# Université de Reims-Champagne Ardenne UFR Médecine

Année 2007 N°

### **THESE**

Présentée pour l'obtention du

## DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 11 octobre 2007

par

#### Nadia SABBAH

# INFLUENCE DE L'APOLIPOPROTEINE(a) SUR LES FONCTIONS INFLAMMATOIRES DES MONOCYTES DANS UN MODELE *IN VITRO* D'INTERACTION AVEC LE COLLAGENE DE TYPE I.

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CNRS UMR 6198 - IFR 53 Biomolécules UFR Médecine de Reims

### Composition du Jury

Rapporteurs Monsieur le Professeur Jean-Louis BEAUDEUX (Paris)

Monsieur le Docteur Eduardo ANGLES-CANO (Caen)

Membres du jury Madame le Docteur Roselyne GARNOTEL (Reims)

Monsieur le Professeur Vincent DURLACH (Reims) Monsieur le Professeur Yves BOIRIE (Clermont Ferrand)

Directeur de thèse Monsieur le Professeur Philippe GILLERY (Reims)



Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Maquart, directeur du laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Monsieur le Professeur Philippe Gillery, j'ai appris à vos côtés la rigueur du travail scientifique, mais aussi le plaisir de la recherche. Vous m'avez accueilli dans votre équipe, de la maîtrise jusqu'à la thèse, durant ces cinq années, vous m'avez guidé, écouté, et encouragé. Vous avez su croire en moi, et malgré les difficultés, vous êtes resté disponible et attentif. Je vous remercie pour tout cela, mais aussi pour votre gentillesse. J'espère poursuivre encore de nombreuses années cette collaboration, qui est devenue un élément indispensable de ma vie professionnelle.

Madame le Docteur Roselyne Garnotel, j'aimerai te remercier pour ton aide indispensable durant toute ces années. Je suis très fière que tu sois ce jour dans mon jury de thèse. Tu as su être à mes côtés pour mes premiers pas au laboratoire, où tu étais mon guide. Tu as toujours été patiente et disponible. La « collagen team » ne pourrait pas exister sans toi, ta bonne humeur et tes conseils. Merci!

Merci à Monsieur le Professeur Jean-Louis Beaudeux d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Monsieur le Docteur Eduardo Angles Cano, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi durant ces cinq années, d'avoir donner de votre temps pour orienter nos travaux. Merci, pour votre gentillesse et parce que sans vos isoformes d'apo(a) ce travail n'aurait jamais eu lieu.

Monsieur le Professeur Yves Boirie, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je suis très heureuse de cette rencontre un jour à l'INRA de Clermont Ferrand, où j'ai rencontré quelqu'un de sincère et de passionné. Je vous remercie de m'avoir un jour posé les bonnes questions...Merci pour votre gentillesse et votre amitié.

Monsieur le Professeur Vincent Durlach, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Durant mes années d'internat, vous avez suivi mon parcours et m'avez soutenu dans mes efforts et je vous en suis reconnaissante. J'aimerai également vous remercier pour votre bonne humeur qui égayaient nos réunions de DES!

Merci à mon équipe, la célèbre « Collagen Team » enviée de tous pour sa bonne humeur et son esprit d'équipe. Merci à mes collègues et amis : Fatou que je persécutais pour la course mais que j'adore, Stéphane J que je traumatisais par mon abominable désordre bureautique et qui malgré tout est resté une aide fidèle et indispensable, Stéphane P que je pillais régulièrement en monocytes et qui n'a jamais refusé de chanter pour les faire s'activer! Alex ma poulette essentielle de bonne humeur, et Emilie que je regrette de n'avoir pas mieux connue.

Merci à tous les étudiants du laboratoire ainsi qu'aux indispensables techniciennes et en particulier à mes poulettes, que j'affiche toujours très fièrement sur mes tee shirt...merci Coco, Aurélie, Martine, Marie France, Boris, Jean Hubert, Arnaud...

Merci à tous pour ces années parfois difficiles mais avec des moments inoubliables d'amitiés et de bonne humeur !

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu et qui ont supporté mes « non merci ce soir je travaille... »!

Merci à Pascal, ami et soutien logistique indispensable de mes soutenances de thèse!

Merci à ma Juju pour sa bonne humeur et son amitié.

Merci à Liliane, fidèle amie et incroyable championne de course à pied.

Merci à Miguel pour son soutien moral, et son aide durant ces derniers mois dans le service.

Merci au Dr Lin pour son accueil dans le service.

Merci à toute mon ancienne équipe IGR, en particulier, Sophie, Marie-Jo, Martine, Solenne, Anna, et les infirmières..., sans oublier Pr Schlumberger, Sami, Mansouria, Dana, Eric et Dr Travagli.

Merci au Dr Claire Schvartz pour ses conseils et son accueil en Médecine Nucléaire

Je tiens à remercier en particulier, une amie très chère, Nathalie. Ma poule, je te remercie pour cette amitié si forte qu'elle reste inaltérable malgré les années et l'éloignement! Merci pour ton soutien permanent, tes conseils prévenants, nos fous rires, et nos moments d'amitié.

Je dédie cette thèse à mes parents, qui m'ont appris le courage et la persévérance, l'humilité et le respect de l'autre. Durant ces longues années d'étude, vous avez su m'aider, m'encourager, me conseiller, vous m'avez permise de réaliser mon rêve, la médecine. Aujourd'hui c'est une grande fierté de vous dédier ce travail et de vous avoir à mes côtés pour vous dire à quel point je suis honorée de vous avoir comme parent.

Merci à ma famille, en particulier à mes grands-mères, qui ont toujours veillé sur moi.

Enfin, j'aimerai remercier, une personne qui a partagé les nuits et les week end au laboratoire, les angoisses, et les moments de doute, et qui a su trouvé la patience de m'accompagner, me réconforter, m'encourager, sans jamais protester. Mon doudou, merci pour tout cela, mais aussi pour tous nos moments de bonheur, et tout simplement... ton amour...

### **PUBLICATIONS**

Time-course of cardiac troponin I release from isolated perfused rat hearts during hypoxia/reoxygenation and ischemia/ reperfusion.

Bertinchant JP., Polge A., Robert E., **Sabbah N.**, Fabro-Perray P., Poirey S., Laprade M., Pau B., Juan JM., Bali JP., de la Coussay JE., Dauzat M.

Clin Chim Acta May 1999; 283(1-2): 43-56.

Enhanced activation of and increased production of matrix metalloproteinase-9 by human blood monocytes upon adhering to carbamylated collagen.

Garnotel R., Sabbah N., Jaisson S., Gillery P.

FEBS February 2004; 563: 13-16.

Ultrasound criteria of malignancy for cervical lymph nodes in patients followed for differentiated thyroid cancer.

Leboulleux S., Girard E., Rose M., Travagli JP., **Sabbah N.,** Caillou B., Hartl DM., Lassau N., Baudin E., Schlumberger M.

J Clin Endocrinol Metab 2007.

Small size apolipoprotein(a) isoforms stimulate collagen-induced monocyte production of reactive oxygen species and MMP-9.

**Sabbah N.,** Garnotel R., Angles-Cano E., Jaisson S., Gillery P. *Soumis à JTH*.

Apolipoprotein(a) kringles IV-2 number determine a different mechanism of monocytes stimulation.

Sabbah N., Jaisson S., Garnotel R., Angles-Cano E., Gillery P.

En cours de rédaction

### **COMMUNICATIONS PAR VOIE D'AFFICHE**

Rôle de l'apolipoprotéine (a) sur l'interaction monocytes collagène type I **Sabbah N.**, Garnotel R., Szcsyhel A., Loyau S., Anglès-Cano E., Gillery P. Journées scientifiques Boehringer Ingelheim, Société de Biologie de Reims, 2003, 1<sup>er</sup> prix scientifique présentation poster.

Modulation des interactions monocytes collagène de type I par l'apolipoprotéine (a). **Sabbah N**, Garnotel R, Jaisson S, Szcsyhel A, Anglès Cano E, Gillery P. congrès de l'ARCOL 2003 **1**<sup>er</sup> **prix scientifique** présentation poster.

Modulation des interactions monocytes collagène de type I par l'apolipoprotéine (a). **Sabbah N**, Garnotel R, Jaisson S, Szcsyhel A, Anglès Cano E, Gillery P. Société Française Endocrinologie 2004.

Influence du nombre de Kringles IV de l'apolipoprotéine(a) sur la modulation de l'interaction monocytes/collagène de type I. **Sabbah N**., Garnotel R., Szcsyhel A., Jaisson S., Anglès-Cano E., Gillery P., NSFA 2004.

Influence de la modification du collagène de type I par le methylglyoxal sur l'activation des monocytes humains. Szcsyhel A., Garnotel R., Nguyen P., Jaisson S., **Sabbah N**., Gillery P. 7<sup>ième</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en odontologie, Rennes, 2004.

Number of kringles repeats influences monocyte activation and matrix remodelling activity induced by apolipoprotein(a). **Sabbah N**., Garnotel R., Jaisson S., Anglès Cano E., Gillery P., Metabolic syndrome, type II diabetes and atherosclerosis congress, Marrakesh, 2006.

### **COMMUNICATIONS ORALES**

Rôle de l'apolipoprotéine (a) dans le modèle d'interaction monocytes collagène de type I. **Sabbah N.**, Garnotel R., Szcsyhel A., Loyau S., Anglès Cano E., Gillery P., Journées Jeunes chercheurs 2003.

Lauréate du prix « Meilleur Mémoire DES Endocrinologie Maladies Métaboliques interrégion Nord-Est », modulation des interactions monocytes collagène de type I par l'apolipoprotéine (a). Amnéville, 2003.

Modulation des interactions monocytes collagènes type I par l'apolipoprotéine (a). **Sabbah N**., Garnotel R., Jaisson S., Szcsyhel A., Anglès Cano E., Gillery P. **2** ième **Prix scientifique** présentation orale Boeringher-Ingelheim 2004.

### **SOMMAIRE**

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	9
I. INTRODUCTIONERROR! BOOKMARK NOT DE	FINED.
II. SITUATION DU SUJET.ERROR! BOOKMARK NOT DE	FINED.
II.1. LA PLAQUE D'ATHEROME	15
II.1.1 - Généralités/ Présentations cliniques II.1.2 - Description anatomo-pathologique	
II.1.3 – Rôle des LDL et des monocytes/macrophages dans l'athéroslérose :	
II.1.3.1- Rôle athérogène des LDL oxydées	
II.1.3.2- Rôle des monocytes/macrophages	24
II.1.3.3- Les récepteurs scavengers	27
II.1.3.4- Rôle des cytokines	32
II.1.4- Matrice extracellulaire des artères et collagène de type I	35
II.1.4.1- Généralités	35
II.1.4.2- Le collagène de type I	37
a- Généralités	37
b- Structure du collagène de type I	37
c- La biosynthèse du collagène de type I	40
d- Les propriétés physico-chimiques du collagène de type I	42
II.1.4.3- L'élastine, les glycoprotéines de structure, et les protéoglycannes	43
a- L'élastine	43
b- Les glycoprotéines de structure	44
c- Les protéoglycannes	44

II.1.5- Les métalloprotéinases matricielles (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP)4	<b>45</b>
II.1.5.1- Les métalloprotéinases matricielles	45
a- Caractères généraux	15
b- Activation des MMP	18
c- La MMP-9 (gélatinase B)5	52
II.1.5.2- Les Inhibiteurs tissulaires des Métalloprotéinases matricielles : Les TIMP5	55
a- Caractères généraux5	55
b- TIMP-1 et TIMP-25	55
II.1.5.3- Rôle biologique des MMP et des TIMP dans les pathologies cardio-vasculaires	59
II.2- LE SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE	51
II.2.1-Introduction	61
II.2.2-Le plasminogène et ses activateurs	61
II.2.2.1 -Le plasminogène	51
II.2.2.2 -Les activateurs du plasminogène.	53
a- Introduction6	54
b- L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)6	55
c- Le système pro-urokinase/urokinase6	57
II.3- LA LIPOPROTEINE (a)	.0
II.3.1- Introduction	. 0
II.3.2- Structure de la lipoprotéine(a)	. 1
II.3.2.1 -Généralités	. 1
II.3.2.2 -La structure de l'apolipoprotéine (a)	.2
II.3.3- Génétique de la lipoprotéine(a) [Lp(a)]	. 8
II.3.4 - Pathologies et Lp(a)	10
II.3.4.1 – Lp(a) et diabète sucré	10
II.3.4.2 – Lp(a) et pathologies cardio-vasculaires.	11
II.3.4.3 – Lp(a) et pathologies rénales.	12
III. OBJECTIFS DU TRAVAILERROR! BOOKMARK NO	T
DEFINED.	

