15min sous agitation.

## Electrophorèse sur gel non dénaturant de polyacrylamide (PAGE)<sup>(1)</sup>

- Fixer les plaques de verre sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage.
- Couler le gel de séparation <sup>(2)</sup> entre les plaques de verre jusqu'à environ une hauteur de 5cm et recouvrir d'eau distillée.
- Laisser polymériser environ 15 minutes.
- Retirer l'eau distillée par inversion du socle.
- Couler le gel de concentration <sup>(3)</sup> et positionner le peigne en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser.
- Retirer les peignes et rincer soigneusement chaque puits avec de l'eau distillée.
- Assembler les deux supports de gel sur le système central d'électrodes et insérer l'ensemble dans la cuve à électrophorèse :



- Remplir le réservoir central ainsi qu'environ 1/3 du réservoir externe avec du tampon de migration <sup>(4)</sup>.
- Préparer les échantillons en ajoutant 1 volume de tampon de charge <sup>(5)</sup> pour 1 volume d'échantillon.
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 3min.
- Charger les puits du gel avec les échantillons et les marqueurs de taille précolorés <sup>(6)</sup>.
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration s'effectue à 100V pour une durée variable selon les expériences.

---

<sup>(1)</sup> Appareil d'électrophorèse MiniProtean III (BioRad).

<sup>(2)</sup> Gel de séparation : 12% (v/v) acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) (Euromedex) dans tampon Tris-HCl 1,5M pH 8,8, polymérisé avec 0,5% (v/v) de persulfate d'ammonium à 10% et 0,1% (v/v) de TEMED.

<sup>(3)</sup> Gel de concentration : 4% (v/v) acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) (Euromedex) dans tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8, polymérisé avec 0,5% (v/v) de persulfate d'ammonium à 10% et 0,1% (v/v) de TEMED.

<sup>(4)</sup> Tampon de migration : 29mM Tris-Base, 192mM Glycine, 0,1% SDS.

<sup>(5)</sup> Tampon de charge : 62,5mM Tris-HCl pH6,8, 25% Glycérol, 0,01% bleu de bromophénol.

<sup>(6)</sup> Prestain Protein Ladder (MBI Fermentas) : 11kDa, 17kDa, 24kDa, 35kDa, 46kDa, 54kDa, 72kDa, 100kDa, 126kDa, 170kDa.

## Coloration au nitrate d'argent

### (Kit Bio-Rad)

#### Fixation :

Préparer la solution de fixation (pour 1 grand gel)

	Volume	Concentration
Reagent Grade Methanol	200 mL	50% v/v
Reagent Grade Acetic Acid	40 mL	10% v/v
Fixative Enhancer Concentrate	40 mL	10% v/v
Eau distillée déionisée	120 mL	30% v/v
Total	400 mL	100% v/v

Après l'électrophorèse, placer les gels dans la solution de fixation pendant 20 min sous agitation.

#### Lavage :

- Retirer la solution de fixation.
- Rincer le gel dans de l'eau distillée pendant 10 min sous agitation.
- Vider l'eau et renouveler le lavage avec de l'eau distillée. Retirer l'eau.

#### Coloration et développement

Préparer la solution de coloration 5 minutes juste avant utilisation :

- Placer 52,5 mL d'eau déionisée dans un bécher ou un erlen contenant un agitateur magnétique.
- Ajouter dans l'ordre :
  - 7,5 mL de Silver Complex Solution
  - 7,5 mL de Reduction Moderator Solution
  - 7,5 mL de Image Development Reagent
- Immédiatement avant utilisation, ajouter 75 mL de Development Accelerator Solution et agiter.
- Verser le mélange dans le récipient de coloration.
- Laisser sous agitation lente pendant environ 20 minutes afin d'avoir l'intensité de coloration désirée. Il faut au moins 15 minutes pour voir apparaître les spots.

#### Arrêt de la réaction

- Quand la coloration désirée est atteinte, stopper la réaction en plaçant le gel dans une solution d'acide acétique 5% au moins 15 minutes.
- Rincer les gels 5 minutes dans de l'eau distillée.

## Retrait de l'azide de sodium des solutions de CRP commerciales

### (Micro Bio-Spin® Chromatography Columns)

- Inverser la colonne vigoureusement plusieurs fois pour resuspendre le gel et retirer les bulles.
- Découper la pointe de la colonne et placer la colonne sur un tube à microcentrifugation de 2mL.
- Retirer le capuchon. Si le tampon contenu dans la colonne ne s'écoule pas, remettre le capuchon puis le retirer à nouveau.
- Laisser l'excès de tampon s'écouler par gravité (environ 2 minutes).
- Retirer le tampon du tube de 2mL et le replacer sous la colonne.
- Centrifuger l'ensemble colonne + tube pendant 2 minutes à 1000g pour retirer le tampon restant.
- Vider le tube et le replacer sous la colonne.
- Ajouter 500µL du tampon des solutions de CRP sans azide <sup>(1)</sup> dans la colonne.
- Centrifuger l'ensemble colonne + tube, 1min à 1000g.
- Vider le tube et le replacer sous la colonne.
- Placer la colonne dans un tube de 1,5mL.
- Déposer l'échantillon (entre 20 et 75µL) à la surface du gel de la colonne.
- Après dépôt de l'échantillon, centrifuger l'ensemble colonne + tube pendant 4 minutes à 1000g.
- L'échantillon purifié est récupéré dans le tube 1,5mL.

} 4 fois

---

<sup>(1)</sup> Tampon CRP : 20mM Tris, 280mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,8-8,2.

## Séparation des cellules mononucléaires sur gradient de Ficoll et mise en culture

- Diluer au 1/2 l'échantillon de sang dans du PBS 1X pH 7,4 à température ambiante.
- Dans un tube Falcon de 50 mL, ajouter un volume de milieu de séparation des lymphocytes (gradient de Ficoll de densité  $1.077 \pm 0.001$ ) (Eurobio) identique au volume de sang obtenu après dilution. Déposer délicatement le sang dilué sur le gradient de Ficoll à l'aide d'une pipette en évitant de mélanger les deux phases.
- Centrifuger à 2500 tours/min pendant 20min à température ambiante.
- Prélever entre 5 et 10 mL du sérum (phase supérieure jaunâtre) dans un tube de 15mL.
- Prélever l'anneau de cellules mononucléaires avec une pipette Pasteur et le déposer dans le tube de lavage.
- Ajuster à 50mL avec du PBS 1X.
- Centrifuger 8 min à 1500 tours à température ambiante (1<sup>er</sup> lavage).
- Reprendre le culot dans du PBS 1X et ajuster à 50mL.
- Centrifuger 8 min à 1500 tours à température ambiante (2<sup>e</sup> lavage).
- Retirer le surnageant et reprendre les cellules dans environ 10mL de RPMI-1640 (avec 25mM HEPES et L-glutamine).
- Compter les cellules. Pour cela, prélever 20 $\mu$ L de la suspension cellulaire et y ajouter 20 $\mu$ L d'une solution de bleu Trypan à 0,4% (Sigma). Après quelques minutes, déposer 20 $\mu$ L du mélange entre lame et lamelle et compter les cellules sous un microscope. Le nombre de cellules s'obtient suivant l'équation :  $N = n \times 2 \times 10^4 \times V$   
où  
N = nombre total de cellules  
n = nombre de cellules comptées sur la plaque de Thoma  
2 = facteur de dilution des cellules avec le bleu Trypan  
V = volume de reprise des cellules avant numération
- Ajouter aux cellules un volume de sérum autologue afin d'obtenir une concentration finale de 1%.
- Ensemencer les cellules à  $10^6$  cellules/mL.



## **Récupération des cellules après la mise en culture** **pour l'extraction d'ARN**

- Directement à partir des flasques ou des puits de culture, récupérer les surnageants dans un tube "A" de 15mL à l'aide d'une pipette.
- Déposer doucement 1mL de PBS 1X stérile <sup>(1)</sup> sur les cellules adhérentes au plastique des flasques ou des puits.
- Agiter lentement les flasques ou les plaques de culture afin de laver l'ensemble de la surface cellulaire.
- Retirer le PBS avec une pipette.
- Ajouter immédiatement 1mL de Trizol® pour  $10^7$  cellules et laisser agir quelques minutes sous la sorbonne.
- Pendant ce temps, centrifuger les tubes "A" de 15mL contenant les surnageants 6min à 1500 tours/min à température ambiante afin de culotter les cellules en suspension dans le milieu de culture.
- Transférer le surnageant dans un tube propre dans lequel un cocktail d'anti-protéases <sup>(2)</sup> (Roche Moleculars Biochemicals) a été préalablement ajouté. Bien homogénéiser, aliquoter et conserver à  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Laver le culot du tube "A" avec 10mL de PBS 1X stérile.
- Centrifuger 6min à 1500 tours/min à température ambiante et vider le surnageant.
- Récupérer le Trizol® à l'aide d'une micropipette et le transférer dans le tube "A". Bien homogénéiser par aspiration-refoulement et transférer dans un tube de 1,5mL ou 2mL selon le volume. Conserver à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction.

---

<sup>(1)</sup> PBS stérile 1X pH7,4 : 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC et autoclaver.

<sup>(2)</sup> Complete mini EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals)

## Extraction d'ARN totaux à partir de cellules en culture

- Homogénéiser  $10^7$  cellules dans 1 mL de Trizol®.
- Incuber les échantillons pendant 5 min à température ambiante (dissociation des complexes nucléoprotéiques).
- Ajouter 0,2mL de chloroforme par mL de Trizol®.
- Agiter vigoureusement à la main pendant 15 secondes et incuber à température ambiante pendant 2 à 3 min.
- Centrifuger à 12000g (11000 rpm) pendant 15 min à 4°C.
- Récupérer la phase supérieure contenant l'ARN dans un tube propre.
- Ajouter 0,2U de DNase I<sup>1</sup>.
- Incuber le tube 30 min à 37°C.
- Ajouter 0,5 mL d'isopropanol. A cette étape, il est possible d'ajouter 20µg de glycogène pour un petit nombre de cellules initial afin de précipiter plus efficacement l'ARN.
- Incuber pendant 10 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12000g (11000rpm) pendant 10 min à 4°C.
- Retirer le surnageant et ajouter 1 mL d'éthanol 75% au culot.
- Mélanger par inversion ou vortex. (conservation possible 1 an à -20°C ou 1 semaine à 4°C).
- Centrifuger à 7500g (9000rpm) pendant 5 min à 4°C.
- Sécher le culot brièvement pendant 5 à 10 min à l'air libre.
- Reprendre le culot dans de l'eau DEPC (conservation possible à -80°C).

---

<sup>(1)</sup> DNase I : Déoxyribonuclease I (RNase-free) à 1U/µL (MBI Fermentas).

## Vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose

- Protéger la paillasse avec du papier aluminium ou la nettoyer avec une solution de NaOH à 0,1M.
- Préparer la cuve, le peigne et le support du gel (Wide Mini-Sub™ Cell, BioRad).
- Déposer le peigne et le support dans la cuve.
- Les recouvrir de NaOH 0,1M pendant 15 minutes.
- Préparer 1L de TBE 1X à partir de la solution TBE 10X <sup>(1)</sup>.
- Pour un petit gel, verser 50mL de TBE 1X dans tube Falcon de 50mL et transférer dans un erlen autoclavé.
- Peser 0,4g d'agarose que l'on ajoute dans l'eren.
- Chauffer à 200-250°C pour faire fondre l'agarose en remuant de temps en temps.
- Sortir le bleu de dépôt ARN <sup>(2)</sup> du -20°C ainsi que les échantillons du -80°C. Les placer dans la glace.
- Retirer la solution de NaOH de la cuve et laisser sécher.
- Dans l'eren avec l'agarose fondu, ajouter 2µL de bromure d'éthydiu (BET) d'une solution mère à 10mg/mL pour 50mL d'agarose.
- Refroidir l'eren sous l'eau et verser l'agarose sur le support (N.B : en cas de fortes chaleurs, il est possible de mettre le gel à polymériser au froid).
- Pour désagréger l'ARN dans les tubes d'échantillons : chauffer à 95°C pendant 2 minutes puis transférer directement dans la glace.
- Vortexer les tubes d'échantillons.
- Lorsque le gel est polymérisé, retirer le peigne du gel et déposer le gel avec son support dans la cuve contenant du TBE 1X.
- Dans un petit tube, déposer le volume équivalent à 1µg d'ARN de l'échantillon et environ 2µL du bleu de dépôt ARN (afin d'obtenir une dilution au 1/5<sup>e</sup> du bleu de dépôt).
- Déposer les échantillons dans les puits du gel.
- Migrer à 70 volts (jusqu'à 80V maxi pour un petit gel) jusqu'à visualisation des bandes désirées.
- Les bandes des ARN 28S, 18S et 5S sont observées par passage du gel sous lampe UV.

---

<sup>(1)</sup> Tampon TBE 10X : 890mM Tris-base, 890mM acide borique, 20mM EDTA (pH8) qsp H<sub>2</sub>O DEPC.

<sup>(2)</sup> Bleu de dépôt ARN 6X : 0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol, 30% glycérol, qsp H<sub>2</sub>O DEPC.

## Transcription inverse des ARN (RT)

Dans un microtube de 0,5 mL, mélanger dans l'ordre :

	Volume	Concentration finale
H2O ultrapure	qsp 20 $\mu$ L	
Tampon RT 5X <sup>(1)</sup>	4 $\mu$ L	1X
dNTP 25 mM <sup>(2)</sup>	0,2 $\mu$ L	0,5mM
Oligo dT (10 $\mu$ M) <sup>(3)</sup>	1 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Inhibiteur de RNase <sup>(4)</sup>	0,1 $\mu$ L	4U
ARN totaux		2 $\mu$ g/20 $\mu$ L
Reverse Transcriptase <sup>(5)</sup>	0,2 $\mu$ L	40U/20 $\mu$ L

N.B : le volume en ARN totaux à prélever correspond à 2 $\mu$ g d'ARN.

- Incuber le mélange réactionnel à 42°C pendant 1h30.
- Conserver le produit de la réaction à -20°C ou effectuer l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

---

<sup>(1)</sup> Tampon M-MuLV 5X : 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl (MBI Fermentas).

<sup>(2)</sup> dNTP à 25mM chaque (MBI Fermentas)

<sup>(3)</sup> Amorce oligonucléotidique spécifique de l'ARNm étudié oligo(dT)15.

<sup>(4)</sup> Ribonuclease inhibitor à 40U/ $\mu$ L (MBI Fermentas).

<sup>(5)</sup> RevertAid™ M-MuLV à 200U/ $\mu$ L (MBI Fermentas).

## **PCR quantitative en temps réel sur LIGHT CYCLER®**

Utilisation du Kit SYBR Green QIAGEN contenant le Mix réactionnel prêt à l'emploi (dNTP+Taq polymérase+Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>) et H<sub>2</sub>O ultrapure en aliquots à -20°C.

- Décongeler les tubes de Mix, d'amorces, d'H<sub>2</sub>O ultrapure et les ADNc.
- Vortexer les ADNc quelques secondes.

Sous la hotte PCR et dans le bloc réfrigéré :

- Préparer un nombre de capillaires correspondant à celui des échantillons à tester
- Préparer le pool PCR pour n+1 échantillons avec pour 1 échantillon :
  - 0,5µL amorce 3' anti-sens à 10µM
  - 0,5µL amorce 5' sens à 10µM
  - 5µL de Mix
  - 3µL H<sub>2</sub>O
- Vortexer et centrifuger quelques secondes.
- Déposer dans chaque capillaire 9µL du pool.
- Vortexer les tubes d'ADNc dilués au 1/20 dans H<sub>2</sub>O DEPC ou Millipore autoclavée.
- Ajouter 1µL de la solution d'ADNc diluée dans chaque capillaire.
- Boucher les capillaires.
- Insérer les capillaires dans le carroussel du LIGHT CYCLER®
- Sortir le bloc de centrifugation, y insérer le carroussel.
- Insérer le bloc à la verticale dans la centrifugeuse.
- Lancer le programme prédéfini de la centrifugeuse (3000tours/min pendant 30 secondes).
- A la fin du cycle de centrifugation, sortir le bloc.
- Insérer le carroussel dans le LIGHT CYCLER®
- Lancer le programme de PCR quantitative.

**Amorces utilisées en PCR en temps réel:**

<b>Gène</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Amorces ( S : Sens ; AS : Anti Sens)</b>	<b>Longueur de l'amplicon</b>
RPS29	NM001032	S : AAGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG AS : AGACACGACAAGTCGGAGAA	77pb
IL-1 $\alpha$	NM000575	S : TGCCTGAGATACCCAAAACC AS : GATGGGCAACTGATGTGAAA	99pb
IL-1 $\beta$	NM000576	S : GTCAGCTCTCTCCTTTCA AS : AATGTGGCCGTGGTTTCT	106pb
IL-6	NM000600	S : CCACACAGACAGCCACTCAC AS : AGGTTGTTTTCTGCCAGTGC	146pb
TNF $\alpha$	NM 000594	S : AGGCGGTGCTTGTTCTCA AS : GTTCGAGAAGATGATCTGACTGCC	167pb
VEGF	AF 022375	S : TCGATCGTTCTGTATCAGTCT AS : CCATGAAC TTTCTGCTGTCTT	163pb
MMP-9	NM 004994	S : CACTTCCCCTTCATCTTC AS : CAGGGTTTCCATCAGCATT	172pb
TIMP-1	NM 003254	S : ACATCCGGTTCGTCTACACC AS : CTGCAGTTTCCAGCAATGA	101pb
TIMP-2	NM 003255	S : CACCAGGCCAAGTTCTTC AS : CGGTACCACGCACAGGA	59pb
PAI-2	NM 002575	S : CAGACAGCAACTCAGAGAA AS : TGCCACACAAAGATCCTCCA	66pb
$\alpha$ 2-M	NM 000014	S : TTCAGGAGCTCTGGGTCACT AS : CTGTCTTCCAGGCTGACTCC	166pb

## Zymographie

- Préparer la gélatine pour 2 gels: peser 12mg de gélatine (EIA Grade Reagent Gelatin, 170-6537 BioRad) et les déposer dans un tube eppendorf avec 360µL d'H<sub>2</sub>O distillée. Chauffer à 57°C pour la dissoudre. Pas de vortex !
- Préparer les gels d'acrylamide à 10%. Ajouter 300µL de la gélatine dissoute puis le persulfate d'ammonium, le Temed puis couler les gels normalement.
- Couler les gels à 4% dès que les gels à 10% sont polymérisés.
- Préparer les échantillons : pour un volume d'échantillon, ajouter 2 volumes de Zymogram Sample Buffer<sup>(1)</sup> (Bio-Rad). Ne pas chauffer !!!
- Déposer les échantillons sur le gel.
- Migrer 1H30 à 100V dans le tampon de migration (fiche 3 ou 5).
- Laver le gel 2 fois 15 minutes sous agitation dans 100mL de tampon de lavage<sup>(2)</sup>.
- Incuber le gel toute la nuit à 37°C dans 100mL de tampon de révélation<sup>(3)</sup>.
- Colorer le gel dans une solution de bleu de Coomassie 0.5%<sup>(4)</sup> pendant 1H sous agitation.
- Décolorer le gel avec la solution de décoloration<sup>5</sup> jusqu'à visualiser les bandes de digestion.
- Après photographie du gel, la quantification des bandes obtenues s'effectue par mesure densitométrique (GalDoc 1000, BioRad).

---

<sup>(1)</sup> Tampon d'échantillon "Zymogram Sample Buffer" : 62,5mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% Glycérol, 4% SDS, 0,01% bleu bromophénol.

<sup>(2)</sup> Tampon de lavage : Triton X-100 2,5%, glycine 25mM pH8.3.

<sup>(3)</sup> Tampon de révélation : 50mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35 et H<sub>2</sub>O qsp 500mL.

<sup>(4)</sup> Solution de bleu de Coomassie 0,5% : 0,5% bleu de Coomassie R-250, 10% acide acétique, 25% isopropanol et H<sub>2</sub>O qsp 500mL.

<sup>(5)</sup> Solution de décoloration : 50% méthanol, 10% acide acétique, 40% H<sub>2</sub>O.

## **Extraction des protéines totales ou nucléaires/cytosoliques à partir de cultures cellulaires**

- Directement à partir des flasques ou des puits de culture, récupérer les surnageants dans un tube "A" de 15mL à l'aide d'une pipette.
- Centrifuger les tubes "A" pendant 6min à 300g à température ambiante afin de récupérer les cellules en suspension dans le milieu de culture.
- Transférer le surnageant dans un tube propre dans lequel un cocktail d'anti-protéases <sup>(2)</sup> (Roche moleculars Biochemicals) a été préalablement ajouté. Bien homogénéiser, aliquoter et conserver à -20°C.
- Déposer doucement 1mL de PBS 1X stérile <sup>(1)</sup> sur les cellules adhérentes au plastique des flasques ou des puits.
- Agiter lentement les flasques ou les plaques de culture afin de laver l'ensemble de la surface cellulaire.
- Retirer le PBS avec une pipette.
- Ajouter immédiatement 2mL d'accutase <sup>(3)</sup> sur les cellules.
- Incuber les cellules 15min à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.
- Gratter très doucement les cellules et les transférer dans les tubes "A".
- Centrifuger les tubes "A" à 800g pendant 5min à 4°C.
- Vider le surnageant.
- Reprendre les cellules dans 1mL de PBS 1X stérile froid (préalablement mis dans la glace).
- Resuspendre les cellules par aspiration-refoulement.
- Centrifuger à 800g pendant 5min à 4°C et retirer le surnageant jusqu'à la dernière goutte.

Cette technique d'extraction s'applique pour un nombre de cellules compris entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>7</sup>.

### **Protéines Totales :**

- Ajouter 50µL de tampon de lyse <sup>(4)</sup> et mélanger par aspiration-refoulement. Si le culot reste visqueux, il est possible d'ajouter du tampon de lyse jusqu'à 100µL total.
- Incuber 20min dans la glace.
- Centrifuger à 12000g 15min à 4°C.
- Récupérer le surnageant contenant les protéines dans un tube eppendorf de 1,5mL.

### **Protéines nucléaires/cytosoliques :**

- Ajouter 400µL de tampon A <sup>(5)</sup> froid.
- Incuber 10min dans la glace.
- Ajouter le NP-40 à 0,1% final.
- Centrifuger à 800g 2min à 4°C.



- Retirer le surnageant (fraction cytosolique) et le transférer dans un tube propre qui sera conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Ajouter  $200\mu\text{L}$  de tampon A froid sur le culot.
- Centrifuger à  $800\text{g}$   $2\text{min}$  à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Retirer le surnageant jusqu'à la dernière goutte.
- Ajouter  $50\mu\text{L}$  de tampon B <sup>(6)</sup> froid sur le culot.
- Incuber  $15\text{min}$  dans la glace (lyse des surnageants).
- Vortexer.
- Centrifuger  $6\text{min}$  à  $12000\text{g}$ .
- Récupérer le surnageant (protéines nucléaires) dans un tube propre.
- Congeler les tubes rapidement (idéalement dans de la carboglace + éthanol 100%) et les conserver à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

---

(1) PBS stérile 1X pH7,4 :  $137\text{mM NaCl}$ ,  $2,7\text{mM KCl}$ ,  $10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $2\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ .

(2) Complete mini EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals)

(3) Accutase, Cell Detachment Solution (Invitrogen, Montluçon, France)

(4) Cell lysis Buffer 10X ; Cell signaling Technology. A diluer en 1X dans  $\text{H}_2\text{O}$ .

(5) Tampon A :  $10\text{mM Hepes pH } 7.9$ ,  $3\text{mM MgCl}_2$ ,  $10\text{mM NaCl}$ ,  $0.1\text{mM EDTA}$ ,  $300\text{mM Sucrose}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ, aliquoter et congeler à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Juste avant utilisation, ajouter  $40\mu\text{L}$  de la solution d'anti-protéases (une pastille de "Complete EDTA free" dissoute dans  $2\text{mL d}'\text{H}_2\text{O}$ ) et  $0,5\text{mM}$  de DTT ( $5\mu\text{L}$  de DTT  $0,1\text{M}$  pour  $1\text{mL}$  de tampon A).

(6) Tampon B :  $20\text{mM Hepes pH } 7.9$ ,  $3\text{mM MgCl}_2$ ,  $420\text{mM NaCl}$ ,  $0,2\text{ mM EDTA}$ ,  $25\%$  Glycérol,  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ, aliquoter et congeler à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Juste avant utilisation, ajouter  $40\mu\text{L}$  de la solution d'anti-protéases (une pastille de "Complete EDTA free" dissoute dans  $2\text{mL d}'\text{H}_2\text{O}$ ) et  $0,5\text{mM}$  de DTT ( $5\mu\text{L}$  de DTT  $0,1\text{M}$  pour  $1\text{mL}$  de tampon A).

**Dosage des protéines**  
**(kit DC BioRad)**

- Préparer dans des tubes de 1,5mL, les dilutions de la gamme BSA standard en cascade :

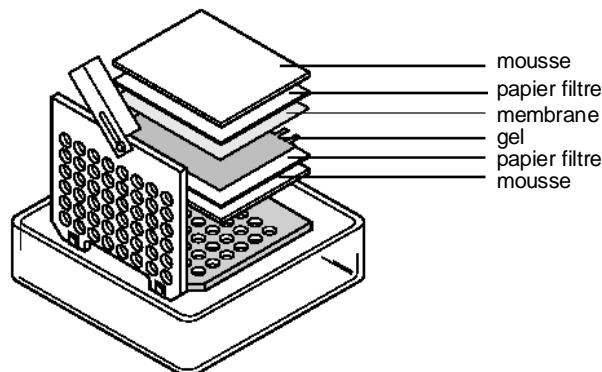
Concentration BSA	Quantité de BSA standard à prélever	Quantité de tampon à prélever
1,34 mg/mL = A	20 µL	
0,67 mg/mL = B	20µL de A	20 µL
0,34 mg/mL = C	20µL de B	20 µL
0,17 mg/mL = D	20µL de C	20 µL
0,08 mg/mL	20µL de D	20 µL
0 mg/mL		20µL

Pour de meilleurs résultats, utiliser le même tampon pour la gamme et les échantillons !

- Préparer le réactif A' en ajoutant 20µL de réactif S pour 1mL de réactif A.
- Déposer 5µL d'échantillon ou de standard dans les puits.
- Ajouter dans chaque puits 25µL de réactif A'.
- Ajouter 200µL de réactif B dans chaque puits.
- Incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 15min.
- L'absorbance est lue à 750nm sur le lecteur de microplaques et est stable environ une heure.

## Western-Blot avec révélation par chimioluminescence (HRP)

- Couler le ou les gels d'acrylamide à 12% + 4% selon le protocole de la fiche 1.
- Préparer les volumes d'échantillons afin d'avoir 20µg de protéines et y ajouter le tampon de charge <sup>(1)</sup> (1 volume de tampon de charge pour 1 volume d'échantillon).
- Chauffer les échantillons 3 minutes à 100°C dans le bain-marie.
- Déposer les échantillons sur le gel et laisser migrer à 100V. Le temps de migration dépend de la taille de la protéine à détecter.
- Pendant la migration, faire tremper, pour 1 gel, 2 feuilles de papier filtre (type papier Whatman) découpées à la taille du gel, dans de l'eau distillée puis dans du tampon de transfert (dans une cuve en plastique).
- La membrane (Immobilon, PVDF membrane, Millipore), découpée à la taille du gel, doit être immergée dans du méthanol 100% pendant 15 secondes, puis dans de l'eau distillée pendant 2 min et enfin pendant 5 min dans du tampon de transfert <sup>(2)</sup>. Le gel d'acrylamide et les mousses de l'appareil de transfert doivent être équilibrés dans le tampon de transfert avant d'être montés en sandwich.
- Lorsque la migration des protéines dans le gel d'acrylamide est terminée, enlever délicatement la petite plaque de verre en la soulevant par un angle. Décoller le gel en le plaçant dans du tampon de transfert.
- Préparer le sandwich en suivant le schéma ci-dessous et avant de mettre la 2<sup>e</sup> mousse, chasser les bulles d'air en faisant rouler une pipette sur le sandwich.



Attention, la membrane ne doit pas sécher sinon, la retremper dans le méthanol 100% et tampon de transfert.

- Fermer la cassette et l'insérer dans le dispositif de transfert (MiniTrans-Blot Cell, BioRad), face noire de la cassette du côté de la face noire du dispositif. Placer un petit barreau aimanté au fond de la cuve, ainsi que le réservoir de glace sorti du congélateur à -20°C.
- Remplir la cuve de tampon de transfert.
- Le transfert se fait à 100V pendant 1 heure à 4°C sous agitation légère.

- Saturer la membrane pendant 2 heures dans 25mL de tampon de blocage <sup>(3)</sup> sous agitation à température ambiante.
- Ajouter l'anticorps primaire dilué dans 5mL de tampon de blocage (pour une membrane de 8,5cm x 6,8cm) et incuber toute la nuit à 4°C sous agitation.
- Laver 5 fois 10 minutes avec le TBST <sup>(4)</sup> sous agitation à température ambiante.
- Ajouter l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans le tampon de saturation et incuber 1 heure à température ambiante sous agitation.
- Laver 5 fois 10 minutes avec le TBST sous agitation à température ambiante.
- Dans un tube de 5mL enveloppé de papier aluminium, ajouter 0,5mL de chaque solution de la solution de révélation Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) (on compte 1mL total par membrane de 8,5cm x 6,8cm).
- Egoutter les membranes sur du papier Wattman à l'aide d'une pince.
- Déposer les membranes sur du Saran face protéines vers le dessus.
- Verser la solution Pierce sur la membrane.
- Ajouter un morceau de Saran sur la membrane (en évitant les bulles !!!) et couvrir d'un morceau de papier aluminium.
- Laisser incuber 5 minutes.
- Récupérer la membrane et l'égoutter entre deux feuilles de papier essuie-tout lisse en tamponnant légèrement.
- Placer la membrane entre deux feuilles de Saran propre en refermant les côtés sans faire de plis. Faire le montage dans la cassette de développement et scotcher le tout.

En chambre noire :

- Poser un film photo sur la membrane.
- A l'aide d'un stylo, marquer les 4 coins de la membrane sur le film photo.
- Fermer la cassette de développement et laisser 1,2 ou 5 minutes de contact.
- Placer le film photo dans le révélateur en agitant le film à l'aide d'une pince jusqu'à ce que la ou les bandes d'intérêt commencent à apparaître.
- Passer ensuite le film dans de l'eau distillée puis dans le fixateur. Laisser la membrane quelques instants dans le fixateur afin de retirer le bruit de fond.
- Placer ensuite les films dans l'eau pour retirer le surplus de fixateur.
- Faire sécher les films.

## Caractéristiques des anticorps utilisés :

Cible de l'anticorps primaire	Fournisseur/ référence	Origine	Dilution
Phospho p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling Technology / #9106	souris	1/2000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling Technology / #9102	lapin	1/1000
NFκB p65	Santa Cruz Biotechnology / sc-372	chèvre	1/1000
Phospho Akt	Cell Signaling Technology / #4056	lapin	1/1000
Akt	Cell Signaling Technology / #9272	lapin	1/1000
Phospho p38MAPK	Cell Signaling Technology / #9215	lapin	1/1000

Cible de l'anticorps secondaire	Fournisseur/ référence	Origine	Dilution
Anti IgG de souris couplé HRP <sup>(°)</sup>	J.I.L <sup>(*)</sup> / 715-035-151	âne	1/10000
Anti IgG de lapin couplé HRP <sup>(°)</sup>	J.I.L <sup>(*)</sup> / 715-035-152	âne	1/10000
Anti IgG de chèvre couplé HRP <sup>(°)</sup>	Santa Cruz Biotechnology /	âne	1/10000

° HRP : Horseradish peroxidase, Amersham, France

\* J.I.L : Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA

---

(1) Tampon de charge : 125mM Tris-HCl pH6,8, 4% SDS, 20% Glycérol, 0,004% bleu de bromophénol , 10% 2-mercaptoéthanol.

(2) Tampon de transfert : 25mM Tris-Base, 192mM Glycine, 20% Méthanol, pH 8,1 à 8,5.

(3) Tampon de blocage : 5% BSA, 25mM Tris base, 0,05% Tween 20, 150mM NaCl, pH7,5 filtré.

(4) TBST : 25mM Tris base, 0,05% Tween 20, 150mM NaCl, pH7,5 filtré.

## **Deshybridation des membranes de Western-blot**

Dès la fin du développement du premier Western-blot :

- Laver la membrane 2 fois pendant 15 minutes dans le TBST <sup>(1)</sup>.
- Incuber la membrane 15 minutes dans 5mL de solution de stripping <sup>(2)</sup>.
- Laver la membrane 2 fois pendant 15 minutes dans le TBST.

Reprise du protocole standard de Western-blot au niveau de l'étape de saturation de la membrane.

---

<sup>(1)</sup> TBST : 25mM Tris base, 0,05% Tween 20, 150mM NaCl, pH7,5 filtré.

<sup>(2)</sup> Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford USA)

**Isolement des monocytes CD14+ par tri sélectif positif**  
**(Miltenyi Biotec)**

- La purification des PBMC s'effectue en suivant la fiche 1 jusqu'au 2<sup>e</sup> lavage.
- Vider le surnageant et remettre en suspension avec moins de 1mL de tampon M <sup>(1)</sup>.
- Homogénéiser le culot par aspiration-refoulement.
- Transférer dans un tube de 15mL et ajuster à 10mL avec le tampon M.
- Homogénéiser en effectuant plusieurs aspiration-refoulement à l'aide d'une micropipette.
- Prélever 20µl de la suspension pour effectuer une numération et un test de viabilité par exclusion au bleu Trypan (Fiche 18).
- Centrifuger pendant 5 à 6min à 1500 tours.
- Vider complètement le surnageant et resuspendre le culot de cellules dans 80µl de tampon M pour 10<sup>7</sup> cellules. Transférer dans un tube Eppendorf de 1,5mL.
- Ajouter 20µl d'anticorps couplés <sup>(2)</sup> pour 10<sup>7</sup> cellules.
- Incuber pendant 15 minutes à 6-12°C.
- Laver les cellules en ajoutant un volume de tampon M de 10 à 20 fois supérieur au volume de cellules prélevé.
- Centrifuger pendant 6minutes à 1400 tours/min (300g).
- Lors de la centrifugation, insérer la colonne <sup>(3)</sup> sur l'aimant, hors champ magnétique. L'équilibrer en faisant passer 3mL de tampon. NE JAMAIS LAISSER SÉCHER LA COLONNE !! Ajouter du tampon si la centrifugation n'est pas terminée.
- Vider le surnageant de l'échantillon et resuspendre le culot dans 500µl de tampon.
- Insérer la colonne dans le champ magnétique et déposer l'échantillon sur la colonne.
- Rincer 3 fois avec 3mL de tampon. Récupérer alors la fraction négative.
- Retirer la colonne du champ magnétique, ajouter 5mL de tampon et utiliser l'embout de seringue pour expulser la fraction positive contenant les monocytes dans le tube adéquat.