# IV. MATERIEL & METHODES.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

IV.1- LISTE DES MATERIELS ET REACTIFS	16
IV.2- PREPARATATION DES MONOCYTES HUMAINS PAR	
CYTAPHERESE-ELUTRIATION.	20
IV.3- PREPARATION DU COLLAGENE DE TYPE I	22
IV.4- PREPARATION DES ISOFORMES D'APO(a) RECOMBINANTES.	23
IV.5- PREPARATION DES MICROPLAQUES.	25
IV.6- EVALUATION DE L'ADHESION DES MONOCYTES	25
IV.7- EVALUATION DE LA SECRETION DES METALLOPROTEINASE	ES
MATRICIELLES ET DE LEURS INHIBITEURS	26
IV.7.1- Dépôt des cellules	26
IV.7.2- Zymographie en gel de gélatine	26
IV.7.2.1- Principe de la zymographie	26
IV.7.2.2- Zymographie en gel de gélatine	27
IV.7.2.3- Zymographie inverse	28
IV.7.3- Dosages immunoenzymatiques	28
IV.7.4- Dosage de l'ARN messager par RT-PCR quantitative	30
IV.8- ETUDE DE LA PRODUCTION DES RADICAUX LIBRES	
OXYGENES	31
IV.8.1- Etude de la production des radicaux libres oxygénés par la mesure de la réduc	ction
du bleu de nitrotétrazolium (NBT)	31
IV.8.2- Mesure de la production d'ions superoxyde $(o_2^-)$ par la réduction du	
ferricytochrome inhibable par la superoxyde dismutase	32
IV.9- ETUDE DU SYSTEME PLASMINE-PLASMINOGENE	34
IV.9.1- Zymographie en gel gélatine-plasminogène	34
IV.9.2- Mise en évidence de PAI-1 par Western Blot	34
IV.9.3- Mesure de l'activité plasmine	35
IV.9.4- Effet du plasminogène sur l'interaction monocytes-collagène type I	37

IV.9.4.1- Etude de l'adhésion et de l'activation des monocytes s	ur collagène type I en
présence de plasminogène	37
IV.9.4.2- Effet de l'amiloride sur l'interaction monocytes- collag	gène type I en présence de
plasminogène	37
IV.10- ETUDE DES LYSINES BINDING SITES (LBS)	37
IV.11. STATISTIQUES	38
V. RESULTATSERROR! BOOKMAR	K NOT DEFINED.
V. 1- INFLUENCE DE L'APO(a) 18 K SUR L'INTERAC	TION ENTRE
MONOCYTES ET COLLAGENE DE TYPE I MONOCY	TES ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.	
V.1.1- Etude de l'effet de l'apo(a) 18 K sur l'adhésion des monoc	ytes40
V.1.2- Etude de l'effet de l'apo(a) 18 K sur la production des radi	aux libres oxygénés par
les monocytes	40
V.1.2.1- Mesure de la production de RLO par les monocytes adh	nérents en plaques 96
puits	40
V1.2.2- Mesure de la production d'ions superoxyde par les mon	ocytes en suspension45
V.1.3- Etude de l'effet de l'apo(a) 18 K sur la production et l'acti	vation de la MMP-9 par
les monocytes.	46
V. 2- INFLUENCE DU NOMBRE DE KRINGLES IV SU	R L'INTERACTION
COLLAGENE DE TYPE I-MONOCYTES	47
V.2.1- Etude de l'effet des différents isoformes d'apo(a) sur l'adh	résion et l'activation des
monocytes	47
V.2.1.1- Effet des trois isoformes d'apo(a) sur l'adhésion des mo	onocytes47
V.2.1.2- Effet des trois isoformes d'apo(a) sur la production de 1	radicaux libres oxygénés
(RLO) par les monocytes.	47
V.2.2- Etude de l'effet des différentes isoformes d'apo(a) sur la p	production et l'activation
de la MMP-9 par les monocytes	49
V.2.2.1- Etude de la MMP-9 par zymographie en gel de gélatine	49
V.2.2.2- Quantification de la MMP-9 par ELISA.	51
V.2.2.3- Quantification de l'ARNm de MMP par RT-PCR	52

V.2.3- Etude de l'effet des différentes isoformes d'apo(a) sur le système plasmine	<b>'–</b>
plasminogène dans des monocytes cultivés en présence de collagène type I	53
V.2.3.1- Etude de la production d'uPA par les monocytes	53
V.2.3.2- Etude de l'activité plasmine	55
V.2.3.3- Etude de la production de PAI-1	56
V.2.4- Effet du nombre de kringles de l'apo(a) sur la production deTIMP-1 et TI	MP-2 57
V.2.4.1- Etude de la production de TIMP-1 et TIMP-2 par zymographie inverse.	57
V.2.4.2- Etude de la production de TIMP-1 et TIMP-2 par ELISA	57
V.3- IMPLICATIONS DES KRINGLES IV DANS LES INTERACTION	NS DE
L'APO(a) AVEC LES MONOCYTES ET LE COLLAGENE DE TYPE	I61
V.3.1- Etude de l'effet du plasminogène	61
V.3.1.1- Effet du plasminogène sur l'adhésion des monocytes	61
V.3.1.2- Effet du plasminogène sur la production de radicaux libres oxygénés pa	r les
monocytes	61
V.3.1.3- Effet du plasminogène sur production et l'activation de la MMP-9 par le	es
monocytes	61
V.3.1.4- Effet de l'amiloride sur l'interaction entre le plasminogène, les monocy	tes et
collagène de type I	
V.3.2- Etude de l'implication des LBS	<i>67</i>
V.3.2.1- Rôle de l'acide $\epsilon$ -amino-caproïque ( $\epsilon$ ACA) sur la production de la MM	P-9
stimulée par l'apo(a) 10 K	67
IV.3.2.2- Rôle de l'acide ε-amino-caproïque (εACA) sur la production de TIMP	-1 et de
TIMP-2 stimulée par l'isoforme 34 K	67
VI. DISCUSSION	71
VII. CONCLUSIONS	11
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
ARTICLE	186

#### LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA FORMATION DE LA
- **STRIE LIPIDIQUE** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 2 : LES DIFFERENTES FAMILLE DE RECEPTEURS SCAVENGERS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 3 : CASCADES DE SIGNALISATION DE CD36 PAR DES LIGANDS MODIFES OU NON. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 4: ROLE PRO-ATHEROGENE DES CYTOKINES PRO INFLAMMATOIRES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 5: LA TRIPLE HELICE DE COLLAGENE. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 6 : REPRESENTATION DES DOMAINES DU PROCOLLAGENE DE TYPE I ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 7 : MECANISME D'ACTIVATION DES MMPS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- **FIGURE 8 : COMPARAISON TRIDIMENSIONNELLE DES GELATINASES** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 9 : SITES DE CLIVAGE DE LA PRO-MMP-9 PAR LES PROTEINASES ET LES AGENTS ORGANOMERCURIELS. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 10: INHIBITION DES MMP PAR LES TIMP ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 11: STRUCTURE DU TIMP-1 ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 12 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU TIMP-1 ET DU TIMP-2. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 13: STRUCTURE PRIMAIRE DU PLASMINOGENE ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 14 : REPRESENTATION BIDIRECTIONNELLE DE LA STRUCTURE DU TPA BOOKMARK NOT DEFINED. ERROR!
- FIGURE 16: DEUX PARTICULES DE LP(a) AVEC DIFFERENTES TAILLES
- **D'APOLIPOPROTEINE(a).** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 17: MODELE DE LP(a) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 18: MODELE D'ASSEMBLAGE DE LP(a) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 19: HISTOGRAMME DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE DE LP(a) DANS TROIS POPULATIONS. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 20: ELUTRIATION DES CELLULES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 21 : PHENOTYPAGE DES ECHANTILLONS D'APO(a) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 22: PRINCIPE DU DOSAGE ELISA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 23 : STRUCTURE DU NITROBLEU DE TETRAZOLIUM (A) ET DU DIFORMAZAN (B) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- **FIGURE 24 : COURBE D'ETALONNAGE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE PLASMINE** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 25A : EFFET DE L'APO(a) SUR L'ADHESION DES MONOCYTES AU COLLAGENE TYPE I. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 25B : ETUDE DE L'EFFET DE L'APO(a) SUR L'ADHESION DES MONOCYTES A DIFFERENTS
- SUBSTRATS. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 26A: CINETIQUE DE PRODUCTION DES RLO PAR DES MONOCYTES CULTIVES SUR COLLAGENE DE TYPE I OU PLASTIQUE EN PRESENCE D'APO(a) 18K. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 26B: EFFET DE L'APO(a) 18 K SUR LA LIBERATION DES RLO PAR DES MONOCYTES CULTIVES SUR PLASTIQUE, ALBUMINE, COLLAGENE TYPE I, ET FIBRONECTINE. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 27 : CINETIQUE DE PRODUCTION D'IONS SUPEROXYDE PAR DES MONOCYTES EN SUSPENSION ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

- FIGURE 28: EFFET DE LA CONCENTRATION DE L'APO(a) 18 K SUR LA PRODUCTION ET L'ACTIVATION DE LA PROMMP-9 EN MMP-9 PAR LES MONOCYTES. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 29A: EFFET DES DIFFERENTS ISOFORMES D'APO(a) SUR L'ADHESION DES MONOCYTES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 29B : EFFET DES DIFFERENTS ISOFORMES D'APO(a) SUR LA PRODUCTION DE RLO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 30A: ETUDE PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE DE LA PRODUCTION DE LA MMP-9 PAR LES MONOCYTES EN FONTION DU NOMBRE DE KRINGLES IV. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 30B : ETUDE QUANTITATIVE PAR ELISA DE LA MMP-9 PAR LES MONOCYTES EN FONCTION DU NOMBRE DE KRINGLES IV. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 30C: ETUDE PAR RT PCR DE LA PRODUCTION DE MMP-9 (ARNm) PAR LES
- MONOCYTES EN FONTION DU NOMBRE DE KRINGLES IV.ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 31A : ETUDE DE LA SECRETION D'UPA PAR LES MONOCYTES EN FONCTIONS DU NOMBRE
- **DE KRINGLES IV.** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 31B: EVALUATION DENSITOMETRIQUE DE L'ACTIVITE GELATINOLYIQUE D' UPA A 48 HEURES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 32 : MESURE DE L'ACTIVITE PLASMINE DES MILIEUX CONDITIONNES. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 33 : EFFET DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(a) SUR LA PRODUCTION DE PAI-1. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 34: EFFET DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(a) SUR LA PRODUCTION DE TIMP1 ET DE TIMP-2 ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 35A: DOSAGE DU TIMP-1 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(a) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 24 HEURES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 35B : DOSAGE DU TIMP-1 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(a) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 48 HEURES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 36A: DOSAGE DU TIMP-2 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(a) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 24 HEURES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 36B : DOSAGE DU TIMP-2 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(a) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 48 HEURES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 37A: ETUDE DE L'EFFET DU PLASMINOGENE SUR L'ADHESION DES MONOCYTES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 37B: ETUDE DE L'EFFET DU PLASMINOGENE SUR LA PRODUCTION DE RLO PAR LES MONOCYTES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 37C : ETUDE DE L'EFFET DU PLASMINOGENE SUR LA SECRETION ET L'ACTIVATION DE LA
- MMP-9 PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

  FIGURE 38A: ETUDE DE L'EFFET DE L'AMILORIDE SUR L'ADHESION DES MONOCYTES.

  ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- **FIGURE 38B : ETUDE DE L'EFFET DE L'AMILORIDE SUR LA PRODUCTION DE RLO.** ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 38C: ETUDE DE L'EFFET DE L'AMILORIDE SUR LA PRODUTION ET L'ACTIVATION DE
- MMP-9 PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 39A: EFFET DE L'&ACA SUR LA PRODUCTION ET L'ACTIVATION DE LA MMP-9 PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 39B : EFFET DE L'E-ACA SUR LA PRODUCTION DE LA MMP-9, QUANTIFICATION PAR ELISA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- FIGURE 39C : EFFET DE L'E-ACA SUR LA PRODUCTION DE RLO PAR LES MONOCYTES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURE 40 : ETUDE DE L'EFFET DE &ACA SUR LA PRODUCTION DE TIMP-1 ET TIMP-2 EN PRESENCE D'ISOFORME 34K, PAR ZYMOGRAPHIE INVERSE.

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURE 41: INFLUENCE DES ISOFORMES D'APO(a) DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE SUR LES

PROPRIETES INFLAMMATOIRES DES MONOCYTES DANS UN MODELE IN VITRO D'INTERACTION

AVEC LE COLLAGENE DE TYPE I 156

FIGURE 42: INFLUENCE DES ISOFORMES D'APO(a) DE MASSE MOLECULAIRE ELEVEE SUR LES

PROPRIETES INFLAMMATOIRES DES MONOCYTES DANS UN MODELE *IN VITRO* D'INTERACTION AVEC LE COLLAGENE DE TYPE I 157

### LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1 : Définition des lésions d'athérosclérose selon la classification AHA</u> 20
<u>Tableau 2 : Principales glycoprotéines de la matrice-extracellulaire</u>
Tableau 3 : Activités biologiques des MMP
<u>Tableau 4 : Représentation schématique de la structure des MMP</u> 50
Tableau 5 : Production de RLO (absorbance à 560 nm) en fonctions des isoformes  d'apo(a)
Tableau 6 : Quantification de la production de MMP-9 et de Pro-MMP-9 sur zymographie en gel de gélatine par les monocytes en fonction des trois isoformes
<u>Tableau 7 : Quantification de la production de MMP-9 par ELISA</u> 123

### LISTE DES ABBREVIATIONS

α2-AP	α2-antiplasmine
εΑCΑ	acide 6-amino-hexanoïque
AGE	produits avancés de glycation (advanced glycation end-product)
AOMI	artériopathie oblitérante des membres inférieurs
AVC	accidents vasculaires cérébraux
CCR2	cross section compliance chemokine receptor 2
CML	cellules musculaires lisses
EBP	protéine de fixation à l'élastine (elastin binding protein)
EGF	facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
GAG	glycosaminoglycannes
GAPDH	glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GGHL	glycosyl-galactosyl-hydroxylysine
GHL	galactosyl-hydroxylysine
HDL	lipoproteines de densité élevée (high density lipoproteins)
HSP47	protéine de choc thermique 47 – heat schock protein
HTA	hypertension artérielle
ICAM	molécule d'adhésion inter-cellulaire (intercellular cell adhesion molecule)
IFNγ	interféron gamma
IL	interleukine
LBS	sites de liaison aux lysines (lysine binding sites)
LDL	lipoproteines de faible densité (low density lipoproteins)
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
Lp(a)	lipoprotéine (a)
LPS	lipopolysaccharide
LRP	récepteur lié aux LDL (low density lipoprotein receptor-related protein)
MAGP	microfibrille associée aux glycoprotéines (microfibril-associated glycoprotein)

MCP-1	protéine 1 chémoattractante pour monocytes (monocyte chemotactic protein-1)		
M-CSF	facteur de stimulation de colonies macrophagiques (macrophage-colony		
	stimulating factor)		
MEC	matrice extracellulaire		
MMP	métalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinase)		
NBT	bleu de nitrotétrazolium		
PAI-1	inhibiteur des activateurs du plasminogène (plasminogen activator inhibitor 1)		
PG	protéoglycannes		
pNA	para-nitroanilide		
PVDF	polyvinylidene fluoride		
RLO	radicaux libres oxygénés		
SAB	sérum albumine bovine		
SDS	dodécyl sulfate de sodium		
SR	récepteur scavenger (scavenger receptor)		
TIMP	inhibiteurs de metalloprotéinases matricielles (tissue inhibitor of		
	metalloproteinase)		
TNFα	facteur de nécrose tumorale $\alpha$ ( tumor necrosis factor $\alpha$ )		
tPA	activateur tissulaire du plasminogène (tissue type plasminogen activator)		
u.a.	unités arbitraires		
uPA	activateur du plasminogène de type urinaire (urokinase-type activator		
	plasminogen)		
u-PAR	récepteur d'uPA - urokinase plasminogen activator receptor		
VCAM-1	molécule d'adhésion des cellules vasculaires - vascular cell adhesion molecule-1		
VLA-4	very late antigen-4		
VLDL	lipoproteines de très faible densité (very low density lipoprotein)		

# I. INTRODUCTION

Les pathologies cardio-vasculaires, comprenant les Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) et les cardiopathies ischémiques, constituent l'une des premières causes de décès dans le monde. En effet, d'après le rapport de l'OMS en 2003, on comptait au cours de l'année 2002 5,5 millions de décès dus aux AVC et 7,2 millions dus aux cardiopathies ischémiques, sur un total mondial de 57 millions de décès.