---

<sup>(1)</sup> Tampon M : PBS pH 7,4, 0,5% BSA, 2mM EDTA (préparer 50-100mL de tampon).

<sup>(2)</sup> Anticorps couplés : MACS CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Paris, France).

<sup>(3)</sup> Colonnes LS (Miltenyi Biotec)

### **Numération et test de viabilité par exclusion au bleu Trypan**

- En utilisant un tube Eppendorf, déposer 20µl de la suspension cellulaire puis 20µl de bleu Trypan 0,4% v/v (Sigma).
- Déposer 20µL du mélange sur une cellule de Thoma entre lame et lamelle. Il est estimé que les cellules peuvent être comptées entre 2 et 10 millions de cellules/mL.

Au microscope, les grosses cellules bleues correspondent aux cellules mortes aplaties par la lamelle. Leur numération permettra de déterminer la viabilité des cellules. Les cellules blanchâtres de taille moyenne sont les cellules mononucléaires et les petites cellules correspondent aux plaquettes.

- Compter les cellules (pour les cellules placées sur les limites des carrés, ne compter que celles présentes 2 côtés sur 4).

Le nombre de cellules est déterminé par la formule suivante :

$\text{Nombre de cellules/mL} = \text{nombre de cellules comptées} \times 10^4 \times 2 \text{ (facteur de dilution du bleu Trypan)}$
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



## **Puces à protéines pour surnageants de culture cellulaire**

### **(RayBio Human Cytokine Array ; RayBiotech,Inc.)**

- Placer la membrane dans le support 8 puits (la marque "-" sur la membrane indique la face où les anticorps sont immunoabsorbés. Placer la marque vers le haut.)
- Diluer 1mL de 2X Blocking Buffer dans 1mL H<sub>2</sub>O distillée. Recouvrir la membrane.
- Incuber 30 min à température ambiante sous agitation légère.
- Remplacer le Blocking Buffer par 1mL de l'échantillon à doser.
- Incubation 1H40 à température ambiante sous agitation lente.
- Retirer les échantillons par aspiration à l'aide d'une micropipette.
- Diluer 900µl de Wash Buffer I dans 17,1mL H<sub>2</sub>O distillée.
- Diluer 600µl de Wash Buffer II dans 11,4mL H<sub>2</sub>O distillée.
- Faire 3 lavages de 5 min sous agitation avec 2mL de Wash Buffer I.
- Faire 2 lavages de 5 min sous agitation avec 2mL de Wash Buffer II.
- Préparer la solution d'anticorps primaires en mélangeant 4µl d'anticorps anti-cytokines dans 498µl de 2X Blocking Buffer + 498µl H<sub>2</sub>O distillée. Recouvrir la membrane.
- Incuber 1H30 à température ambiante sous agitation légère.
- Retirer la solution d'anticorps.
- Faire 3 lavages de 5 min sous agitation avec 2mL de Wash Buffer I.
- Faire 2 lavages de 5 min sous agitation avec 2mL de Wash Buffer II.
- Préparer la solution d'anticorps secondaires en mélangeant 2µl d'anticorps "HRP-conjugated streptavidin" dans 999µl de 2X Blocking Buffer + 999µl H<sub>2</sub>O distillée.
- Incuber 1H à température ambiante sous agitation légère.
- Faire 3 lavages de 5 min sous agitation avec 2mL de Wash Buffer I.
- Faire 2 lavages de 5 min sous agitation avec 2mL de Wash Buffer II.
- Préparer la solution de révélation en mélangeant 500µl de 1X Detection Buffer C et 500µl de 1X Detection Buffer D. Recouvrir la membrane.
- Incubation 5min à température ambiante sous agitation légère.
- Placer la membrane entre 2 feuilles de papier Wathman et presser légèrement pour retirer l'excès de liquide.
- Placer la membrane dans la cassette de développement photo, face "-" vers le haut sur un morceau de Saran scotché à la cassette.
- Recouvrir la membrane avec un morceau de Saran et le scotcher. Attention aux bulles !!!

En chambre noire :

- Poser un film photo sur la membrane.
- A l'aide d'un stylo, marquer les 4 coins de la membrane sur le film photo.
- Fermer la cassette de développement et laisser 1,2 ou 5 minutes de contact.
- Placer le film photo dans le révélateur en agitant le film à l'aide d'une pince jusqu'à ce que la ou les bandes d'intérêt commencent à apparaître.
- Passer ensuite le film dans de l'eau distillée puis dans le fixateur. Laisser la membrane quelques instants dans le fixateur afin de retirer le bruit de fond.
- Placer ensuite les films dans l'eau pour retirer le surplus de fixateur.
- Faire sécher les films.

## Amplification de l'ADN par PCR

- Décongeler les tubes de Tampon PCR 10X, de MgCl<sub>2</sub>, de dNTP, d'amorces et d'H<sub>2</sub>O ultrapure et les disposer dans la glace.
- Sortir les ADNc à tester du congélateur à -20°C.
- Les vortexer quelques secondes.

Sous la hotte :

- Préparer un nombre de tubes PCR de 0,2mL correspondant à celui des échantillons à tester.
- Préparer le pool PCR pour n+1 échantillons avec pour 1 échantillon :

Tampon PCR 10X <sup>(1)</sup>	5μL
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2,2μL
Amorce 3' anti-sens 10μM	1μL
Amorce 5' sens 10μM	1μL
dNTP 25mM	0,5μL
Taq Polymérase 5U/μL <sup>(2)</sup>	0,4μL
H <sub>2</sub> O ultrapure	qsp 50μL

N.B : ajouter la Taq Polymérase en dernier dans le pool.

- Vortexer.
- Déposer dans chaque tube PCR : 49μL du pool puis 1μL d'ADNc.
- Vortexer les tubes et les placer dans le I-Cycler (BioRad).
- Lancer le programme PCR désiré.

### Amorces utilisées :

Gènes ciblés	Sens	Séquence	Température d'hybridation	Nombre de cycles (N)
VEGF <sub>165</sub> et VEGF <sub>121</sub>	antisens	5' CCA TGA ACT TTC TGC TGT CTT 3'	56°C	30
	sens	5' TCG ATC GTT CTG TAT CAG TCT 3'		
GAPDH	antisens	5' GGG ATC TCG CTC CTG GAA GA 3'	60°C	30
	sens	5' TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA 3'		
VEGF total	antisens	5' CAC ACA GGA TGG CTT GAA GAT G 3'	58°C	40
	sens	5' GGA GGG CAG AAT CAT CAC GAA G 3'		
Gamma actine	antisens	5' AGG AAG GAA GGC TGG AAC3'	54°C	30
	sens	5' GCC AAC AGA GAG AAG ATG AC 3'		

## Programmes PCR :

	Température	Durée	
Dénaturation initiale	94°C	5min	
Dénaturation	94°C	1min	} N cycles
Hybridation	Spécifique de chaque amorce	1min	
Elongation	72°C	1min	
Terminaison de la réaction	72°C	10min	

---

<sup>(1)</sup> Tampon PCR 10X : 150mM Tris-HCl pH=8, 500mM KCl, 0,1% (v/v) Tween 20 (Eurogentec, Seraing, Belgique)

<sup>(2)</sup> Taq Polymérase : HotGoldstar™ (Eurogentec)

## Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose

- Préparer 1L de TBE 1X à partir de la solution TBE 10X<sup>(1)</sup>.
- Pour un petit gel, verser 50mL de TBE 1X dans tube Falcon de 50mL prévu à cet effet et transférer dans un erlen autoclavé (pour un grand gel, prévoir 140mL de TBE 1X).
- Peser 1g d'agarose (ou 2,8g pour un grand gel) que l'on ajoute dans l'erien.
- Chauffer à 200-250°C pour faire fondre l'agarose en remuant de temps en temps.
- Sortir le bleu de dépôt ADN du -20°C ainsi que les produits PCR à tester. Les placer dans la glace.
- Insérer le support dans la cuve puis le peigne.
- Dans l'erien avec l'agarose fondu, ajouter 2µL de BET (solution mère à 10mg/mL) pour 50mL d'agarose.
- Refroidir l'erien sous l'eau et verser l'agarose dans la cuve. S'il y a des bulles, prendre un cône et les déplacer vers les bords du gel. (N.B : en cas de fortes chaleurs, il est possible de mettre le gel à polymériser au froid).
- Vortexer les tubes d'échantillons.
- Lorsque le gel est polymérisé, retirer le peigne du gel et déposer le gel avec son support dans la cuve contenant du TBE 1X.
- Dans un eppendorf, déposer 4µL du bleu de dépôt ADN<sup>(2)</sup> et 20µL du produit PCR ou 4µL du marqueur de taille<sup>(3)</sup>.
- Déposer les échantillons dans les puits du gel.
- Migration à 70 volts (V) (jusqu'à 80V maxi pour un petit gel, 100V pour un grand gel) jusqu'à visualisation des bandes désirées.
- Les bandes sont observées par passage du gel sous lampe UV.

---

<sup>(1)</sup> Tampon TBE 10X : 890mM Tris-borate, 20mM EDTA (pH8)

<sup>(2)</sup> Bleu de dépôt ADN 6X : 0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol, 30% glycérol, qsp H2O DEPC.

<sup>(3)</sup> Marqueur de taille : Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas)

## **Culture cellulaire de la lignée THP-1**

### **Congélation des cellules THP-1**

Le milieu de congélation utilisé est le suivant : SVF 90%, DMSO 10% stérile et filtré 0.22µM.

- Placer les ampoules et le milieu de congélation dans la glace.
- A partir des cellules en cultures, effectuer une numération cellulaire puis les répartir en plusieurs ampoules de congélation pour avoir environ  $1.10^7$  cellules par mL.
- Centrifuger pendant 10min à 1500tr/min au froid, puis retirer le surnageant afin d'obtenir un culot sec.
- Reprendre les cellules dans 1,5mL maximum de milieu de congélation.
- Congéler à -80°C si les cellules doivent être utilisées dans les 6 mois, sinon conserver dans l'azote liquide.

### **Décongélation des cellules THP-1**

- La décongélation de l'ampoule conservée à -80°C contenant les cellules doit se faire très rapidement en s'aidant d'eau chaude.
- Dès que les cellules sont décongelées, nettoyer l'extérieur de l'ampoule à l'alcool et transférer les cellules dans 10mL de milieu de culture RPMI-1640.
- Centrifuger pendant 10min à 1500tr/min à 20°C SANS frein.
- Retirer le maximum de surnageant.
- Reprendre le culot dans le milieu de culture complet.

### **Mise en culture des cellules THP-1**

- Filtrer toutes les solutions (0,22µM) avant de les ajouter au RPMI-1640
- Milieu de culture THP-1 : à ajouter dans le RPMI-1640 sans glutamine :

10%	SVF (Eurobio) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30min.
1mM	Pyruvate de sodium (Cambrex)
2mM	L-Glutamine
50U/mL	Pénicilline
50U/mL	Streptomycine
10mM	Hepes (Sigma)
	Acides aminés non essentiels MEM (Invitrogen Corporation)

- Ensemencer les cellules à une densité d'environ 500000 cellules/mL de milieu de culture.