Ces pathologies sont la traduction clinique de la maladie athéromateuse. Leur incidence augmente progressivement avec les modes de vie modernes associant la sédentarité et les alimentations riches en graisses saturées. Les facteurs de risque cardio-vasculaires favorisant la formation de la plaque d'athérome sont pour la plupart connus. Actuellement, on admet : l'âge supérieur à 50 ans chez l'homme et 60 ans chez la femme, les antécédents d'accident vasculaire ou d'infarctus chez un parent du premier degré avant 55 ans chez l'homme et 65 ans chez la femme, le tabagisme actif ou l'arrêt de celui-ci depuis moins de 3 ans, l'hypertension artérielle (HTA) représentée par une systolique supérieure à 140 mmHg et une diastolique supérieure à 80 mmHg, l'élévation des LDL (low density lipoproteins) supérieure à 1,9 g/l (4,9 mmol/l) et diminution des HDL (high density lipoproteins) inférieure à 0,4g/l (1 mmol/l), le diabète de type 1 et 2, et le tour de taille supérieur à 88 cm chez la femme et 102 cm chez l'homme.

La notion récente de syndrome métabolique regroupant obésité abdominale, HTA, hypoHDLémie, hypertriglycéridémie, et hyperglycémie a permis de regrouper des patients à haut risque de complications vasculaires. Les derniers rapports de l'OMS étaient très alarmants concernant cette véritable « épidémie » mondiale [Ford et al. 2002].

Les manifestations cliniques de l'athérosclérose sont essentiellement dues à la déstabilisation et la rupture de la plaque, responsables d'emboles à distance.

La formation de la plaque est un phénomène complexe qui met en jeu différents acteurs cellulaires, mais aussi des médiateurs de l'inflammation. Au cours du développement de l'athérosclérose, l'endothélium vasculaire conserve son intégrité structurale, mais se présente dans un état d'activation inflammatoire qui favorise le recrutement des cellules monocytaires.

Cette notion d'inflammation locale permet de comprendre la libération d'agents chimiotactiques entraînant le recrutement de cellules inflammatoires au niveau de la plaque [Ludewig et al. 2002].

Lors du passage dans les tissus, les monocytes circulants se différencient en macrophages capables de se charger en LDL oxydées, et de donner ainsi les cellules spumeuses (foam cells), qui participent à la constitution de la strie lipidique, première étape de la formation de la plaque. La progression des stries lipidiques vers des lésions athéromateuses compliquées dépend ensuite des autres facteurs de risque cardio-vasculaires.

La libération de radicaux libres oxygénés lors de l'activation des cellules monocytaires, participe à l'évolution de la plaque, en favorisant notamment l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), mais aussi la modification oxydative de nombreux de ses constituants.

Différentes lipoprotéines plasmatiques contribuent au développement de la plaque d'athérosclérose, et surtout les LDL, dont l'augmentation représente un facteur de risque cardiovasculaire.

La lipoprotéine (a) est une forme particulière de LDL constituée d'un noyau lipidique et de deux apolipoprotéines reliées par un pont disulfure : l'apolipoprotéine B100 et l'apolipoprotéine (a) [apo(a)]. Les homologies structurales de cette dernière avec le plasminogène lui confèrent la capacité de se fixer à la fibrine ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales et des monocytes, inhibant ainsi la liaison du plasminogène et la formation de plasmine.

La lipoprotéine (a) semble jouer un rôle primordial dans la physiopathologie de l'athérosclérose et de ses complications. Les mécanismes potentiels sont de deux ordres : l'un, thrombogène, par diminution de la formation de plasmine ; l'autre, athérogène, par augmentation du dépôt de cholestérol (car accumulation de Lp(a) dans la plaque). Ses interactions avec la matrice extracellulaire et les monocytes permettraient d'expliquer son rôle et ses mécanismes d'action dans la formation de la plaque.

Dans l'évolution de l'athérosclérose, la stabilité de la plaque dépend des composants de la matrice extracellulaire incluant les collagènes fibrillaires, les protéoglycannes, la fibronectine, la membrane basale et ses composants non collagéniques, et l'élastine. La rupture de la plaque athérosclérotique représente un risque important d'accident vasculaire aigu. Les MMP en lien avec leurs inhibiteurs (les TIMP tissue inhibitor of metalloproteinase), jouent un rôle fondamental dans ce mécanisme [Galis et al. 1989].

Elles facilitent la migration des cellules musculaires lisses et des monocytes/macrophages, et favorisent lorsqu'elles sont dans la chape fibreuse l'embole du caillot dans la circulation sanguine [Dolery et al. 2006].

Les modifications de la MEC jouent un rôle essentiel dans l'épaisseur et la rupture de la plaque d'athérome [Newby et al. 2005].

Un remodelage matriciel non contrôlé au niveau myocardique et vasculaire est la cause de désordres cardio-vasculaires tels que l'athérosclérose, la sténose, l'hypertrophie du ventricule gauche, ou la formation d'un anévrysme [Nagase et al. 2006].

Les collagénases clivent plus spécifiquement les collagènes fibrillaires, alors que les autres composants de la matrice extracellulaire sont clivés par les autres membres de la famille des MMP. La MMP-2 et la MMP-9 (gélatinases A et B) existent sous formes latentes de pro-MMP-2 et pro-MMP-9, qui, une fois activées, dégradent les formes natives de collagène fibrillaires, la vitronectine, et l'élastine. La dégradation du tissu conjonctif par les MMP est aussi influencée par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (en particulier le TIMP1). En effet, les modifications de l'équilibre entre MMP et TIMP entraînent une dégradation plus ou moins importante de la matrice en fonction de la quantité d'inhibiteur présent.

Au cours de ce travail, nous avons étudié les interactions *in vitro* de l'apolipoprotéine (a), apolipoprotéine spécifique de la Lp(a), avec deux acteurs majeurs dans la progression de la plaque d'athérome, les monocytes et le collagène de type I.

Dans ce mémoire, nous décrirons dans une première partie les différents facteurs impliqués dans l'athérosclérose, en insistant sur ceux qui ont fait l'objet de notre travail. Après avoir énoncé les objectifs de la thèse, nous exposerons les méthodes étudiées et les résultats obtenus. Nous discuterons ensuite les principales données issues de cette étude, et concluerons sur des perspectives.

# II. SITUATION DU SUJET

### II.1. LA PLAQUE D'ATHEROME

### II.1.1 - Généralités/ Présentations cliniques

L'athérosclérose est une maladie à composante inflammatoire et immunitaire [Lusis et al. 2000]. En effet, au cours de son évolution, l'endothélium conserve son intégrité structurale. Il est le siège d'une réaction inflammatoire auto entretenue, favorisant le recrutement des monocytes et des lymphocytes.

Les formes cliniques de l'athérosclérose les plus fréquentes sont les coronaropathies et les accidents vasculaires ischémiques. Cependant, d'autres atteintes cliniques existent et représentent des facteurs de morbi-mortalité importants.

#### LE CŒUR:

L'atteinte des artères coronaires est responsable d'insuffisance coronarienne aiguë ou chronique. L'insuffisance coronaire aiguë regroupe les formes de la maladie à début brutal ou rapidement progressif, mettant rapidement en jeu le pronostic vital. Elles sont la conséquence de la rupture de plaque. L'évènement initial entraînant la formation d'un thrombus au niveau de la plaque athéroscléreuse est la rupture ou l'érosion. Le thrombus peut alors par sa localisation entraîner une occlusion partielle ou complète de la lumière artérielle, et migrer dans la circulation générale [Tedgui et al. 1999]. Dans le territoire coronaire, la thrombose apparaît le plus souvent au contact d'une lésion d'athérosclérose. Lorsque le thrombus devient occlusif, il est responsable d'un infarctus du myocarde. Lorsqu'il n'est pas complet, à l'inverse, il a des conséquences sur les territoires d'aval et explique la symptomatologie des angors instables.

### LE CERVEAU:

L'infarctus cérébral représente 85% des accidents vasculaires cérébraux. L'athérosclérose participe en grande partie à cette pathologie.

Effectivement, on retrouve trois étiologies principales qui expliquent ensemble deux tiers des cas : l'athérosclérose, les maladies des petites artères cérébrales et les cardiopathies emboligènes.

En fonction de l'examen clinique et grâce à l'imagerie, il est possible de déterminer avec exactitude le site artériel atteint. Le diagnostic étiologique est particulièrement important lorsque l'athérosclérose est prédominante car il existe un haut risque de récidive. L'élévation du choléstérol-LDL, la baisse du choléstérol-HDL, et l'augmentation des triglycérides sont associées à l'augmentation du risque d'AVC ischémique.

#### LE REIN:

Le rein peut également être touché par l'athérosclérose, qui représente la quatrième cause de néphropathie chronique. Tout patient présentant une atteinte athérothrombotique des gros vaisseaux (coronariens, carotidiens ou des membres inférieurs) présente un risque compris entre 15 et 30 % de localisation éventuellement sténosante du tronc ou de l'ostium des artères rénales pouvant aboutir à l'insuffisance rénale terminale [Meyrier et al. 1998]. Les emboles de cholestérol au niveau des artères rénales sont essentiellement iatrogènes après des gestes de radiologie interventionnelle, ou d'angiographie responsables de l'érosion d'une plaque d'athérome [Scolari et al. 2000]. Les emboles de cholestérol peuvent aussi être spontanés, responsables d'insuffisance rénale d'aggravation progressive.

#### LES ARTERES DES MEMBRES INFERIEURS:

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est secondaire à une atteinte artérielle obstructive des membres inférieurs, principalement liée à l'athérosclérose. Elle est souvent associée à une pathologie athéromateuse diffuse. Le diagnostic repose sur la clinique. Elle augmente avec l'âge, touchant 2 à 3 % des hommes de plus de 60 ans et 1à 2 % des femmes. La prévalence est beaucoup plus importante chez le patient diabétique, et représente 4,2 % des diabétiques âgés de 35 à 55 ans [WHO multinational study of vascular disease in diabetes : prevalence of small vessel and large vessel disease in diabetic patients from 14 centers] [WHO, 1985]. Il existe plusieurs stades en fonction de la gravité, débutant par une claudication intermittente correspondant à une douleur à la marche et pouvant au maximum aboutir à une gangrène faisant partie des urgences vitales [Weithz et al., 1996]. Les facteurs de risque de l'AOMI sont ceux de l'athérosclérose.

Cependant, le tabagisme et le diabète jouent un rôle prépondérant.

L'artériosclérose se localise préférentiellement au niveau des artères iliaques primitives, artères iliaques externes, trépied fémoral, artère fémorale superficielle, artère poplitée et trépied jambier. L'artériosclérose globale et diffuse des artères joue également un rôle important, en tant que processus physiologique de vieillissement des tissus artériels.

L'AOMI résulte de l'association de l'athérosclérose et de l'artériosclérose, d'où le terme d'artériopathie scléreuse des membres inférieurs.

### II.1.2 - Description anatomo-pathologique

La description anatomo-pathologique classique de l'athérosclérose retient trois stades évolutifs : la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique, et la lésion compliquée. Les progrès récents dans le domaine de la recherche fondamentale ont permis d'étudier des plaques d'athérosclérose humaine, permettant ainsi de décrire plusieurs phases de formation en fonction de leur caractère évolutif. La classification de l'AHA, proposée dans le cadre du *Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis* sous l'égide de *l'American Heart Association* reconnaît ainsi six types lésionnels successifs [tableau 1].

Le type I correspond à la première lésion de l'intima, caractérisée par la présence de cellules macrophagiques chargées de lipides oxydés que l'on nomme les cellules spumeuses.

Le type **II** correspond à l'accumulation des cellules spumeuses au niveau de la paroi intimale de l'artère, formant ainsi la strie lipidique. Celle-ci est visible à l'œil nu et a une coloration jaunâtre. Le type **III** correspond à une accumulation de lipides extracellulaires sous la couche des cellules spumeuses.

Ces trois premiers stades ne s'accompagnent d'aucune manifestation clinique.

Le type **IV** représente la première étape des lésions avancées. Il est caractérisé par l'apparition d'un noyau lipidique localisé sous l'amas de cellules spumeuses formant, ainsi une zone pauci cellulaire constituée de cristaux de cholestérol, de quelques macrophages et de cellules spumeuses géantes. Cette lésion n'est cependant pas encore entourée d'une chape fibreuse, mais peut être responsable d'un évènement thrombotique, et donc symptomatique.

Le type V est la lésion type de l'athérosclérose. Il s'agit d'une plaque fibro-lipidique, constituée d'un centre lipidique et d'une chape fibreuse.

Les lipides sont essentiellement des esters de cholestéryle, et la chape fibreuse est faite d'une matrice extra cellulaire comprenant essentiellement des collagènes fibrillaires de type I et III, des glycoprotéines de structure, et des glycosaminoglycanes. Les cellules musculaires lisses (70 %) représentent le type cellulaire prédominant à côté de macrophages et de cellules inflammatoires. Des cellules endothéliales sont situées à la surface des plaques permettant de maintenir l'intégrité endothéliale, évitant ainsi les complications au niveau de la plaque. Les lymphocytes T, dont on ne connaît pas encore le rôle exact, représentent environ 10 % de la population cellulaire. On distingue trois sous-types :

- Va dont la description est celle faite ci-dessus
- **Vb** avec présence de calcifications
- Vc avec présence d'une chape fibreuse mais sans centre lipidique.

Le type VI correspond à la plaque d'athérome compliquée, où coexiste des phénomènes d'hémorragie intraplaque et de thrombose participant à la sténose de la lumière artérielle. Cette plaque contribue ainsi aux phénomènes aigus tels que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou les infarctus. Il existe également trois sous types :

- VIa avec rupture de la plaque, et une profondeur d'ulcération variable.
- VIb avec une hémorragie intra plaque responsable d'une collection sanguine
- **VIc** associé à une occlusion de l'artère.

Au cours de l'évolution, le volume des plaques peut se modifier, entraînant un risque accru d'érosion et d'embolies à distance, qui peut correspondre à la migration d'une partie du contenu du centre lipidique, responsable d'emboles de cholestérol associés à de la fibrine et des cellules géantes, migrant principalement dans les artères de petit calibre ou dans la microcirculation.

TYPES DE LESIONS	AGE	CORRELATION	
	D'APPARITION	ANATOMO-CLINIQUE	
Lésions précoces			
TYPE I	0-10 ans	Aucune manifestation clinique	
Macrophages spumeux isolés			
TYPE II			
Stries lipidiques: macrophages et quelques	0-10 ans	Aucune manifestation clinique	
cellules musculaires lisses			
TYPE III			
Stries lipidiques et discrète accumulation de	Après 20 ans	Aucune manifestation clinique	
lipides extracellulaires			
Lésions avancées			
TYPE IV			
Athérome : formation d'un centre lipidique	Après 40 ans	Manifestations cliniques possibles	
sans fibrose			
TYPE V			
Fibro-athérome	Après 40 ans	Manifestations cliniques possibles	
Va : centre lipidique avec chape fibreuse		dépendant du degré de la sténose	
Vb : en plus, calcifications			
Vc: plaques athéroscléreuses, fibreuses			
avec centre lipidique			
TYPE VI			
Athérosclérose compliquée	Après 40 ans	Manifestations cliniques possibles :	
VIa ulcération VIb hématome		fréquentes mais pas constantes	
VIc thrombose			

### Tableau 6 : Définition des lésions d'athérosclérose selon la classification AHA

D'après Bruneval P., « l'athérosclérose » Ed Masson.

### II.1.3 – Rôle des LDL et des monocytes/macrophages dans l'athéroslérose :

### II.1.3.1-Rôle athérogène des LDL oxydées

Le cholestérol est connu comme facteur de risque essentiel dans la formation de la plaque. Il convient cependant de différencier le rôle bénéfique contenu dans les HDL (high density lipoproteins) ou lipoprotéines de densité élevée, du rôle plus délétère du cholestérol des lipoprotéines de densité plus basse, notamment les LDL (low density lipoproteins).

Les lipoprotéines, généralement classées selon leur densité et leur taille, varient par leur composition lipidique et protéique. Le cœur lipidique hydrophobe des lipoprotéines, constitué d'esters de cholestéryle et de triglycérides, est recouvert d'une enveloppe dont les principaux constituants sont les phospholipides, le cholestérol non estérifié et les apolipoprotéines. Celles ci confèrent à chaque lipoprotéine ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique. Ainsi les apolipoprotéines A sont principalement associées aux HDL, l'apolipoprotéine B100 aux LDL, les apolipoprotéines C aux VLDL (very low density lipoproteins, lipoprotéines de très faible densité) et HDL (high density lipoproteins), et les apolipoprotéines E aux VLDL et aux HDL. Plusieurs études cliniques ont montré que les individus avec une concentration élevée de LDL petites et denses présentaient un risque accru de maladies cardio-vasculaires [Krauss et al. 1994]. Cette augmentation du risque s'explique par l'augmentation de la susceptibilité à l'oxydation des LDL petites et denses, par leur forte affinité avec les protéoglycannes (PG) de la paroi artérielle, par leur plus faible affinité pour leurs récepteurs cellulaires de l'apo B/E (ils sont ainsi sont captés principalement par les récepteurs scavenger), et leur capacité importante de pénétration de la paroi vasculaire [Packard et al. 1999].

Des études *in vitro* ont permis de démontrer que des séquences, chargées positivement de l'apolipoprotéine B-100 des LDL, se fixent sur les chaînes chondroïtine sulfate des PG [Chait et al. 2000]. Des complexes LDL-PG peuvent se former par l'intermédiaire de la lipoprotéine lipase [Williams et al. 1995], permettant aux PG de fixer les LDL dans l'espace sous-endothélial et dans la media de l'artère. Le catabolisme des complexes PG-LDL est diminué par rapport à celui des LDL libres. Les PG sont des macromolécules de la MEC (matrice extra cellulaire), formées d'une chaîne polypeptidique, appelée protéine « coeur » sur laquelle sont greffés des glycosaminoglycanes (GAG).

Dans les vaisseaux sanguins, les PG ont des rôles très variés : fixation des cellules vasculaires à leur matrice environnante, liaison des cytokines sur la cellule ou dans la MEC, fixation des enzymes du métabolisme lipidique et réserve de facteur de croissance. L'oxydation des LDL se produit majoritairement *in situ*, de très faibles quantités de LDL oxydées étant retrouvées dans la circulation [Steinberg, 1997]. La production cellulaire de RLO (radicaux libres oxygénés) pourrait être à l'origine de l'oxydation des LDL ainsi que de la lipoprotéine (a) [Chilsom et al. 1999]. Il a été récemment démontré que les macrophages, enrichis en lipides peroxydés, stimulent la capture des LDL oxydées, par induction de l'expression de son récepteur scavenger CD36 [Fuhrman et al. 2002].

Les LDL interviennent dans les premiers stades de formation de la plaque. Elles s'accumulent dans l'espace sous-endothélial, et déclenchent le recrutement et l'infiltration dans l'intima vasculaire des cellules monocytaires circulantes, responsables de la formation de la « strie lipidique ». Il est actuellement établi que l'oxydation des lipoprotéines est au centre du processus d'athérosclérose.

Les LDL peuvent être oxydées par voie chimique ou enzymatique. L'oxydation par voie chimique résulte de l'attaque des acides gras polyinsaturés par des radicaux libres oxygénés (RLO).

Les LDL peuvent être oxydées au contact des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses ou des macrophages [Chilsom et al. 1999]. Schématiquement, les étapes de l'oxydation des LDL comportent [Witztum et al. 1991] :

- le démarrage du mécanisme, qui se traduit par une peroxydation lipidique de la surface de la LDL, au départ limitée
- la propagation du phénomène dépend de la phospholipase A2, qui provoque une amplification de la peroxydation, conduisant à une fragmentation des acides gras polyinsaturés et à la production d'aldéhydes et de cétones. Les cétones sont éliminées, mais les aldéhydes se lient aux résidus de lysine de l'apolipoprotéine B, le ligand du récepteur des LDL. Une modification conformationnelle de l'apo B s'ensuit, entraînant une perte de la reconnaissance par le récepteur des LDL natives, mais lui conférant la capacité de se lier aux récepteurs *scavengers*. L'oxydation des LDL par les cellules endothéliales, et non par les cellules musculaires lisses ou par les macrophages, nécessite le contact entre LDL et cellules.

Par ailleurs, les LDL immobilisées dans la matrice extracellulaire sous-endothéliale, peuvent subir une attaque enzymatique non oxydative par des protéases ubiquitaires et la cholestérol estérase, avec production de particules de LDL non oxydées, de 10 à 200 nm de diamètre, capables d'activer le complément et d'induire une réponse inflammatoire des cellules vasculaires et des macrophages [Klouche et al. 2000].

Après leur séquestration dans l'intima, les LDL induisent une régulation positive des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et facilitent ainsi la transmigration des monocytes. Les monocytes sont ainsi activés en macrophages au contact des protéines de la matrice extracellulaire [Figure 3]. L'adhérence des monocytes à l'endothélium implique la liaison de protéines exprimées à la surface endothéliale, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) ou ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1), à des ligands de la famille des intégrines présents sur la membrane des leucocytes [respectivement VLA-4 (Very Late Antigen-4) ou  $\alpha_4\beta_2$  et LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) ou  $\alpha_L\beta_2$ ,] (voir chapII-1 .3.2).

Les LDL oxydées représentent très probablement l'agent de stimulation primaire intervenant dans l'activation des cellules endothéliales, alors que les cytokines inflammatoires exprimées par les cellules de la plaque interviennent comme des facteurs d'amplification et de pérennisation de l'activation endothéliale.

### II.1.3.2- Rôle des monocytes/macrophages

Les monocytes font partie du système phagocytaire et représentent environ 10 % des leucocytes circulants. Ils jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme et dans le développement des lésions athéromateuses. Ils appartiennent à une famille composée des promonocytes, cellules souches précurseurs dans la moelle osseuse, des monocytes circulants dans le sang périphérique et des macrophages résidents dans les différents tissus et cavités (pleurale, péritonéale). Ils sont issus du stade monoblastique des cellules souches, et passent après deux à trois divisions de la moelle osseuse dans la circulation sanguine où ils séjournent quelques heures, avant de pénétrer dans les tissus par diapédèse.

Les monocytes mesurent 10-20 µm, et sont caractérisés par un noyau encoché, un cytoplasme contenant de fines granulations azurophiles et un appareil de Golgi très développé. Chez l'adulte normal, le pourcentage de monocytes circulants se situe entre 3 et 10 % des cellules nucléées, alors qu'ils n'en représentent que 2 à 3 % dans la moelle osseuse.

Les macrophages sont de plus grande taille et présentent des microtubules, des lysosomes, un appareil de Golgi, un ergastoplasme granulaire, des microvillosités, des vacuoles de phagocytoses plus développées que dans les monocytes.

Les macrophages provenant de la différenciation monocytaire sont localisés dans différents tissus comme la rate, le foie, les ganglions, le tissu conjonctif sous-cutané. Cette différenciation est à l'origine de l'augmentation de la production de facteur tissulaire et donc de l'activité pro coagulante [Meisel et al., 2002]. Les macrophages captent et internalisent de grandes quantités de lipoprotéines oxydées par l'intermédiaire des récepteurs scavengers qui ne sont pas sous le contrôle du contenu intracellulaire en cholestérol, à l'inverse des récepteurs des LDL (cf chap II.1.3.2). Les LDL liés aux PG peuvent également être phagocytées directement par les macrophages [Hurt E., 1990] pour permettre la formation de la strie lipidique.

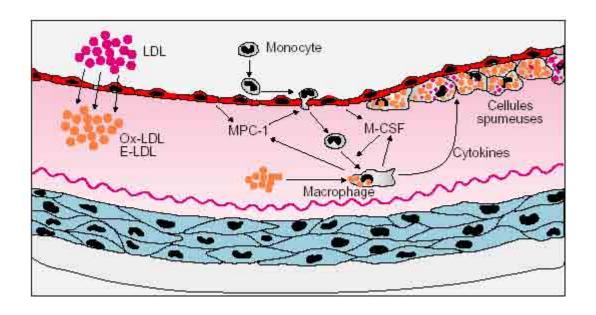


FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA FORMATION DE LA STRIE LIPIDIQUE

D'après Tedgui et Mallat, 2001.

- 1. Pénétration et accumulation des LDL dans l'intima.
- 2. Oxydation des LDL (Ox-LDL) et modifications enzymatiques (E-LDL).
- 3. Recrutement, margination et diapédèse des monocytes-macrophages.
- 4. Captation des LDL modifiées par les macrophages par l'intermédiaire des récepteurs « éboueurs » (« scavengers ») et transformation des macrophages en cellules spumeuses.

Au cours du développement de l'athérosclérose, l'endothélium est le siège d'une réaction inflammatoire qui favorise le recrutement des monocytes et des lymphocytes circulants. En effet,

lors des premières étapes de la formation de la plaque, les LDL circulantes s'accumulent dans l'espace sous-endothélial, ce qui déclenche le recrutement et l'infiltration de monocytes circulants dans l'intima. Lorsque les monocytes adhérent et traversent la couche endothéliale, des molécules d'adhérence sont exprimées *de novo* ou de façon plus importante à la surface des cellules endothéliales. Les premières d'entre elles, impliquées dans la margination ou « rolling » des monocytes, sont les P- et E-selectines. Elles permettent ainsi l'adhésion des monocytes préalablement recrutés au niveau de l'endothélium grâce à la monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) [Namiki et al., 2002], fortement exprimée par les macrophages et les cellules musculaires lisses (CML) dans la plaque d'athérosclérose humaine, et dont le rôle dans l'athérogenèse a été démontré chez des souris déficientes en MCP-1 ou en son récepteur CCR2 (CC chemokine Receptor 2) [Boring et al., 1998] : ces animaux ne développent quasiment plus de lésions athéroscléreuses.

Dans un second temps, les monocytes adhérent à l'endothélium, en se fixant par l'intermédiaire de protéines membranaires VCAM-1 ou ICAM-1, à des ligands de la famille des intégrines présents sur la membrane des leucocytes, respectivement VLA-4 ( $\alpha_4\beta_2$ ) et LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$  ou CD11a/CD18). Ces molécules sont peu, ou pas exprimées à la surface d'un endothélium normal, mais leur expression peut être induite par les LDL oxydées [Berliner et al. 1995] ou par les cytokines pro inflammatoires [tumor necrosis factor (TNF) alpha, interleukine (IL-1)]. Les LDL oxydées jouent un rôle clé dans l'activation de LFA-1, ainsi que dans la migration transendothéliale et l'adhésion médiée par LFA-1 des monocytes au niveau des sites d'athérome, via la protéine kinase C [Mine et al. 2002].

Les monocytes/ macrophages présents dans la plaque ont la capacité de s'y multiplier. Le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), facteur hématopoïétique de différenciation et de prolifération des monocytes, est produit localement par les cellules endothéliales et les CML de la plaque d'athérosclérose. La multiplication et la différenciation des monocytes/macrophages dans la plaque sont d'une importance capitale dans l'athérogénèse. On peut donc penser que les macrophages, qui pénètrent dans la paroi pour épurer l'intima de la surcharge en cholestérol, se chargent de cholestérol via les récepteurs scavengers pour former les cellules spumeuses. Ils entretiennent ainsi un cercle vicieux en activant les cellules endothéliales et en augmentant la perméabilité aux LDL, par le biais de la production de cytokines pro inflammatoires.