***Bibliographie***

1. Dessein, P.H., B.I. Joffe, and A.E. Stanwix, *High sensitivity C-reactive protein as a disease activity marker in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2004. **31**(6): p. 1095-7.
2. Asanuma, Y., et al., *Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2003. **349**(25): p. 2407-15.
3. Lowbeer, C., et al., *Elevated cardiac troponin T in peritoneal dialysis patients is associated with CRP and predicts all-cause mortality and cardiac death*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(12): p. 2178-83.
4. Friedland, J.S., et al., *Differential regulation of MMP-1/9 and TIMP-1 secretion in human monocytic cells in response to Mycobacterium tuberculosis*. Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 103-10.
5. Libby, P., D. Egan, and S. Skarlatos, *Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research*. Circulation, 1997. **96**(11): p. 4095-103.
6. Woo, P., J.R. Korenberg, and A.S. Whitehead, *Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1985. **260**(24): p. 13384-8.
7. Brull, D.J., et al., *Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(11): p. 2063-9.
8. Szalai, A.J., et al., *Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene*. Genes Immun, 2002. **3**(1): p. 14-9.
9. Zee, R.Y. and P.M. Ridker, *Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis*. Atherosclerosis, 2002. **162**(1): p. 217-9.
10. Ganapathi, M.K., et al., *Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in Hep 3B cells*. J Immunol, 1991. **147**(4): p. 1261-5.
11. Majello, B., et al., *Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter*. Embo J, 1990. **9**(2): p. 457-65.
12. Li, S.P. and N.D. Goldman, *Regulation of human C-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements*. Biochemistry, 1996. **35**(28): p. 9060-8.
13. Zhang, D., et al., *STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9503-9.
14. Agrawal, A., et al., *Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2378-84.
15. Cha-Molstad, H., et al., *The Rel family member P50 mediates cytokine-induced C-reactive protein expression by a novel mechanism*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4592-7.
16. Agrawal, A., et al., *A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3217-22.
17. Black, S., A. Agrawal, and D. Samols, *The phosphocholine and the polycation-binding sites on rabbit C-reactive protein are structurally and functionally distinct*. Mol Immunol, 2003. **39**(16): p. 1045-54.
18. Kinoshita, C.M., et al., *Elucidation of a protease-sensitive site involved in the binding of calcium to C-reactive protein*. Biochemistry, 1989. **28**(25): p. 9840-8.

19. Thompson, D., M.B. Pepys, and S.P. Wood, *The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine*. Structure Fold Des, 1999. **7**(2): p. 169-77.
20. Bach, B.A., H. Gewurz, and A.P. Osmand, *C-reactive protein in the rabbit: isolation, characterization and binding affinity to phosphocholine*. Immunochemistry, 1977. **14**(3): p. 215-9.
21. Black, S., I. Kushner, and D. Samols, *C-reactive Protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48487-90.
22. Volanakis, J.E., *Human C-reactive protein: expression, structure, and function*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 189-97.
23. Agrawal, A., et al., *Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3998-4004.
24. Das, T., et al., *Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 2): p. 345-55.
25. Zouki, C., et al., *Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5355-61.
26. Khreiss, T., et al., *Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells*. Circulation, 2004. **109**(16): p. 2016-22.
27. Khreiss, T., et al., *Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils*. Circ Res, 2005. **97**(7): p. 690-7.
28. Schwedler, S.B., et al., *Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1016-23.
29. Oroszlan, M., et al., *Proinflammatory changes in human umbilical cord vein endothelial cells can be induced neither by native nor by modified CRP*. Int Immunol, 2006. **18**(6): p. 871-8.
30. Jabs, W.J., et al., *Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1428-31.
31. Calabro, P., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1930-2.
32. Yasojima, K., et al., *Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease*. Brain Res, 2000. **887**(1): p. 80-9.
33. Dong, Q. and J.R. Wright, *Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4815-20.
34. Kuta, A.E. and L.L. Baum, *C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 321-6.
35. Jabs, W.J., et al., *The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 152-61.
36. Diehl, E.E., et al., *Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue*. Am J Med Sci, 2000. **319**(2): p. 79-83.
37. Hatanaka, K., et al., *Immunohistochemical localization of C-reactive protein-binding sites in human atherosclerotic aortic lesions by a modified streptavidin-biotin-staining method*. Pathol Int, 1995. **45**(9): p. 635-41.



38. Torzewski, J., et al., *C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(9): p. 1386-92.
39. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): p. 1039-51.
40. Zhang, Y.X., et al., *Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1999. **145**(2): p. 375-9.
41. Ridker, P.M., et al., *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(20): p. 1557-65.
42. Ridker, P.M., et al., *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(26): p. 1959-65.
43. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(12): p. 836-43.
44. Pradhan, A.D., et al., *Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study*. *Jama*, 2002. **288**(8): p. 980-7.
45. Albert, M.A. and P.M. Ridker, *Inflammatory biomarkers in African Americans: a potential link to accelerated atherosclerosis*. *Rev Cardiovasc Med*, 2004. **5 Suppl 3**: p. S22-7.
46. Cushman, M., et al., *Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study*. *Circulation*, 1999. **100**(7): p. 717-22.
47. Ridker, P.M., et al., *Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein*. *Circulation*, 1999. **100**(7): p. 713-6.
48. Meier-Ewert, H.K., et al., *Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects*. *Clin Chem*, 2001. **47**(3): p. 426-30.
49. Zahedi, K., et al., *Binding of human C-reactive protein to mouse macrophages is mediated by distinct receptors*. *J Immunol*, 1989. **142**(7): p. 2384-92.
50. Zeller, J.M., B.M. Kubak, and H. Gewurz, *Binding sites for C-reactive protein on human monocytes are distinct from IgG Fc receptors*. *Immunology*, 1989. **67**(1): p. 51-5.
51. Kilpatrick, J.M. and J.E. Volanakis, *Opsonic properties of C-reactive protein. Stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein-coated cells*. *J Immunol*, 1985. **134**(5): p. 3364-70.
52. Stein, M.P., et al., *C-reactive protein binding to Fc gamma RIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(3): p. 369-76.
53. Flesch, B.K., G. Aichert, and J. Neppert, *Inhibition of monocyte and polymorphonuclear granulocyte immune phagocytosis by monoclonal antibodies specific for Fc gamma RI, II and III*. *Ann Hematol*, 1997. **74**(1): p. 15-22.
54. Chi, M., et al., *C-reactive protein induces signaling through Fc gamma RIIa on HL-60 granulocytes*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1413-8.
55. Crowell, R.E., et al., *C-reactive protein receptors on the human monocytic cell line U-937. Evidence for additional binding to Fc gamma RI*. *J Immunol*, 1991. **147**(10): p. 3445-51.
56. Torzewski, M., et al., *C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(9): p. 2094-9.

57. Hundt, M., M. Zielinska-Skowronek, and R.E. Schmidt, *Lack of specific receptors for C-reactive protein on white blood cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(12): p. 3475-83.
58. Escribano-Burgos, M., et al., *Effect of C-reactive protein on Fc gamma receptor II in cultured bovine endothelial cells*. Clin Sci (Lond), 2004.
59. Bharadwaj, D., et al., *The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 585-90.
60. Bodman-Smith, K.B., et al., *C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (FcgammaRI)*. Immunology, 2002. **107**(2): p. 252-60.
61. Marnell, L.L., et al., *C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 2185-93.
62. Bang, R., et al., *Analysis of binding sites in human C-reactive protein for Fcgamma RI, Fcgamma RIIa and C1q by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 2005.
63. Tax, W.J., et al., *Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: polymorphism and role in antibody-induced T cell proliferation*. J Immunol, 1984. **133**(3): p. 1185-9.
64. Rodriguez, J.A., K.B. Bodman-Smith, and J.G. Raynes, *Neutrophil responses to CRP are not dependent on polymorphism of human FcgammaRIIA (R131H)*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 271-7.
65. van der Meer, I.M., et al., *Genetic variation in Fcgamma receptor IIa protects against advanced peripheral atherosclerosis. The Rotterdam Study*. Thromb Haemost, 2004. **92**(6): p. 1273-6.
66. Verma, S., P.E. Szmitko, and E.T. Yeh, *C-reactive protein: structure affects function*. Circulation, 2004. **109**(16): p. 1914-7.
67. Culley, F.J., et al., *C-reactive protein binds to a novel ligand on Leishmania donovani and increases uptake into human macrophages*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4691-6.
68. Nauta, A.J., et al., *Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins*. Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 148-54.
69. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
70. Chang, M.K., et al., *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13043-8.
71. Tomasz, A., *Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of Pneumococcus: chanin formation, loss of transformability, and loss of autolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **59**(1): p. 86-93.
72. Siegel, J., et al., *Interactions of C-reactive protein with the complement system. II. C-reactive protein-mediated consumption of complement by poly-L-lysine polymers and other polycations*. J Exp Med, 1975. **142**(3): p. 709-21.
73. Potempa, L.A., J.N. Siegel, and H. Gewurz, *Binding reactivity of C-reactive protein for polycations. II. Modulatory effects of calcium and phosphocholine*. J Immunol, 1981. **127**(4): p. 1509-14.
74. Du Clos, T.W., L.T. Zlock, and R.L. Rubin, *Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin*. J Immunol, 1988. **141**(12): p. 4266-70.
75. Mori, S., Y. Nakata, and H. Endo, *Involvements of fibronectin and lysophosphatidylcholine for selective binding of C-reactive protein*. Cell Mol Biol, 1991. **37**(4): p. 421-31.
76. Das, T. and C. Mandal, *Protein A - a new ligand for human C-reactive protein*. FEBS Lett, 2004. **576**(1-2): p. 107-13.

77. Lagrand, W.K., et al., *C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?* Circulation, 1999. **100**(1): p. 96-102.
78. Jarva, H., et al., *Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11.* J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3957-62.
79. Suankratay, C., et al., *Complement regulation in innate immunity and the acute-phase response: inhibition of mannan-binding lectin-initiated complement cytolysis by C-reactive protein (CRP).* Clin Exp Immunol, 1998. **113**(3): p. 353-9.
80. Li, S.H., et al., *C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells.* Circulation, 2004. **109**(7): p. 833-6.
81. Szalai, A.J., D.E. Briles, and J.E. Volanakis, *Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from Streptococcus pneumoniae.* Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4850-3.
82. Mortensen, R.F. and W. Zhong, *Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 495-500.
83. Mold, C., R. Baca, and T.W. Du Clos, *Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fcgamma receptors.* J Autoimmun, 2002. **19**(3): p. 147-54.
84. Bodman-Smith, K.B., et al., *FcgammaRIIIa expression with FcgammaRI results in C-reactive protein- and IgG-mediated phagocytosis.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1029-35.
85. Favoreel, H.W., et al., *Virus complement evasion strategies.* J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 1): p. 1-15.
86. Gotto, A.M., Jr., H.J. Pownall, and R.J. Havel, *Introduction to the plasma lipoproteins.* Methods Enzymol, 1986. **128**: p. 3-41.
87. van Berkel, T.J., et al., *LDL receptor-independent and -dependent uptake of lipoproteins.* Atherosclerosis, 1995. **118 Suppl**: p. S43-50.
88. Taskinen, M.R. and T. Kuusi, *Enzymes involved in triglyceride hydrolysis.* Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1987. **1**(3): p. 639-66.
89. Beisiegel, U., *Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism.* Curr Opin Lipidol, 1995. **6**(3): p. 117-22.
90. Brewer, H.B., Jr., *High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(3): p. 387-91.
91. Pepys, M.B., I.F. Rowe, and M.L. Baltz, *C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins.* Int Rev Exp Pathol, 1985. **27**: p. 83-111.
92. Taskinen, S., et al., *Binding of C-reactive protein to modified low-density-lipoprotein particles: identification of cholesterol as a novel ligand for C-reactive protein.* Biochem J, 2002. **367**(Pt 2): p. 403-12.
93. Bhakdi, S., et al., *Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence.* Circulation, 2004. **109**(15): p. 1870-6.
94. Zwaka, T.P., V. Hombach, and J. Torzewski, *C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis.* Circulation, 2001. **103**(9): p. 1194-7.
95. Koenig, W., *Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein.* Int J Cardiol, 2005. **98**(2): p. 199-206.
96. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.* Circulation, 2000. **101**(15): p. 1767-72.