### II.1.3.3-Les récepteurs scavengers

Les récepteurs scavengers (SR) ont été décrits la première fois en 1990. Ils sont regroupés en fonction de leur homologie de séquence et de structure, et caractérisés par leur capacité à lier des macromolécules négativement chargées, dont les LDL oxydées et les corps apoptotiques [Mazzone, 2000]. La famille des SR regroupe six classes différentes : la classe A (SR-AI , SR-AII, MARCO, SRCL), la classe B (CD-36 et SR-B1), la classe D (CD68), la classe E (LOX-1), la classe F (SREC-I, SREC-II), la classe G (SR-PSOX/CXCL 16) [Figure 1 ][Moore and Freeman, 2006].

Les récepteurs de classe A ont en commun un domaine collagénique et une structure homotrimérique. Les récepteurs SR-AI et SR-AII sont exprimés à la surface des macrophages tissulaires, sur les cellules endothéliales aortiques et les cellules musculaires lisses vasculaires. Au niveau des macrophages, ils permettent la captations des phospholipides anioniques, du lipopolysaccharide (LPS), du peptide β-amyloïde, des LDL oxydées, des cellules apoptotiques, et des produits avancés de la glycation (AGE: advanced glycation end-product). Ils sont particulièrement exprimés dans les macrophages et peuvent induire la formation des cellules spumeuses. Les études *in vivo* chez la souris restent très controversées quant au rôle de ces récepteurs dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Les récepteurs de classe A semblent jouer un rôle différent en fonction du stade précoce ou avancé de l'athérosclérose.

Dans les lésions avancées, où l'apoptose des macrophages mène à la formation des corps nécrotiques et à la déstabilisation de la plaque, le SR-A permet l'induction de l'apoptose et l'épuration des corps nécrotiques. Dans les stades précoces, l'expression du récepteur SR-A diminue l'adhérence des cellules monocytaires aux cellules endothéliales, et réduit donc le diamètre de la lésion d'athérosclérose [Jalkanene et al. 2003].

Le récepteur MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) a été cloné pour la première fois en 1995 [Murphy et al. 2005]. Sa structure au niveau de son domaine collagénique et de son extrémité C-terminale, riche en cystéine, est similaire au SR-AI mais l'hélice  $\alpha$  est absente. Son rôle dans l'athérosclérose a été moins bien étudié.

Les récepteurs de classe B ont été mis en évidence par une description initiale du CD36 qui est un récepteur multiple transmembranaire de 88 kDa [Rigotti et al. 1995]. Cette classe de récepteur contient deux autres membres : le SR-BI et la protéine intégrale membranaire lysosomiale type II. Le CD36 et le SR-BI jouent un rôle distinct dans l'athérosclérose.

L'importance du CD36, dans l'initiation et la pérennisation de l'athérosclérose, a été mise en évidence par sa capacité à diminuer la taille des lésions vasculaires chez des souris déficientes en ApoE et ses capacités à endocyter les LDL oxydées [Collot-Teixeira et al. 2007]. Le CD36 lie différents ligands comme les cellules apoptotiques, les phospholipides anioniques, les AGE, le peptide β-amyloïde [Husemann et al., 2001], les lipoprotéines natives (LDL, HDL, et VLDL), la thrombospondine –1, les acides gras, les ligands dérivés de pathogène. Par contre, contrairement au SR-AI et SR-AII il ne lie pas avec une grande affinité les LDL acétylées et les LDL très oxydées. Le CD36 contribue ainsi a une liste variée de phénomènes physiologiques et pathologiques comme : le transport des acides gras, la clairance des cellules apoptotiques, l'adhésion, l'angiogénèse, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et la défense bactérienne. Plusieurs études mettent en évidence son rôle dans l'épuration des LDL oxydées, contribuant à l'accumulation des esters de cholestéryle dans les macrophages exposés aux LDL soumis à l'oxydation [Kunjathoor et al. 2002]. Le CD36 peut également promouvoir un signal pro inflammatoire, pouvant entraîner une inflammation chronique dans la paroi artérielle. La voie de signalisation correspondant à divers stimuli (peptides amyloïdes, LPS, thrombospondine) est connue, contrairement à celle induite par les LDL oxydées [Figure 2].

SR-BI et SR-BII présentent une homologie structurale en acides aminés de 30 % avec le CD36, et comme ce dernier, sont capables de lier des formes modifiées de LDL, des formes natives de HDL, LDL, et VLDL [Acton et al., 1994 ; Acton et al., 1996]. SR-BI reconnaît également des ligands typique comme les AGE, cellules apoptotiques, les phospholipides anioniques, le sérum amyloïde A, et le peptide β-amyloïde [Rigotti et al., 1995 ; Husemann et al., 2001].

Le SR-BI a cependant une plus grande affinité pour les HDL, et facilite la recapture sélective de cholestérol et le transfert aux HDL, le transport inverse du cholestérol [Acton et al. 1996]. Il est hautement exprimé dans le foie et les macrophages, les glandes surrénales, les ovaires, les testicules [Acton et al. 1996]. Ainsi, il permet d'amener de façon sélective du cholestérol des HDL aux tissus de la stéroidogénèse et au foie.

La classe D comprend le CD68, protéine lysosomiale exprimée dans les macrophages, les cellules dendritiques et le système réticulo-endothélial. La spécificité de ligands semble large, comprenant les LDL oxydées, les phospholipides anioniques, les cellules apoptotiques. Elle semble jouer un rôle dans le processus endolysosomial des LDL oxydées.

La classe E comprend LOX-1 (lectin-like OxLDL receptor), qui est une protéine transmembranaire type II « lectin-like ». Elle se trouve dans les cellules endothéliales d'aorte bovine, les macrophages, les cellules musculaires lisses vasculaires, et est présente dans les lésions d'athérosclérose chez l'homme [Moore and Freeman, 2006]. Des études sont en cours sur des souris  $LoxI^{-/-}$  pour définir son rôle exact dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

La classe F comprend SREC-I et SREC-II (scavenger receptor expressed by endothelial cells), exprimés par les cellules endothéliales. Ces récepteurs transmembranaires comprennent un domaine de type facteur de croissance épidermique « Epidermal Growth Factor » (EGF). Ils ont la capacité de lier les LDL modifiées, mais seul SREC-I (a la capacité d'internaliser le ligand pour le dégrader. Des études sont en cours chez la souris pour déterminer son rôle dans l'athérosclérose [Greaves et al. 2005].

La classe G comprend SR-PSOX (scavenger receptor phosphatidylserine and oxidized receptor), qui a été identifié comme étant capable de lier les LDL oxydées et comme ligand de la chimiokine CXC membranaire [Greaves et al., 2005]. Il fixe les lipoprotéines oxydées et le phosphatidylsérine.

Son rôle dans l'athérosclérose n'est pas encore clair. Il est présent dans les macrophages, l'endothélium et les cellules musculaires lisses [Moore and Freeman, 2006].

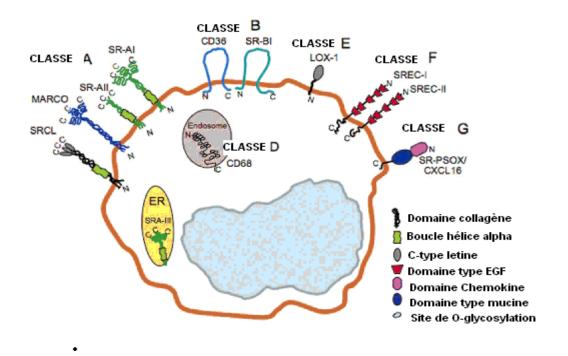
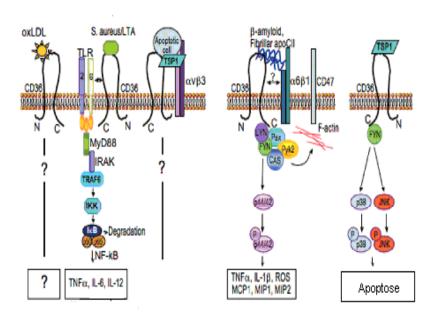


FIGURE 2: LES DIFFERENTES FAMILLE DE RECEPTEURS SCAVENGERS

Adapté de Moore and Freeman, 2005.

# MACROPHAGES/CELLULES DENDRITIQUES MACROPHAGES/MICROGLIE CELLULES ENDOTHELIALES



# FIGURE 3: CASCADES DE SIGNALISATION DE CD36 PAR DES LIGANDS MODIFES OU NON.

D'après Moore and Freeman, 2005.

#### II.1.3.4-Rôle des cytokines

Un grand nombre de cytokines pro inflammatoires interviennent au cours de la constitution de la plaque d'athérome. Elles sont d'origine mixte, leucocytaire et vasculaire, et sont présentes au sein de la plaque. On retrouve principalement TNFα (tumor necrosis factor alpha), IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, et IFNγ (interféron gamma).

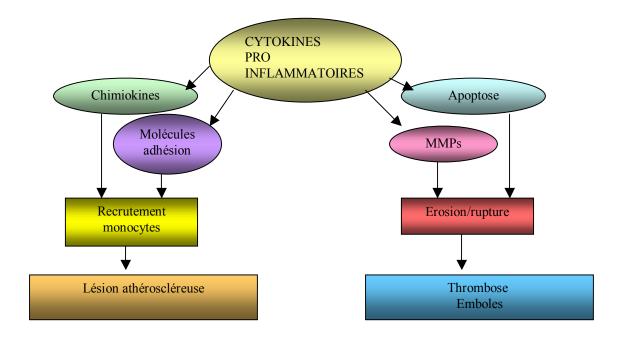
Elles peuvent d'une part stimuler la libération de MCP-1 et IL-8 par les cellules de la plaque, provoquer ainsi le recrutement des monocytes, et d'autre part favoriser leur adhérence à l'endothélium en induisant l'expression par les cellules endothéliales des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 [Figure 4]. La production de collagènes de type I et III (principaux collagènes des plaques d'athérome), par les cellules musculaires lisses, est fortement inhibée par l'IFNγ [Amento et al. 1991]. L'IL-1 et le TNFα sont capables de stimuler la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs) par les cellules musculaires lisses. Les métalloprotéinases (cf chapII1.6.1) sont des enzymes capables de dégrader les protéines de la matrice extra cellulaire, et donc de remodeler la plaque, avec risque d'embolisation dans les gros vaisseaux.

Le rôle de l'IFNγ dans l'athérome a été mis en évidence chez la souris apoE/E<sup>-/-</sup> déficiente en récepteur de l'IFNγ, chez laquelle on constate une nette réduction de la taille des lésions athéroscléreuses, avec une forte augmentation du contenu en collagène [Gupta et al. 1997]. Les cytokines pro inflammatoires modifient également les propriétés fibrinolytiques des cellules endothéliales en diminuant la production de l'activateur du plasminogène de type tissulaire et en augmentant la production de l'inhibiteur du tPA, le PAI-1 (cf chap II.2).

Une autre cytokine, l'IL-10, intervient dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Les cytokines anti-inflammatoires sont en général synthétisées par les lymphocytes T de type Th2, mais l'IL-10 se singularise puisqu'elle est également produite en grandes quantités par les macrophages et qu'elle intervient dans le contrôle direct de la production de TNFα. Par ailleurs, l'IL-10 inhibe l'expression des métalloprotéinases MMP-1 et MMP-9 par les macrophages, et stimule l'expression de l'inhibiteur endogène des MMP, le TIMP-1 [Lacraz et al. 1995]. Elle inhibe l'activation du facteur de transcription NF-κB, ainsi que l'expression du facteur tissulaire par les monocytes activés.

L'ensemble de ces propriétés confère à l'IL-10 un rôle potentiellement anti-athérogène et antithrombotique. Elle est présente dans les plaques d'athérosclérose humaines et, de manière prévisible, son expression locale est inversement corrélée aux signes d'inflammation et à la mort des cellules par apoptose.

Des études réalisées sur les souris *IL-10*—/— ont montré l'importance de cette cytokine dans la stabilité de la lésion. Les plaques provenant de souris *IL-10*—/— contiennent plus de lymphocytes T, plus d'IFN-γ et moins de collagène, selon des caractéristiques propres aux plaques instables et vulnérables [Mallat et al. 1999].



# FIGURE 4: ROLE PRO-ATHEROGENE DES CYTOKINES PRO INFLAMMATOIRES

D'après Tedgui A. Mallat Z., « l'athérosclérose », Ed Masson.

# II.1.4- Matrice extracellulaire des artères et collagène de type I

#### II.1.4.1- Généralités

La matrice extracellulaire (MEC) fournit à la paroi vasculaire la structure de soutien et les propriétés d'élasticité et de résistance à l'étirement. Ces propriétés mécaniques jouent un rôle capital, notamment au niveau des gros troncs artériels. Elle contribue également au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. La MEC et ses altérations peuvent être par conséquent à l'origine d'anomalies telles que l'apoptose, la différenciation anormale ou la transformation maligne.

La matrice extracellulaire est constituée de quatre grandes classes de protéines possédant des propriétés très variées : l'élastine, les protéoglycannes, les glycoprotéines de structure et les collagènes [tableau 2]. Chaque protéine exerce une fonction particulière, et la combinaison de toutes ces protéines assure à la matrice extracellulaire des propriétés structurales diversifiées ainsi qu'une importante capacité de régulation de l'activité cellulaire [Bosman et Stamenkovic, 2003]. La composition de la MEC se modifie au cours du développement, lors du vieillissement ou dans certaines pathologies vasculaires [Dingemans et al. 2000].

Dans ce chapitre nous décrirons le collagène de type I, et plus brièvement l'élastine, les différentes glycoprotéines de structure, et les protéoglycannes.

<u>COMPOSANT</u>	<u>PROTEINES</u>	<u>PROPRIETES</u>
STRUCTURAL	CONSTITUTIVES	<u>PRINCIPALES</u>
Fibres de collagène	Collagènes I et III (90%)	Résistance à l'étirement
	Collagènes V, VI, VIII, XII, XIV,	Soutien  Modulation des fonctions cellulaires
	XV, XVIII	Troduction des fonctions conditantes
	Protéoglycannes	
T'1 (1 ()	(décorine, biglycanne) Elastine (environ 90%)	
Fibres élastiques	Fibrillines 1 et 2	
	MAGP (Microfibril Associated	
	GlycoProteins)	Elasticité
	Emilines 1 et 2	
Membranes basales	Collagène IV	Résistance de la membrane basale
		Adhésion cellule-membrane,
	Laminines, Entactine	Formation de matrice péri-cellulaire
	Perlecane (HS-PG)	
Autres	Protéoglycannes	Formation de matrice, modulation
composants matriciels		de l'angiogénèse
•	Glycoprotéines de structure : Fibronectine et vitronectine	Adhésion cellule-matrice, migration cellulaire
	Fibronectine et vitronectine	centulaire
	Thrombospondine	Inhibition de l'angiogénèse
	Ténascines	Migration cellulaire
	Ostéopontine	Remodelage tissulaire

Tableau 7 Principales glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

# II.1.4.2- Le collagène de type I

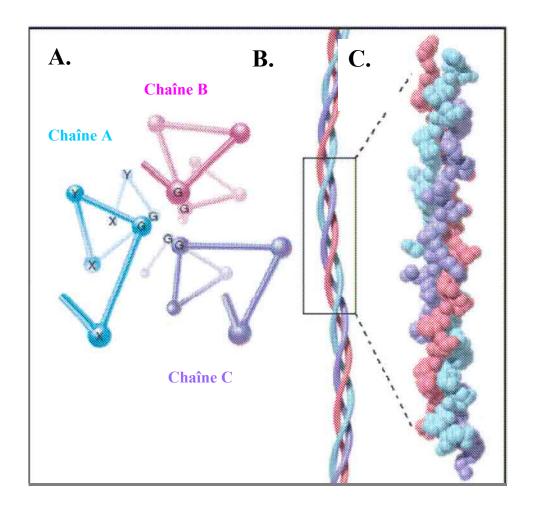
#### a- Généralités

Les collagènes constituent jusqu'à 60 % des protéines totales de la plaque d'athérome, et contribuent à la croissance de la plaque et au rétrécissement de la lumière artérielle. Les plaques d'athérosclérose humaines contiennent principalement des collagènes de type III et de type I, ce dernier représentant environ les deux tiers du contenu total en collagène [Shekhokin et al. 1987].

Les collagènes sont présents dans tous les tissus conjonctifs et sont synthétisés par les cellules mésenchymateuses (fibroblastes, ostéoblastes, chondroblastes). Le plus souvent, ce sont des protéines fibrillaires, composées de trois chaînes polypeptidiques enroulées autour d'un même axe et adoptant sur la majorité de leur longueur une structure en triple hélice [Figure 5]. Cet arrangement est rendu possible grâce à la répétition de triplets d'acides aminés de type (Gly-X-X'), où X et X' sont fréquemment la proline (40% des cas) et la 4-L-trans-hydroxyproline (10% des cas). Le nombre de répétitions varie selon le type de collagène. De nombreux résidus de proline et lysine sont hydroxylés en 4-hydroxyproline (indispensables à la formation de la triple hélice) et en 5-hydroxylysine, sur lesquels se fixent des glucides (glucose et galactose) [Von den Mark et al. 1999]. Dans le cas des collagènes fibrillaires comme le collagène de type I, le triplet est répété de façon continue sur une distance d'environ 1000 acides aminés, alors que les collagènes non fibrillaires présentent des interruptions de ce motif le long de leur séquence primaire, conduisant à la formation de domaines « non collagéniques » plus nombreux.

# b- Structure du collagène de type I

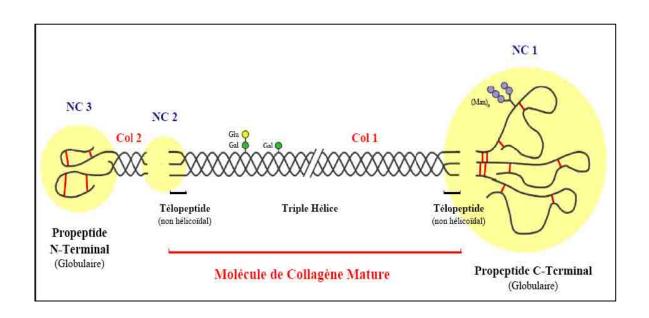
Le collagène de type I contient 2 types d'hélices polypeptidiques  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , associées dans un rapport 2:1 pour former une triple hélice droite qui mesure environ 10 nm. Le collagène de type I a aussi été décrit sous la forme d'un homotrimère composé de 3 chaînes  $\alpha_1$  [Uitto et al. 1979]. La molécule de collagène, appelée aussi tropocollagène, est longue d'environ 300 nm avec un diamètre de 1,5 nm. Les chaînes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sont constituées chacune d'environ 1000 acides aminés pour une masse moléculaire approximative de 95 kDa [Ricard-Blum *et al.* 2005].



# FIGURE 5: LA TRIPLE HELICE DE COLLAGENE.

D'après Pollard et Earnshaw, 2004

- (A) : Vue axiale de trois hélices gauches de type polyproline II centrées par des molécules de glycine (G).
- (B): Représentation schématique longitudinale d'une triple hélice de collagène.
- (C): Modèle tridimensionnel de la structure d'une triple hélice de collagène



#### FIGURE 6: REPRESENTATION DES DOMAINES DU PROCOLLAGENE DE TYPE I

D'après Gelse et al. 2003.

Le collagène I possède une structure presque exclusivement en triple hélice après clivage des propeptides N- et C-terminaux au cours de sa maturation. Il existe au sein de la triple hélice deux sites de glycosylation. La numérotation des zones collagéniques (Col) et des zones non collagéniques globulaires (NC) se fait à partir de l'extrémité C-terminale, contrairement à la numérotation habituelle des acides aminés d'une chaîne polypeptidique. *Abréviations*: Glu: glucose; Gal: galactose; Man: mannose.

Les différents domaines sont numérotés de l'extrémité C-terminale à l'extrémité N-terminale, à l'inverse des acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Dans la molécule de procollagène de type I, il existe une succession de domaines globulaires désignés par les lettres NC (pour « non collagénique ») et de domaines hélicoïdaux appelés « Col » (pour collagénique) [Figure 6]. La molécule de procollagène renferme 1400 acides aminés. De chaque côté de la zone en triple hélice, on trouve des régions composées, de 16 à 24 résidus d'acides aminés (respectivement du côté N- et C-terminal), non hélicoïdales, appelées télopeptides. Ces derniers ont principalement un rôle de régulation des fonctions cellulaires et de stabilisation des fibres de collagène.

# c- La biosynthèse du collagène de type I

Les gènes COL1A1 et COL1A2 sont transcrits sous forme de pré-pro, puis de pro-chaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ . Suite à la traduction, les résidus proline et lysine sont hydroxylés en hydroxyproline et hydroxylysine, des glucides sont ensuite ajoutés aux chaînes de procollagène dans la lumière du réticulum endoplasmique. L'hydroxyproline provient de l'hydroxylation post traductionnelle de la proline et représente 12 à 14 % des acides aminés de la molécule de collagène [Prockop et al., 1968; Von den Mark, 1999]. L'hydroxylation est catalysée par trois enzymes distinctes : la prolyl 4-hydroxylase, la prolyl 3-hydroxylase et la lysyl hydroxylase [Molnar, 2003]. La prolyl 4hydroxylase, couramment appelée « prolyl hydroxylase », catalyse l'hydroxylation sur le carbone 4 des résidus de proline des triplets X-Pro-Gly. Cette réaction est essentielle à la formation de la triple hélice et à sa stabilisation dans les conditions physiologiques, notamment thermiques. L'hydroxylysine, autre acide aminé caractéristique présent dans le collagène, existe sous deux formes glycosylées : galactosyl-hydroxylysine (GHL) et glycosyl-galactosyl-hydroxylysine (GGHL) [Moro et al. 1993]. Deux enzymes spécifiques catalysent ces réactions de glycosylation de type O-glycosidique : l'UDP-galactosyl-hydroxylysine transférase, qui catalyse l'addition de galactose sur des résidus d'hydroxylysine et l'UDP-glucosyl-galactosyl-hydroxylysine transférase, qui permet l'addition de glucose sur les résidus de GHL.

Après clivage du peptide signal, les chaînes de procollagène s'assemblent en triple hélice dans la lumière des vésicules de Golgi après les étapes d'hydroxylation et de glycosylation.

La formation de la triple hélice fait intervenir des protéines de liaisons et des protéines chaperons qui permettent les étapes d'assemblage et empêchent l'agrégation. Ces chaperons se lient aux peptides neo-synthétisés de façon transitoire et sont éliminés de la protéine mature. Certains sont spécifiques du collagène, dont la protéine HSP47 (Heat Shock protein), glycoprotéine de 47 kDa localisée dans le réticulum endoplasmique et induite par le stress [Lamandé et Bateman, 1999 ; Lefèvre et al. 2001], sont rôle n'est pas encore bien établi. Les interactions initiales menant à la formation de la triple hélice ont lieu entre les propeptides C-terminaux, qui ont un rôle fondamental dans l'alignement des chaînes. Le repliement des chaînes polypeptidiques se fait depuis l'extrémité C-terminale jusqu'à l'extrémité N-terminale, dans le sens inverse de celui de la traduction. La triple hélice est stabilisée par des ponts disulfure mis en place entre les propeptides C-terminaux par la disulfure isomérase, sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase.

Les molécules de procollagène sont ensuite secrétées à l'extérieur de la cellule, où elles sont converties en tropocollagène. Ce processus implique le clivage des propeptides N- et C-terminaux par la procollagène N-protéinase et la procollagène C-protéinase (endopeptidases à Ca<sup>2+</sup>). Cette étape est nécessaire à la fibrillogenèse ultérieure. Après clivage des propeptides, dans le collagène mature, il ne reste plus de ponts disulfure reliant les chaînes de collagène de type I.

Selon le modèle le plus accepté, les molécules de tropocollagène s'associent par six grâce à des liaisons hydrophobes et des liaisons hydrogène, parallèlement entre elles et avec un décalage d'environ un quart de leur longueur. L'association des molécules de collagène de type I produit dans les fibres une alternance de bandes claires et sombres qui leur donne un aspect strié, caractéristique en microscopie électronique, d'une périodicité de 64 nm. Ce décalage laisse libre une de leurs extrémités et permet ainsi la formation de fibres d'épaisseur et de longueur virtuellement indéterminées.

À ces fibrilles de collagène I s'associent des molécules de collagène III et V, qui participent à la régulation de la taille des fibrilles de collagène de type I, ainsi que des molécules de collagènes XII et XI, et des protéoglycannes comme la décorine ou le biglycanne.

Les fibrilles de collagène de type I peuvent elles-mêmes s'assembler pour former des fibres composées de fibrilles parallèles les unes aux autres, comme dans les tendons, ou former des réseaux complexes de fibrilles enchevêtrées, comme dans la peau.

Si, au cours de la vie embryonnaire, le collagène de type I est synthétisé de façon intense, cette synthèse se ralentit beaucoup après la naissance et, chez l'adulte, il semble que le renouvellement des molécules de collagène I soit extrêmement lent [Rossert et al.,2003].

# d- Les propriétés physico-chimiques du collagène de type I

La structure fibrillaire du collagène type I le différencie de la plupart des protéines de l'organisme qui possèdent généralement une structure globulaire. Cette particularité lui permet de former des assemblages supramoléculaires, selon un processus d'assemblage caractéristique des collagènes fibrillaires appelé fibrillogenèse. La compréhension de la fibrillogénèse repose sur des observations faites in vitro. Dans les conditions physiologiques, les molécules de collagènes sont sécrétées de façon ordonnée et conjointement avec des protéoglycannes et glycoprotéines de structure. En revanche, les molécules de collagènes extraites de tissus, pour une utilisation in vitro, proviennent de la dépolymérisation de protéines matures contenant des liaisons croisées. Les molécules extraites et purifiées en solution sont étudiées en l'absence de tout composant cellulaire ou d'autres composants de la matrice extracellulaire. La formation de fibrilles n'est effective que si des conditions de pH et température sont réunies [Wood et Keech, 1960]. Ainsi, la température doit être supérieure à 20°C et le pH proche des valeurs physiologiques. Cette particularité est utilisée in vitro pour réaliser des matrices tridimensionnelles de collagène fibrillaire (appelées lattis) et étudier le comportement cellulaire dans un environnement plus physiologique que les modèles traditionnels de culture bidimensionnelle [Bell et al. 1979]; Gillery et al., 1986]. En revanche, le collagène est soluble à 4°C et à pH acide, d'où le nom de collagène acido-soluble. C'est pourquoi, les méthodes conventionnelles d'extraction des collagènes fibrillaires présentent toutes une étape d'extraction en milieu acide et à froid [Kielty et Grant, 2002]. Enfin, le collagène de type I est transformé en gélatine après dénaturation, notamment par chauffage.

# II.1.4.3- L'élastine, les glycoprotéines de structure, et les protéoglycannes

#### a- L'élastine

Elle représente 90% des protéines des fibres élastiques. Les cellules vasculaires exprimant majoritairement l'élastine sont les cellules musculaires lisses [Sauvage et al. 1998]. En microscopie électronique, il apparaît que les fibres élastiques résultent de l'association de deux composants distincts : une structure centrale constituée d'élastine et autour de celle ci une structure fibrillaire. Le composant fibrillaire est constitué essentiellement de glycoprotéines de structure ou glycoprotéines microfibrillaires comme les fibrillines et les MAGP (Micrifobril-Associated Glycoprotein). L'élastine est insoluble dans la majorité des solvants et très résistante aux agents de dégradation, aussi bien chimiques que physiques, ainsi qu'à l'action des enzymes. Elle est toutefois dégradée par des protéinases spécifiques nommées élastases. L'élastine est synthétisée sous la forme d'un précurseur soluble, la tropoélastine [Vrhovski et al. 1998], et se caractérise par sa richesse en acides aminés hydrophobes : glycine (1/3), alanine (1/4), proline (1/9) et valine (1/9). Le gène de la tropoélastine comporte 34 exons, avec un rapport intron/exon de 20/1. Il est localisé sur le chromosome 7 en q11.1-21.1 [Jacob, 1993].

La partie C-terminale de l'élastine est très conservée dans toutes les espèces analysées (à plus de 70 %) et porte les deux seuls résidus cystéine de la protéine : elle possède un caractère hydrophile et servirait à l'accrochage des glycoprotéines de structure qui composent les microfibrilles.