97. Liuzzo, G., et al., *The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina*. N Engl J Med, 1994. **331**(7): p. 417-24.
98. Biasucci, L.M., et al., *Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability*. Circulation, 1999. **99**(7): p. 855-60.
99. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 391-7.
100. Ridker, P.M., *Inflammatory biomarkers, statins, and the risk of stroke: cracking a clinical conundrum*. Circulation, 2002. **105**(22): p. 2583-5.
101. Albert, C.M., et al., *Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death*. Circulation, 2002. **105**(22): p. 2595-9.
102. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease*. Jama, 2001. **285**(19): p. 2481-5.
103. Blake, G.J. and P.M. Ridker, *C-reactive protein and prognosis after percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2002. **23**(12): p. 923-5.
104. Rifai, N. and P.M. Ridker, *High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease*. Clin Chem, 2001. **47**(3): p. 403-11.
105. Ridker, P.M., *Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 363-9.
106. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. Jama, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
107. Ridker, P.M., et al., *Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events*. Circulation, 2004. **109**(25 Suppl 1): p. IV6-19.
108. Folsom, A.R., et al., *Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Circulation, 1997. **96**(4): p. 1102-8.
109. Sweetnam, P.M., et al., *Total and differential leukocyte counts as predictors of ischemic heart disease: the Caerphilly and Speedwell studies*. Am J Epidemiol, 1997. **145**(5): p. 416-21.
110. Bauersachs, R.M., et al., *Flow resistance of individual neutrophils in coronary artery disease: decreased pore transit times in acute myocardial infarction*. Heart, 1997. **77**(1): p. 18-23.
111. Heeschen, C., et al., *Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis*. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina REfractory to standard treatment trial. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(6): p. 1535-42.
112. Kaftan, A.H. and O. Kaftan, *Coronary artery disease and infection with chlamydia pneumonia*. Jpn Heart J, 2000. **41**(2): p. 165-72.
113. Kovanen, P.T., et al., *Prediction of myocardial infarction in dyslipidemic men by elevated levels of immunoglobulin classes A, E, and G, but not M*. Arch Intern Med, 1998. **158**(13): p. 1434-9.
114. Mazzone, A., et al., *Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease*. Atherosclerosis, 1999. **145**(2): p. 369-74.

115. Muscari, A., et al., *Relationship of serum C3 to fasting insulin, risk factors and previous ischaemic events in middle-aged men*. Eur Heart J, 2000. **21**(13): p. 1081-90.
116. Liuzzo, G., et al., *Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina*. Circulation, 1998. **98**(22): p. 2370-6.
117. Simon, A.D., et al., *Circulating levels of IL-1beta, a prothrombotic cytokine, are elevated in unstable angina versus stable angina*. J Thromb Thrombolysis, 2000. **9**(3): p. 217-22.
118. Biasucci, L.M., et al., *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2079-84.
119. Caligiuri, G., et al., *Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(5): p. 1295-304.
120. Blankenberg, S., et al., *Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME)*. Circulation, 2003. **108**(20): p. 2453-9.
121. Jager, A., et al., *Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Hoorn study*. Diabetes, 2000. **49**(3): p. 485-91.
122. Ridker, P.M., J.E. Buring, and N. Rifai, *Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events*. Circulation, 2001. **103**(4): p. 491-5.
123. Kugiyama, K., et al., *Increase in plasma levels of secretory type II phospholipase A(2) in patients with coronary spastic angina*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(1): p. 159-65.
124. Packard, C.J., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group*. N Engl J Med, 2000. **343**(16): p. 1148-55.
125. Gurfinkel, E.P., et al., *Serum neopterin levels and the angiographic extent of coronary arterial narrowing in unstable angina pectoris and in non-Q-wave acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1999. **83**(4): p. 515-8.
126. Bayes-Genis, A., et al., *Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2001. **345**(14): p. 1022-9.
127. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1104-11.
128. Schonbeck, U., et al., *Soluble CD40L and cardiovascular risk in women*. Circulation, 2001. **104**(19): p. 2266-8.
129. Inokubo, Y., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome*. Am Heart J, 2001. **141**(2): p. 211-7.
130. Noji, Y., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis*. Clin Chem Lab Med, 2001. **39**(5): p. 380-4.
131. Kai, H., et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(2): p. 368-72.
132. Ikonomidis, I., et al., *Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin*. Circulation, 1999. **100**(8): p. 793-8.
133. Zhang, R., et al., *Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease*. Jama, 2001. **286**(17): p. 2136-42.
134. Handy, D.E. and J. Loscalzo, *Homocysteine and atherothrombosis: diagnosis and treatment*. Curr Atheroscler Rep, 2003. **5**(4): p. 276-83.

135. Guillard, J.C., et al., [*Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 2. Epidemiological data*]. *Pathol Biol (Paris)*, 2003. **51**(2): p. 111-21.
136. Ridker, P.M., et al., *Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events*. *Circulation*, 2002. **105**(15): p. 1776-9.
137. Ariyo, A.A., C. Thach, and R. Tracy, *Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(22): p. 2108-15.
138. Collet, J.P., et al., *Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality*. *Circulation*, 2003. **108**(4): p. 391-4.
139. Morrow, D.A., et al., *Cardiac troponin I for stratification of early outcomes and the efficacy of enoxaparin in unstable angina: a TIMI-11B substudy*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **36**(6): p. 1812-7.
140. de Lemos, J.A., et al., *The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(14): p. 1014-21.
141. Zethelius, B., et al., *Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(20): p. 2107-16.
142. Barnes, M.J., L.F. Morton, and C.I. Levene, *Synthesis of collagens types I and III by pig medial smooth muscle cells in culture*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. **70**(2): p. 339-47.
143. Stary, H.C., *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(5): p. 1177-8.
144. Stary, H.C., *Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries*. *Basic Res Cardiol*, 1994. **89 Suppl 1**: p. 17-32.
145. Burke, A.P., et al., *34th Bethesda Conference: Task force #2--What is the pathologic basis for new atherosclerosis imaging techniques?* *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(11): p. 1874-86.
146. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
147. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
148. Stary, H.C., *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults*. *Arteriosclerosis*, 1989. **9**(1 Suppl): p. I19-32.
149. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med*, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
150. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. *Arteriosclerosis*, 1986. **6**(2): p. 131-8.
151. Labarrere, C.A. and G.P. Zaloga, *C-reactive protein: from innocent bystander to pivotal mediator of atherosclerosis*. *Am J Med*, 2004. **117**(7): p. 499-507.
152. Boren, J., et al., *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(12): p. 2658-64.

153. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
154. Steinberg, D., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis*. Circulation, 1997. **95**(4): p. 1062-71.
155. Lusis, A.J., R. Mar, and P. Pajukanta, *Genetics of atherosclerosis*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2004. **5**: p. 189-218.
156. Upston, J.M., et al., *Oxidation of free fatty acids in low density lipoprotein by 15-lipoxygenase stimulates nonenzymic, alpha-tocopherol-mediated peroxidation of cholesteryl esters*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30067-74.
157. Marathe, S., et al., *Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2648-58.
158. Leitinger, N., et al., *Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 2. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1291-8.
159. Ivandic, B., et al., *Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1284-90.
160. Osterud, B. and E. Bjorklid, *Role of monocytes in atherogenesis*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1069-112.
161. Krishnaswamy, G., et al., *Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(2): p. 91-104.
162. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *Cytokines and endothelial cell biology*. Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 427-51.
163. Allen, S., et al., *Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 1064-75.
164. Kowala, M.C., et al., *Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE*. Atherosclerosis, 2000. **149**(2): p. 323-30.
165. Shi, W., et al., *Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice*. Circulation, 2000. **102**(1): p. 75-81.
166. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
167. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 275-81.
168. Fan, J., et al., *Role of endothelin-1 in atherosclerosis*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 84-93; discussion 93-4.
169. Sanz, M.J., et al., *Endothelin-1 causes P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion within rat mesenteric microvessels*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. H1823-30.
170. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky, *Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1149-58.

171. Weber, C. and T.A. Springer, *Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration.* J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6825-34.
172. Shih, P.T., et al., *Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet.* Circ Res, 1999. **84**(3): p. 345-51.
173. Watanabe, T. and J. Fan, *Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis.* Int J Cardiol, 1998. **66 Suppl 1**: p. S45-53; discussion S55.
174. Muller, W.A., *The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo.* J Leukoc Biol, 1995. **57**(4): p. 523-8.
175. Reape, T.J. and P.H. Groot, *Chemokines and atherosclerosis.* Atherosclerosis, 1999. **147**(2): p. 213-25.
176. Murohara, T., R. Scalia, and A.M. Lefer, *Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors.* Circ Res, 1996. **78**(5): p. 780-9.
177. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.* Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
178. Tontonoz, P., et al., *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.* Cell, 1998. **93**(2): p. 241-52.
179. Wayner, E.A., et al., *Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin.* J Cell Biol, 1989. **109**(3): p. 1321-30.
180. Guan, J.L. and R.O. Hynes, *Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1.* Cell, 1990. **60**(1): p. 53-61.
181. Schonbeck, U. and P. Libby, *CD40 signaling and plaque instability.* Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1092-103.
182. van Kooten, C. and J. Banchereau, *Immune regulation by CD40-CD40-L interactions.* Front Biosci, 1997. **2**: p. d1-11.
183. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.* Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
184. Seder, R.A., et al., *Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10188-92.
185. Agnello, D., et al., *Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights.* J Clin Immunol, 2003. **23**(3): p. 147-61.
186. Linton, M.F. and S. Fazio, *Macrophages, inflammation, and atherosclerosis.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S35-40.
187. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses.* Immunol Today, 1996. **17**(9): p. 410-4.
188. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines.* Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 33-43.
189. Ribbens, C., J.M. Dayer, and C. Chizzolini, *CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but may not be sufficient for human T helper 1 cell induction of interleukin-2- or interleukin-15-driven, contact-dependent, interleukin-1beta production by monocytes.* Immunology, 2000. **99**(2): p. 279-86.



190. Lee, T.S., et al., *The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(3): p. 734-42.
191. Denger, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 1999. **144**(1): p. 15-23.
192. Abi-Younes, S., et al., *The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. 131-8.
193. Carmeliet, P., *Proteinases in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy?* *J Clin Invest*, 2000. **105**(11): p. 1519-20.
194. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
195. Herman, M.P., et al., *Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling*. *Circulation*, 2001. **104**(16): p. 1899-904.
196. Sukhova, G.K., et al., *Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques*. *Circulation*, 1999. **99**(19): p. 2503-9.
197. Okada, Y., et al., *Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(30): p. 21712-9.
198. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 463-516.
199. Woessner, J.F., Jr., *Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **878**: p. 388-403.
200. Chase, A.J. and A.C. Newby, *Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling*. *J Vasc Res*, 2003. **40**(4): p. 329-43.
201. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. *Circ Res*, 2002. **90**(3): p. 251-62.
202. Schonbeck, U., et al., *CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(1): p. 7-14.
203. Mach, F., et al., *Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor*. *Circulation*, 1997. **96**(2): p. 396-9.
204. Nakata, A., et al., *CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(5): p. 1333-9.
205. Gough, P.J., et al., *Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(3): p. 461-71.
206. Dhaliwal, B.S. and U.P. Steinbrecher, *Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins*. *Clin Chim Acta*, 1999. **286**(1-2): p. 191-205.
207. Panousis, C.G. and S.H. Zuckerman, *Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(6): p. 1565-71.
208. Gerhard, G.T. and P.B. Duell, *Homocysteine and atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol*, 1999. **10**(5): p. 417-28.

209. Raines, E.W., *The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(3): p. 173-82.
210. Watson, K.E., et al., *TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2106-13.
211. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
212. Mallat, Z., et al., *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity*. Circulation, 1999. **99**(3): p. 348-53.
213. Cyrus, T., et al., *Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(18): p. 2277-82.
214. Harats, D., et al., *Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(9): p. 2100-5.
215. Detmers, P.A., et al., *Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3430-5.
216. Behr-Roussel, D., et al., *Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*. Circulation, 2000. **102**(9): p. 1033-8.
217. Song, L. and C. Schindler, *IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2004. **177**(1): p. 43-51.
218. von der Thusen, J.H., et al., *Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): p. 133-66.
219. Dong, Z.M., et al., *The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 145-52.
220. Ramos, C.L., et al., *Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice*. Circ Res, 1999. **84**(11): p. 1237-44.
221. Manka, D., et al., *Absence of p-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(7): p. 1000-5.
222. Methia, N., et al., *Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1424-8.
223. Aiello, R.J., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(6): p. 1518-25.
224. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 773-8.
225. Namiki, M., et al., *Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 115-20.
226. Reckless, J., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions*. Circulation, 1999. **99**(17): p. 2310-6.
227. Dawson, T.C., et al., *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Atherosclerosis, 1999. **143**(1): p. 205-11.

228. Qiao, J.H., et al., *Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(5): p. 1687-99.
229. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. *Nature*, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
230. Sakaguchi, H., et al., *Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice*. *Lab Invest*, 1998. **78**(4): p. 423-34.
231. de Winther, M.P., et al., *Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice*. *Atherosclerosis*, 1999. **144**(2): p. 315-21.
232. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. 1049-56.
233. Li, A.C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(4): p. 523-31.
234. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. *Mol Cell*, 2001. **7**(1): p. 161-71.
235. Schonbeck, U., et al., *Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(13): p. 7458-63.
236. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. *Nat Med*, 1999. **5**(11): p. 1313-6.
237. Gupta, S., et al., *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(11): p. 2752-61.
238. Galis, Z.S., et al., *Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling*. *Circ Res*, 2002. **91**(9): p. 852-9.
239. Matsumura, S., et al., *Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 599-609.
240. Trion, A., et al., *No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E\*3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1635-40.
241. Hirschfield, G.M., et al., *Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005.
242. Reifenberg, K., et al., *Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1641-6.
243. Nilsson, J., *CRP--marker or maker of cardiovascular disease?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1527-8.
244. Tomai, F., et al., *Elevated C-reactive protein levels and coronary microvascular dysfunction in patients with coronary artery disease*. *Eur Heart J*, 2005.
245. Venugopal, S.K., et al., *Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells*. *Circulation*, 2002. **106**(12): p. 1439-41.
246. Suh, W., et al., *C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**(1): p. 65-71.
247. Verma, S., et al., *A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis*. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 913-9.

248. Jialal, I., S. Devaraj, and S.K. Venugopal, *C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?* Hypertension, 2004. **44**(1): p. 6-11.
249. Cooke, C.L. and S.T. Davidge, *Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells.* Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(2): p. C395-402.
250. Zou, M., C. Martin, and V. Ullrich, *Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite.* Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 707-13.
251. Devaraj, S., P.R. Kumaresan, and I. Jialal, *Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(3): p. 405-10.
252. Verma, S., et al., *Hyperglycemia potentiates the proatherogenic effects of C-reactive protein: reversal with rosiglitazone.* J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 417-9.
253. Blann, A.D. and G.Y. Lip, *Effects of C-reactive protein on the release of von Willebrand factor, E-selectin, thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 from human umbilical vein endothelial cells.* Blood Coagul Fibrinolysis, 2003. **14**(4): p. 335-40.
254. Devaraj, S., D.Y. Xu, and I. Jialal, *C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis.* Circulation, 2003. **107**(3): p. 398-404.
255. Verma, S., et al., *Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein.* Circulation, 2002. **105**(16): p. 1890-6.
256. Mantovani, A., S. Sozzani, and M. Introna, *Endothelial activation by cytokines.* Ann N Y Acad Sci, 1997. **832**: p. 93-116.
257. Lin, R., et al., *C-Reactive Protein-Induced Expression of CD40-CD40L and the Effect of Lovastatin and Fenofibrate on It in Human Vascular Endothelial Cells.* Biol Pharm Bull, 2004. **27**(10): p. 1537-1543.
258. Verma, S., et al., *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease.* Circulation, 2004. **109**(17): p. 2058-67.
259. van den Berg, C.W., K.E. Taylor, and D. Lang, *C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(10): p. e168-71.
260. van den Berg, C.W. and K.E. Taylor, *Letter regarding article by li et Al, "C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells".* Circulation, 2004. **110**(25): p. e542.
261. Taylor, K.E., J.C. Giddings, and C.W. van den Berg, *C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1225-30.
262. Liu, C., et al., *Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation.* Circ Res, 2005. **97**(2): p. 135-43.
263. Nagoshi, Y., et al., *Effects of C-reactive protein on atherogenic mediators and adrenomedullin in human coronary artery endothelial and smooth muscle cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(4): p. 1057-63.
264. Nerurkar, S.S., et al., *Lipopolysaccharide (LPS) contamination plays the real role in C-reactive protein-induced IL-6 secretion from human endothelial cells in vitro.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. e136.

265. Wang, C.H., et al., *C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle*. *Circulation*, 2003. **107**(13): p. 1783-90.
266. Hattori, Y., M. Matsumura, and K. Kasai, *Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein*. *Cardiovasc Res*, 2003. **58**(1): p. 186-95.
267. Ikeda, U., et al., *C-Reactive protein augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes*. *Cardiovasc Res*, 2002. **56**(1): p. 86-92.
268. Ikeda, U., M. Takahashi, and K. Shimada, *C-reactive protein directly inhibits nitric oxide production by cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003. **42**(5): p. 607-11.
269. Lafuente, N., et al., *Evidence for sodium azide as an artifact mediating the modulation of inducible nitric oxide synthase by C-reactive protein*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005. **45**(3): p. 193-6.
270. Swafford, A.N., Jr., et al., *C-reactive protein does not relax vascular smooth muscle: effects mediated by sodium azide in commercially available preparations*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(4): p. H1786-95.
271. Jones, S.A., et al., *C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding*. *J Exp Med*, 1999. **189**(3): p. 599-604.
272. Ballou, S.P. and G. Lozanski, *Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein*. *Cytokine*, 1992. **4**(5): p. 361-8.
273. Lim, M.Y., et al., *p38 Inhibition attenuates the pro-inflammatory response to C-reactive protein by human peripheral blood mononuclear cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(6): p. 1111-4.
274. Ratnam, S. and S. Mookerjee, *The regulation of superoxide generation and nitric oxide synthesis by C-reactive protein*. *Immunology*, 1998. **94**(4): p. 560-8.
275. Woollard, K.J., D.C. Phillips, and H.R. Griffiths, *Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(2): p. 256-62.
276. Han, K.H., et al., *C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes*. *Circulation*, 2004. **109**(21): p. 2566-71.
277. Williams, T.N., et al., *C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway: an implication of CRP involvement in plaque destabilization*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(1): p. 61-6.
278. Paffen, E., H.L. Vos, and R.M. Bertina, *C-reactive protein does not directly induce tissue factor in human monocytes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(5): p. 975-81.
279. Nakagomi, A., S.B. Freedman, and C.L. Geczy, *Interferon-gamma and lipopolysaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by C-reactive protein: relationship with age, sex, and hormone replacement treatment*. *Circulation*, 2000. **101**(15): p. 1785-91.
280. Albert, M.A., et al., *Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study*. *Jama*, 2001. **286**(1): p. 64-70.
281. Pan, W., et al., *Statins are associated with a reduced incidence of perioperative mortality after coronary artery bypass graft surgery*. *Circulation*, 2004. **110**(11 Suppl 1): p. II45-9.

282. Balk, E.M., et al., *Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review*. *Ann Intern Med*, 2003. **139**(8): p. 670-82.
283. Ridker, P.M., N. Rifai, and S.P. Lowenthal, *Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia*. *Circulation*, 2001. **103**(9): p. 1191-3.
284. Ridker, P.M., et al., *Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. *Circulation*, 1999. **100**(3): p. 230-5.
285. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(1): p. 20-8.
286. Ridker, P.M., et al., *Relative efficacy of atorvastatin 80 mg and pravastatin 40 mg in achieving the dual goals of low-density lipoprotein cholesterol <70 mg/dl and C-reactive protein <2 mg/l: an analysis of the PROVE-IT TIMI-22 trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(10): p. 1644-8.
287. Kleemann, R., et al., *Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation*. *Blood*, 2003. **101**(2): p. 545-51.
288. Jonkers, I.J., et al., *Severe hypertriglyceridemia with insulin resistance is associated with systemic inflammation: reversal with bezafibrate therapy in a randomized controlled trial*. *Am J Med*, 2002. **112**(4): p. 275-80.
289. Pasceri, V., et al., *Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs*. *Circulation*, 2001. **103**(21): p. 2531-4.
290. Haffner, S.M., et al., *Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Circulation*, 2002. **106**(6): p. 679-84.
291. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(14): p. 973-9.
292. Joynt, K.E., et al., *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors, beta blockers, statins, and aspirin on C-reactive protein levels in outpatients with heart failure*. *Am J Cardiol*, 2004. **93**(6): p. 783-5.
293. Feldman, M., et al., *Effects of low-dose aspirin on serum C-reactive protein and thromboxane B2 concentrations: a placebo-controlled study using a highly sensitive C-reactive protein assay*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **37**(8): p. 2036-41.
294. Aggarwal, A., et al., *Comparison of effects of abciximab versus eptifibatide on C-reactive protein, interleukin-6, and interleukin-1 receptor antagonist after coronary arterial stenting*. *Am J Cardiol*, 2003. **91**(11): p. 1346-9.
295. Cha, J.K., et al., *Changes in platelet P-selectin and in plasma C-reactive protein in acute atherosclerotic ischemic stroke treated with a loading dose of clopidogrel*. *J Thromb Thrombolysis*, 2002. **14**(2): p. 145-50.
296. London, G.M., et al., *Inflammation, arteriosclerosis, and cardiovascular therapy in hemodialysis patients*. *Kidney Int Suppl*, 2003(84): p. S88-93.
297. Dandona, P., et al., *Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(9): p. 4496-501.
298. Yasunari, K., et al., *Comparative effects of valsartan versus amlodipine on left ventricular mass and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive*