Les microfibrilles associées à l'élastine jouent un rôle important dans l'élastogénèse. Elles constituent un réseau dans lequel les molécules de topoélastine s'alignent de façon ordonnée pour assurer la formation. Elles sont constituées de protéines telles que les fibrillines 1 et 2, les MAGP-1 et 2, et les MAGP-36 [Toyoshima et al. 1999].

Une protéine de 67 kDa, l'EBP (Elastin Binding Protein) est indispensable à l'élastogénèse. Elle joue le rôle de protéine chaperon se fixant à la tropoélastine nouvellement synthétisée à l'intérieur de la cellule. Elle empêche les molécules de tropoélastine de s'agréger et les protège d'une dégradation prématurée [Hinek et al. 1995].

#### b- Les glycoprotéines de structure

Le tissu artériel contient la plupart des glycoprotéines de structure trouvées dans les MEC : la fibronectine, les laminines, les thrombospondines, les ténascines, l'ostéospontine et les protéines de la famille CCN (CTGF/Cyr61/Nov : connective tissue growth factor, cystein-rich 61, nephroblastoma overexpressed), qui ne seront pas détaillées.

La fibronectine est une glycoprotéine dimérique synthétisée par les hépatocytes, par les cellules musculaires lisses, et par les fibroblastes, soluble et circulante dans le sang. Elle constitue la principale protéine d'adhésion des cellules de l'arbre vasculaire, et sert ainsi de ligand aux intégrines présentes de nombreuses cellules, notamment des plaquettes et des monocytes [Huo et al. 2000].

Chaque sous unité contient 4 modules répétés (12 fois pour le type I, 2 fois pour le type II, 15 à 17 fois pour le type III) qui déterminent les fonctions de la fibronectine. L'extrémité C-terminale est le site de liaison entre les deux sous-unités via un pont disulfure, puis on retrouve des modules permettant la fixation de l'héparine et de la fibrine, et enfin, vers le milieu de la molécule, les modules III portant la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) d'interaction avec les intégrines.

# c- Les protéoglycannes

Il s'agit de macromolécules complexes constituées d'une protéine cœur sur laquelle sont fixées par l'intermédiaire de liaisons covalentes, des chaînes de glycosaminoglycannes (GAG). Les chaînes de GAG sont composées d'unités répétées d'acide uronique et d'une osamine, plus ou moins sulfatée. Leurs propriétés physico-chimiques sont directement liées au degré de sulfatation et à leur protéine porteuse. Ainsi, les fonctions acides qu'ils portent confèrent aux protéoglycannes des charges négatives permettant de piéger les cations, l'eau et les divers métabolites, contribuant ainsi à l'hydratation des tissus et à la résistance aux forces de pression et d'étirement. Certains petits protéoglycannes telle que la décorine ou le biglycanne sont étroitement liés aux fibres de collagène.

Le diamètre des fibres du collagène est en partie influencé par la décorine [Danielson et al. 1997], qui inhibe in vitro la fibrillogénèse des fibres de collagènes de type I et II [Keene et al. 2000].

# II.1.5- Les métalloprotéinases matricielles (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP)

#### II.1.5.1- Les métalloprotéinases matricielles

#### a- Caractères généraux

Les MMP appartiennent à une famille de protéinases décrites pour la première fois en 1962 quand Gross J. et Lapiere C.M. ont identifié une enzyme, isolée de la queue de têtard, capable de dégrader le collagène [Gross et al. 1962].

Elles tirent leur nom de la nécessité de la présence d'un ion métallique pour leur activité enzymatique et de leur capacité à dégrader les protéines de la MEC. Elles présentent plusieurs caractéristiques communes comme la présence au sein de leur domaine catalytique d'un site de fixation d'un atome de zinc, de fortes homologies structurales, leur sécrétion sous forme d'une proenzyme inactive et la capacité de dégrader quasiment l'ensemble des constituants de la matrice extracellulaire [Somerville *et al.*, 2003].

Toutes les MMP possèdent à leur extrémité N-terminale une séquence signal (pré-pro-peptide) qui est éliminée au cours de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique. Toutes les MMP sont secrétées dans le milieu extracellulaire, hormis six d'entre-elles qui possèdent un domaine transmembranaire et sont exprimées à la surface cellulaire. Le peptide signal est suivi du domaine « pro » qui participe au maintien sous forme latente, zymogène, des MMP. Le site catalytique, contenant le motif de liaison de l'atome de zinc, est localisé à la suite de ce prodomaine.

Hormis la MMP-7 (matrilysine), la MMP-26 (matrilysine-2) et la MMP-23, presque toutes les MMP possèdent un domaine ressemblant à l'hémopexine et à la vitronectine (domaine hémopexine) relié au domaine catalytique par la région charnière (H; hinge).

Effets biologiques	MMP	Substrat
Migration et réépithélisation des	MMP-1	Collagène type I
kératinocytes		
Activation des ostéoclastes	MMP-1; -3	Collagène type I
Différentiation d'adipocytaire	MMP-7	Fibronectine
Migration cellulaire	MMP-1; -2 et 3	Fibronectine
Migration cellulaire	MT1-MMP	CD44
Apoptose des cellules épithéliales	MMP-3	Membrane basale
mammaires		
Formation alvéolaire épithéliale mammaire	MMP-3	Membrane basale
Conversion mésenshyme / épithéliale (cellules épithéliales mammaires)	MMP3	Cadherine-E
Conversion épithéliale/mésenchyme	MMP-2	Non identifié
Différenciation des cellules mésenchymes avec phénotype inflammatoire	MMP-1	Non identifié
Génération de fragments	MMP-3	Plasminogène
d'angiostatine like		
	MMP-7	Plasminogène
	MMP-9	Plasminogène
	MMP-12	Plasminogène
Augmentation de l'affinité du	MMP-2; -3; -7; -9 et	BM-40(SPARC/
collagène	-13 ( pas MMP-1)	Osteonectine)
Tubulogénèse rénale	MT1-MMP	Collagène type 1
Libération de bF-GF	MMP -3 et 13	Perlecane
Augmentation de la biodisponibilité de l'IGF 1 et prolifération cellulaire	MMP-1; -2.; -3; -3; - 7; et -19	IGFBP-3
Activation du VEGF	MMPs	CTGF
Migration de cellules épithéliales	MMP-2; MT1-	
Migration de cenules épithénales	MMP; MMP-19	5γ2 laminine
	MT1-MMP	5β3 laminine
Apoptose	collagenase	Collagène type1
Pro-inflammatoire	MMP-1; -3; et -9	Développement de 1L-
Résistance des cellules tumorales	MMP-9	1β à partir du précurseur ICAM-1
Anti-inflammatoire	+	
	MMP-1; -2; -9	Dégradation de 1L-1β
Anti-inflammatoire	MMP-1; -2; -3; -13; -14	Protéine 3 chémo
Augmentation de la biodisponibilité du TGFβ	MMP-2; -3; -7	Décorine

Interruption de l'agrégation cellulaire et augmentation de l'invasion cellulaire	MMP-3; MMP-7	E-cadherine
Réduction de l'adhésion cellulaire	MT1-MMP; MT2-	Transglutaminase de
	MMP; MT3-MMP	tissu cellulaire de surface
Apoptose médiée par le récepteur FAS	MMP-7	Fas ligand
Pro-inflammatoire	MMP-7	PRO-TNFα
Réduction de la réponse de IL-2	MMP-9	1L-2Rα
Activation PAR-1	MMP-1	Récepteur 1 activé par la protéase
Génération de vasoconstricteurs	MMP-2	Grosse endotheline
Disponibilité du TGFβ	MMP-9	Précurseur de TGFβ
Néo vascularisation thymique	MMP-9	Collagène IV
Apoptose des chondrocytes	MMP-9	Galactine 3
hypertrophiques et recrutement des		
ostéoclastes		

# Tableau 8 : Activités biologiques des MMP

D'après Nagase et Visse, 2006

Les MMP-7 et -26 ne possèdent pas ces deux domaines, alors que, dans la MMP-23, le domaine hémopexine est remplacé par un domaine riche en cystéine et en proline, ressemblant au récepteur de type II de l'interleukine-1 (C/Prich, IL1R-like). Quand le domaine hémopexine est présent, il module les liaisons des MMP aux TIMP, à certains substrats, ainsi que leur activité protéolytique. Les MMP peuvent être classées en six groupes d'après leurs différences structurales et de leur spécificité de substrat [tableau 4]

#### b- Activation des MMP

Les pro-MMP peuvent être activées *in vitro* par des protéinases ou des agents non protéolytiques. Le maintien des enzymes sous forme latente est assuré par l'interaction du groupement thiol du résidu cystéine, appartenant à la séquence consensus du prodomaine avec l'atome de zinc associé au site catalytique.

Les mécanismes d'activation des proMMP *in vitro* et *in vivo* sont de quatre types [Gaudin et al. 1998] :

*In vitro*, l'activation peut être provoquée par un processus physico-chimique initial, impliquant les dérivés organomercuriels, les radicaux libres oxygénés, le SDS, l'urée, la chaleur et conduisant à la dissociation de l'interaction cystéine-zinc et permettant l'autolyse du prodomaine [Figure 7].

*In vivo*, selon les métalloprotéinases, les mécanismes d'activation dépendent de l'un ou l'autre des mécanismes suivants :

- ➤ Un processus de clivage du pro peptide par des protéinases à sérine telles que la plasmine, la kallikréine, l'élastase leucocytaire, la cathepsine G [Nagase, 1997] [Figure 7].
- Un processus d'activation au niveau de la membrane cellulaire. Ce processus est décrit pour la proMMP-2 et la proMMP-13 qui sont fixées à la membrane cellulaire par un complexe MT-MMP-1/TIMP-2 [Sato et al. 1994]. Ce modèle d'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP peut également faire intervenir des récepteurs membranaires de la famille des intégrines et en particulier l'intégrine ανβ3 [Brooks et al. 1996].

➤ Un processus d'activation intracellulaire. Ce processus est décrit pour l'activation de la proMMP-11 et de la proMMP-14. La séquence consensus RXKR dans leur pro-domaine est reconnue par les furines, une famille de sérine protéinases [Pei et Weiss, 1995].

L'activité des MMP *in vivo* est contrôlée par des inhibiteurs endogènes spécifiques. Ces inhibiteurs, connus sous le nom de TIMP forment un complexe équimoléculaire avec les formes actives des MMP, et seront décrites au paragraphe II.1.6.2.

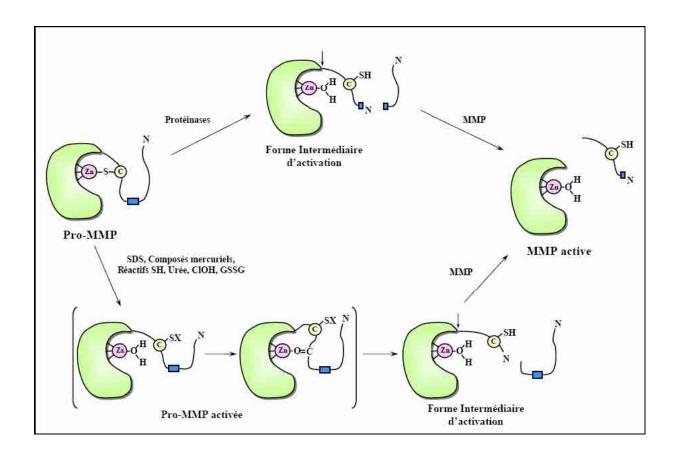
Cependant d'autres anti-protéinase, comme l'α2-macroglobuline peuvent également inhiber l'activité des MMP. Elle est trouvée en abondance dans le plasma dans les liquides physiologiques, et représente un inhibiteur endogène majeur. De plus, l'α2-macroglobuline peut se lier à la LRP (Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein, protéine apparentée au récepteur des lipoprotéines de faible densité). Cette liaison permet son endocytose mais également celle des complexes MMP/ α2-macroglobuline. Plus récemment, il a été montré que la proMMP-2 complexée au TIMP-2 pouvait également être recaptée par endocytose, après interaction de la protéine LRP, par un mécanisme indépendant de la thrombospondine-2 [Emonard et al. 2004].

Tableau 9: Représentation schématique de la structure des MMP

**STUCTURE** 

**NUMEROTATION** 

**CLASSE** 



# FIGURE 7 : ME CANISME D'ACTIVATION DES MMPS D'après Visse et Nagase, 2003

# *c- La MMP-9 (gélatinase B)*

#### **Définition**

La MMP-9 forme avec la MMP-2 (gélatinase A) une classe de MMP dont l'activité protéolytique est dirigée contre le collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et les collagènes de type IV et V de la membrane basale. Une caractéristique structurale de ces gélatinases est la présence, au sein du domaine catalytique, de trois séquences peptidiques répétitives analogues aux motifs de la fibronectine de type II. Ces dernières permettent la liaison à la gélatine. Cependant, La MMP-2 et la MMP-9 se différencient l'une de l'autre par la présence d'un domaine collagènique de type V dans la région charnière de la MMP-9 [Figure 8].

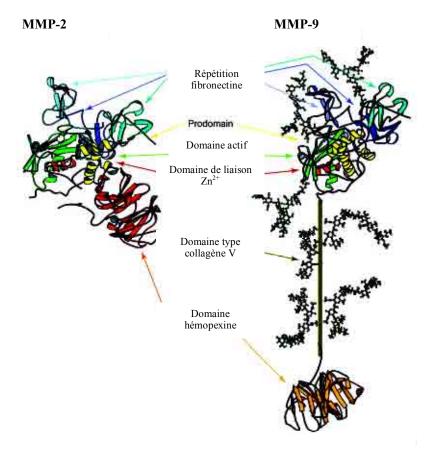


FIGURE 8 : COMPARAISON TRIDIMENSIONNELLE DES GELATINASES

D'après Opdenakker et al., 2001

Le gène de la MMP-9 est présent sur le locus q12 du chromosome 20, mesure 7,7 kb à partir du site d'initiation de la transcription et contient 13 exons [Huhtala et al. 1991].