- patients with left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(11): p. 2116-23.
299. Koh, K.K., et al., *Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **42**(5): p. 905-10.
300. Beattie, M.S., et al., *C-reactive protein and ischemia in users and nonusers of beta-blockers and statins: data from the Heart and Soul Study*. *Circulation*, 2003. **107**(2): p. 245-50.
301. Anzai, T., et al., *Early use of beta-blockers is associated with attenuation of serum C-reactive protein elevation and favorable short-term prognosis after acute myocardial infarction*. *Cardiology*, 2003. **99**(1): p. 47-53.
302. Atar, I., et al., *The effects of prior beta-blocker therapy on serum C-reactive protein levels after percutaneous coronary intervention*. *Clin Cardiol*, 2005. **28**(5): p. 243-6.
303. Mitrovic, V., et al., *Influence of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril on high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in patients with documented atherosclerosis*. *Z Kardiol*, 2005. **94**(5): p. 336-42.
304. Cesari, M., et al., *Sarcopenia, obesity, and inflammation--results from the Trial of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors study*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(2): p. 428-34.
305. Tchernof, A., et al., *Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women*. *Circulation*, 2002. **105**(5): p. 564-9.
306. Pischon, T., et al., *Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women*. *Circulation*, 2003. **108**(2): p. 155-60.
307. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
308. Nabata, A., et al., *C-reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrix metalloproteinase-9 production in human mononuclear cells: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque*. *Atherosclerosis*, 2008. **196**(1): p. 129-35.
309. Singh, U., et al., *Human C-reactive protein promotes oxidized low-density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in wistar rats*. *J Lipid Res*, 2008.
310. Dasu, M.R., et al., *The biological effects of CRP are not attributable to endotoxin contamination: evidence from TLR4 knockdown human aortic endothelial cells*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(3): p. 509-12.
311. Pepys, M.B., et al., *Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself*. *Circ Res*, 2005. **97**(11): p. e97-103.
312. Robertson, A.K. and G.K. Hansson, *T cells in atherogenesis: for better or for worse?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(11): p. 2421-32.
313. Devaraj, S., T.W. Du Clos, and I. Jialal, *Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(7): p. 1359-63.
314. Yeh, E.T., et al., *C-reactive protein: linking inflammation to cardiovascular complications*. *Circulation*, 2001. **104**(9): p. 974-5.
315. Reynolds, G.D. and R.P. Vance, *C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas*. *Arch Pathol Lab Med*, 1987. **111**(3): p. 265-9.
316. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
317. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 435-9.

318. Gerber, H.P., et al., *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 623-8.
319. Phillips, H.S., et al., *Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum*. Endocrinology, 1990. **127**(2): p. 965-7.
320. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **107**(1-3): p. 233-5.
321. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
322. Aiello, L.P., et al., *Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10457-61.
323. Adamis, A.P., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(1): p. 66-71.
324. Kovacs, Z., et al., *VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct*. Stroke, 1996. **27**(10): p. 1865-72; discussion 1872-3.
325. Ferrara, N., et al., *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1881-93.
326. Moulton, K.S., et al., *Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4736-41.
327. Bayer, I.M., et al., *Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum*. Cell Tissue Res, 2002. **307**(3): p. 303-13.
328. O'Brien, K.D., et al., *Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content*. Circulation, 1996. **93**(4): p. 672-82.
329. Lee, S.S., et al., *Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2001. **19**(3): p. 321-4.
330. Soeki, T., et al., *Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction*. Cardiology, 2000. **93**(3): p. 168-74.
331. Alexandrakis, M.G., et al., *Relationship between circulating serum soluble interleukin-6 receptor and the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in multiple myeloma*. Ann Hematol, 2003. **82**(1): p. 19-23.
332. Rutanen, J., et al., *Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p. 971-9.
333. Belgore, F., et al., *Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries*. J Clin Pathol, 2004. **57**(3): p. 266-72.
334. Pakala, R., T. Watanabe, and C.R. Benedict, *Induction of endothelial cell proliferation by angiogenic factors released by activated monocytes*. Cardiovasc Radiat Med, 2002. **3**(2): p. 95-101.
335. Nakano, T., et al., *Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries*. Hum Pathol, 2005. **36**(4): p. 330-40.
336. Ramos, M.A., et al., *Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(7): p. 1188-96.



337. Lee, S., et al., *Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 681-91.
338. Doronzo, G., et al., *Sodium azide in commercially available C-reactive protein preparations does not influence matrix metalloproteinase-2 synthesis and release in cultured human aortic vascular smooth muscle cells*. Clin Chem, 2006. **52**(6): p. 1200-1.
339. Varney, M.L., et al., *Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(11): p. 674-83.
340. Sakuta, T., et al., *Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1*. J Med Microbiol, 2001. **50**(3): p. 233-7.
341. Du, M., et al., *VEGF gene expression is regulated post-transcriptionally in macrophages*. Febs J, 2006. **273**(4): p. 732-45.
342. Itaya, H., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide*. Thromb Haemost, 2001. **85**(1): p. 171-6.
343. Trisciuglio, D., et al., *Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4153-62.
344. Kim, H.J. and T.Y. Kim, *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-II in human keratinocytes, differential involvement of mitogen-activated protein kinases and feedback inhibition of protein kinase C*. Br J Dermatol, 2005. **152**(3): p. 418-25.
345. Kawaguchi, M., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1beta*. Surgery, 2004. **136**(3): p. 686-92.
346. Chang, H.J., et al., *Extracellular signal-regulated kinases and AP-1 mediate the up-regulation of vascular endothelial growth factor by PDGF in human vascular smooth muscle cells*. Int J Oncol, 2006. **28**(1): p. 135-41.
347. Tanabe, K., et al., *Possible involvement of p44/p42 MAP kinase in retinoic acid-stimulated vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2004. **175**(2): p. 245-51.
348. Hong, K.H., J. Ryu, and K.H. Han, *Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A*. Blood, 2004.
349. Salomonsson, L., et al., *Post-transcriptional regulation of VEGF expression by oxidised LDL in human macrophages*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(10): p. 767-74.
350. Anand, R.J., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor production by Leydig cells in vitro: the role of protein kinase A and mitogen-activated protein kinase cascade*. Biol Reprod, 2003. **68**(5): p. 1663-73.
351. Kiriakidis, S., et al., *VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 665-74.
352. Pages, G. and J. Pouyssegur, *Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 564-73.
353. Fleit, H.B. and C.D. Kobasiuk, *The human monocyte-like cell line THP-1 expresses Fc gamma RI and Fc gamma RII*. J Leukoc Biol, 1991. **49**(6): p. 556-65.

354. Alonso, A., et al., *Stimulation of Fc gamma R receptors induces monocyte chemoattractant protein-1 in the human monocytic cell line THP-1 by a mechanism involving I kappa B-alpha degradation and formation of p50/p65 NF-kappa B/Rel complexes*. *Int Immunol*, 2000. **12**(4): p. 547-54.
355. Fernandez, N., M. Renedo, and M. Sanchez Crespo, *FcgammaR receptors activate MAP kinase and up-regulate the cyclooxygenase pathway without increasing arachidonic acid release in monocytic cells*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(2): p. 383-92.
356. Huang, Y., et al., *Oxidized LDL-containing immune complexes induce Fc gamma receptor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation in THP-1 macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(7): p. 1600-7.
357. Inoue, M., et al., *Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(4): p. 560-6.
358. Lee, C.G., et al., *Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions*. *Cancer Res*, 2000. **60**(19): p. 5565-70.
359. Klement, G., et al., *Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. R15-24.
360. Dameron, K.M., et al., *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1*. *Science*, 1994. **265**(5178): p. 1582-4.
361. Mukhopadhyay, D., L. Tsiokas, and V.P. Sukhatme, *Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression*. *Cancer Res*, 1995. **55**(24): p. 6161-5.
362. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(6): p. 464-78.
363. Papalambros, E., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Human Carotid Atherosclerotic Plaques: Relationship with Plaque Destabilization via Neovascularization*. *Cerebrovasc Dis*, 2004. **18**(2): p. 160-165.
364. Lamoreaux, W.J., et al., *Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro*. *Microvasc Res*, 1998. **55**(1): p. 29-42.
365. Bussolino, F., A. Mantovani, and G. Persico, *Molecular mechanisms of blood vessel formation*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(7): p. 251-6.
366. Celletti, F.L., et al., *Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 425-9.
367. Zachary, I. and G. Gliki, *Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family*. *Cardiovasc Res*, 2001. **49**(3): p. 568-81.
368. Heil, M., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression*. *Eur J Cell Biol*, 2000. **79**(11): p. 850-7.
369. Birkedal-Hansen, H., *Proteolytic remodeling of extracellular matrix*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(5): p. 728-35.
370. Amorino, G.P. and R.L. Hoover, *Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(1): p. 199-207.

371. Davis, G.E. and D.R. Senger, *Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. *Circ Res*, 2005. **97**(11): p. 1093-107.
372. Wang, H. and J.A. Keiser, *Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1*. *Circ Res*, 1998. **83**(8): p. 832-40.
373. Southgate, K.M., et al., *Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation*. *Biochem J*, 1992. **288 ( Pt 1)**: p. 93-9.
374. Thyberg, J., et al., *Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin*. *J Histochem Cytochem*, 1997. **45**(6): p. 837-46.
375. Baker, A.H., et al., *Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(6): p. 1478-87.
376. Forough, R., et al., *Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell functions in vitro and in vivo*. *Circ Res*, 1996. **79**(4): p. 812-20.
377. Jones, C.B., D.C. Sane, and D.M. Herrington, *Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(4): p. 812-23.
378. Shah, P.K., et al., *Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture*. *Circulation*, 1995. **92**(6): p. 1565-9.
379. Rekhter, M.D., et al., *Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma : local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture*. *Circ Res*, 2000. **86**(1): p. 101-8.
380. Winberg, J.O., et al., *Calcium-induced activation and truncation of promatrix metalloproteinase-9 linked to the core protein of chondroitin sulfate proteoglycans*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(19): p. 3996-4007.
381. Kotyza, J., et al., *Pleural injury and pleurisy-induced progelatinase B/proMMP-9 is associated with markers of neutrophil degranulation*. *Scand J Clin Lab Invest*, 2006. **66**(6): p. 487-96.
382. Ramos-DeSimone, N., et al., *Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(19): p. 13066-76.
383. Kahari, V.M. and U. Saarialho-Kere, *Matrix metalloproteinases in skin*. *Exp Dermatol*, 1997. **6**(5): p. 199-213.
384. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
385. Malik, N., et al., *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases*. *J Immunol*, 1996. **156**(10): p. 3952-60.
386. Gough, P.J., et al., *Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(1): p. 59-69.
387. Ruhul Amin, A.R., et al., *Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk*. *Genes Cells*, 2003. **8**(6): p. 515-23.

388. Galve-de Rochemonteix, B., et al., *C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages.* J Leukoc Biol, 1993. **53**(4): p. 439-45.
389. Szczepanik, A.M., et al., *IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line.* J Neuroimmunol, 2001. **113**(1): p. 49-62.

***Articles***

**Bello G., Hanriot D., Hess K., Dousset B., Grosjean S., Mertes P.M., Zannad F., Ropars A., Longrois D.**

C-Reactive Protein increases chemokine expression and modulates matrix metalloproteases expression and activity in cultured human peripheral blood mononuclear cells (soumis).

**Hanriot D. and Bello G., Ropars A., Seguin-Devaux C., Poitevin G., Grosjean S., Latger-cannard V., Devaux Y, Zannad F., Mertes P.M., Hess K., Longrois D.**

A custom-made oligonucleotide microarray analysis on human monocytes reveals that C-Reactive Protein induces anti-inflammatory effects including activation of the Liver X Receptor  $\alpha$  (soumis).

**Bello G. and Cailotto F., Hanriot D., Kolopp-Sarda M.N, Latger-cannard V., Maillot M.C, Hess K., Zannad F., Longrois D. Ropars A.**

C-reactive protein (CRP) increases VEGF expression in monocytes via Erk1/2 and PI3-Kinase pathways (en préparation)

**Dewachter P., Jouan-Hureaux V., Lartaud I., Bello G., de Talancé N., Longrois D., Mertes P.M.**

A comparison of arginine vasopressin, terlipressin or epinephrine to correct arterial hypotension in a model of anaphylactic shock in anesthetized Brown Norway rats (accepté)