#### *Rôle*

La MMP-9 est nécessaire à la migration de différents types cellulaires comme les leucocytes et les cellules cancéreuses, grâce à sa capacité de dégrader certains composants de la matrice extracellulaire (collagènes, élastine et agrécannes). La MMP-9 favorise la migration des leucocytes nouvellement formés de la moelle osseuse vers les vaisseaux sanguins, et des vaisseaux vers les tissus lors d'un processus inflammatoire. Elle est impliquée dans la migration des cellules cancéreuses lors de l'invasion et la formation de métastases. Elle a aussi un rôle très important dans l'angiogénèse tumorale [Sternlicht et Werb, 2001]. Dans ces phénomènes, les cellules cancéreuses produisent elles-mêmes la gélatinase B ou induisent sa production par les cellules avoisinantes.

Dans l'athérosclérose, elle est associée à l'instabilité de la plaque et donc un risque plus élevé d'accidents vasculaire aigus [Hobeika et al. 2007].

Contrairement aux polynucléaires neutrophiles qui contiennent de grandes quantités de MMP-9 dans leurs granules, les monocytes doivent synthétiser de novo la gélatinase B.

#### <u>Activation</u>

L'activation de la proMMP-9 peut être provoquée par de nombreux effecteurs comme la trypsine, la chymotrypsine, la kallikréine, la cathepsine G, la thermolysine, l'élastase des neutrophiles ou la thrombine [Morodami et al. 1992]. La proMMP-9 est aussi activée par certaines MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-13).

Elle se déroule en deux étapes : **un premier clivage** a lieu entre l'acide glutamique 40 et la méthionine 41, donnant une forme intermédiaire de 86 kDa, **un second clivage** est réalisé entre l'arginine 87 et la phénylalanine 88, aboutissant à une forme active de 82 kDa [Figure 9] [Woessner et Nagase, 2000].

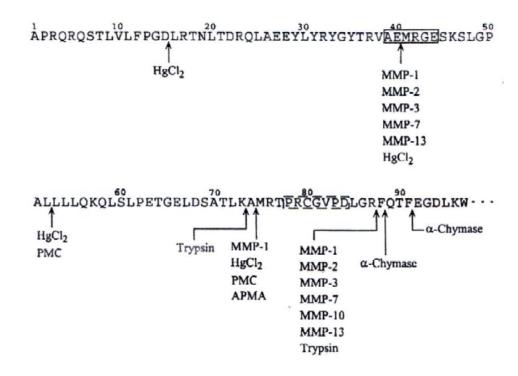


FIGURE 9 : SITES DE CLIVAGE DE LA PRO-MMP-9 PAR LES PROTEINASES ET LES AGENTS ORGANOMERCURIELS.

D'après Woessner et Nagase, 2000

L'activation des pro-MMP par la plasmine est une des voies importantes *in vivo*. La plasmine est générée à partir du plasminogène après son activation par les activateurs : tPA (tissue-type plasminogen activator, activateur tissulaire du plasminogène) et uPA (urokinase-type plasminogen activator, activateur du plasminogène de type urokinase), qui se fixe à un récepteur cellulaire spécifique (cf : chap II.2).

Le plasminogène et l'uPA sont associés au niveau membranaire, créant ainsi une activation localisée de pro-MMP et participent ainsi au turnover de la MEC. La plasmine peut également activer la pro-MMP-1, la pro-MMP-3, la pro-MMP-7, la pro-MMP-9, la pro-MMP-10, et la pro-MMP-13.

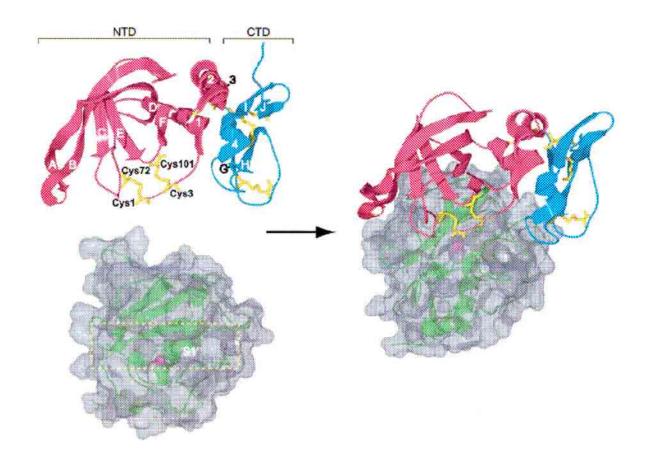
# II.1.5.2- Les Inhibiteurs tissulaires des Métalloprotéinases matricielles : Les TIMP

#### a- Caractères généraux

Les TIMP sont des inhibiteurs spécifiques des MMP. Quatre TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, et TIMP-4) ont été identifiés chez les vertébrés, et leur expression est régulée pendant le développement et le remodelage tissulaire. Ce sont de molécules de petite taille (21 à 29 kDa), qui se lient aux MMP de manière stœchiométrique et entraînent une inhibition réversible. Certaines pathologies associées à un déséquilibre de l'activité des MMP sont dues à des changements de concentrations de TIMP. Les TIMP possèdent des domaines N- et C-terminaux respectivement de 125 et 65 acides aminés, contenant chacun trois ponts disulfures. La partie N-terminale se replie comme une unité indépendante et est capable d'inhiber les MMP. La Figure 10 représente l'interaction de MT1-MMP avec le TIMP-2, et met en évidence la liaison du domaine amino-terminal des TIMP au domaine catalytique des MMP, bloquant ainsi l'accès à la poche contenant l'atome de zinc [Nagase et al. 2006].

#### b- TIMP-1 et TIMP-2

Le TIMP-1, le plus anciennement connu [Figure 11], est une glycoprotéine de 28 kDa, constituée de 207 acides aminés dont les 23 premiers sont clivés lors de la sécrétion dans le milieu extracellulaire. La conformation tridimensionnelle du TIMP-1 est très stable grâce à 12 résidus cystéine formant 6 ponts disulfure et 6 boucles [Figure 12]. Chaque TIMP possède deux domaines structuraux distincts : le domaine N-terminal (boucles 1 à 3) qui confère l'activité inhibitrice et le domaine C-terminal (boucles 4 à 6) qui se lie au domaine C-terminal de certaines MMP [Willenbrock et Murphy, 1994]. Le TIMP-1 possède deux sites de N-glycosylation au niveau des résidus d'asparagine 30 et 78, contrairement aux autres TIMP qui ne sont PA glycosylés. Ces glycosylations ne sont pas indispensables à l'activité inhibitrice du TIMP-1 [Caterina et al. 1998].



#### FIGURE 10: INHIBITION DES MMP PAR LES TIMP

D'après Visse et Nagase, 2003

Complexe de TIMP-2 avec le domaine catalytique de MT1-MMP. Sur la gauche, le TIMP-2 (en haut) et le domaine catalytique de MT1-MMP (en bas) sont représentés séparément. TIMP-2 est montré sur le schéma déroulé. Les ponts disulfure qui stabilisent la protéine sont représentés en jaune. Les hélices sont numérotées de 1 à 4 et les principaux feuillets de A à J. L'emplacement du site catalytique est indiqué par un rectangle. Le domaine actif contenant l'atome de zinc est visible sous forme d'une sphère et l'entrée spécifique est marquée S1. Le domaine catalytique situé sur le complexe à droite est enroulé autour de l'axe.

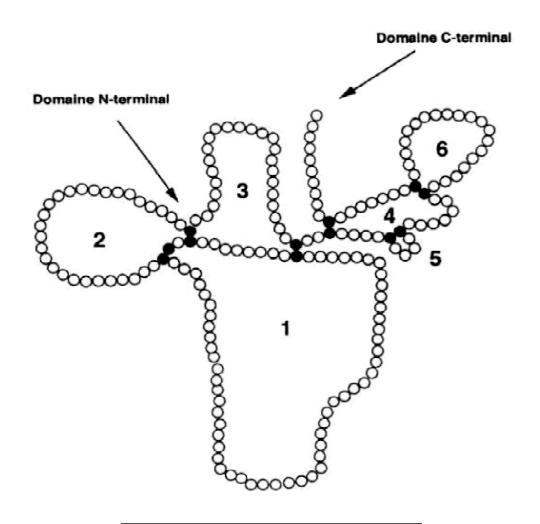
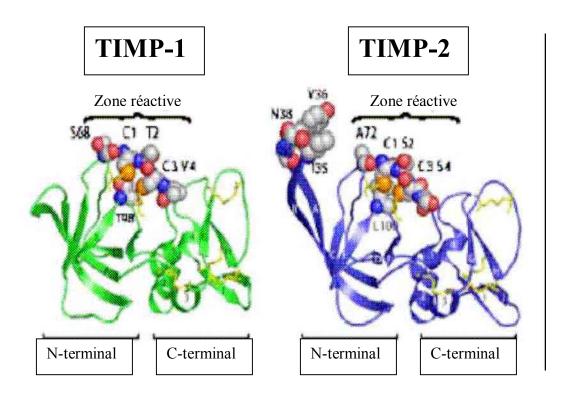


FIGURE 11 : STRUCTURE DU TIMP-1

D'après Willenbrock et Murphy, 1994



#### FIGURE 12: STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU TIMP-1 ET DU TIMP-2.

D'après Nagase et al. 2006

Les résidus Cys1, Thr2, Cys3, Val4, Ser68 et Thr98 du TIMP-1 et les résidus correspondants du TIMP-2 sont représentés en forme de sphère. Les ponts disulfure sont en jaune.

Le TIMP-1 se complexe à la quasi-totalité des MMP actives sauf la MMP-14 (MT1-MMP). La proMMP-9 est inhibée préférentiellement par le TIMP-1. Celui-ci, bien que capable de se lier à deux domaines distincts de la proMMP-9, ne peut se fixer simultanément à la MT1-MMP complexée à la proMMP-9 et donc participer à l'activation du pro-enzyme.

De plus, l'activation de la proMMP-9 complexée au TIMP-1 est difficile car le TIMP-1 inhibe les autres MMP responsables de l'activation de la proMMP-9.

Une mutation en position 2 (Thr pour le TIMP-1) diminue significativement l'affinité des TIMP pour les MMP. La substitution de cette thréonine par une glycine abolit l'action inhibitrice du TIMP-1 sur la MMP-9 [Meng et al. 1999].

Le TIMP-2 se fixe à la pro-MMP-2 et permet en fonction de sa concentration, son activation en formant un complexe MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2, ou son inhibition (lors d'une plus forte concentration de TIMP-2). Le TIMP-2 possède une activité mitogénique sur un grand nombre de lignées cellulaires, et inhibe le facteur de croissance des fibrablastes induit par la croissance des cellules endothéliales humaines [Brew et al. 2000].

# II.1.5.3- Rôle biologique des MMP et des TIMP dans les pathologies cardio-vasculaires

La plupart des MMP sont connues pour leur capacité de dégradation et de remodelage des molécules de la MEC dans les tissus, mais elles agissent également sur des molécules non matricielles. Elles interviennent dans la croissance cellulaire, la différenciation, la migration, les processus inflammatoires, la néovascularisation, l'apoptose, [Sternlicht et Werb, 2001; Hobeika et al. 2007].

Dans le cadre spécifique des pathologies cardio-vasculaires et notamment de l'athérosclérose, des études sur des souris invalidées ont mis en évidence le rôle de la MMP-2 et de la MMP-9 dans la rupture cardiaque post-infarctus [Hayashidani et al.,2003 ; Romanic et al.,2002]. La MMP-2 et la MMP-9 clivent l'élastine, le collagène de type IV, et de nombreuses autres molécules de la MEC. La MMP-2 digère également le collagène interstitiel de type I, II et III. Ceci leur confère un rôle fondamental dans le remodelage vasculaire, notamment dans les anévrysmes de l'aorte abdominale [Longo et al. 2002].

Les plaques d'athérome mature contiennent diverses sources de MMP, comme les cellules musculaires lisses (MMP-2) ou, les macrophages/cellules spumeuses (MMP-9). La perte de la régulation des MMP provoque la dégradation de la matrice de la strie lipidique, responsable de la rupture de la plaque [Galis et al. 1994]. Au cours de l'athérosclérose, la MMP-9 est utilisée comme marqueur diagnostique de l'instabilité de la plaque. Plusieurs études ont mis en évidence une association entre la concentration plasmatique de MMP-9 et les syndromes coronariens aigus [Hobeika et al. 2007].

Une étude récente montre que la MMT1-MMP (MMP-14) est également augmentée après la reperfusion à la suite d'ischémie [Deschamps et al. 2005]. Le déficit en TIMP-3 chez la souris est responsable d'hypertrophie spontanée du ventricule gauche, de cardiomyopathie et de dysfonction contractile.

# II.2- LE SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE

# **II.2.1-Introduction**

La fibrinolyse est un processus protéolytique multifonctionnel, qui permet d'une part la dégradation des dépôts de fibrine intra et extra vasculaires, et d'autre part la dégradation de la matrice extracellulaire (rôle important dans le cadre du remodelage tissulaire).

Elle se déroule en deux étapes principales :

- le plasminogène est transformé par des activateurs du plasminogène en plasmine sérine protéinase à large spécificité de substrat, dégradant la fibrine et donc le thrombus vasculaire.
- La plasmine activée devient spécifique et dégrade la fibrine en produits de dégradation solubles lors de la dissolution du thrombus.

Certains facteurs, comme la Lp(a), sont capables de modifier la liaison du plasminogène aux surfaces d'activation, réduisant ainsi la formation de plasmine, et de ce fait la fibrinolyse et la protéolyse péri-cellulaire.

# II.2.2-Le plasminogène et ses activateurs

# II.2.2.1 -Le plasminogène

Le plasminogène correspond à la forme zymogène de la plasmine. Il est présent à de fortes concentrations dans la circulation sanguine  $(0,2~g/l~;~2~\mu M)$  et en grande quantité au niveau de la MEC.

La conversion du plasminogène en plasmine est obtenue par clivage protéolytique, sous la dépendance de deux activateurs du plasminogène, l'activateur de type urinaire ou de type urokinase (uPA) et l'activateur de type tissulaire (tPA), retrouvés à de faibles concentrations au niveau plasmatique.

Le plasminogène est constitué d'une chaîne polypeptidique monocaténaire de 791 acides aminés [Figure 13]. Son gène est situé sur le chromosome 6 q26-27. Deux formes glycosylées majeures ont pu être mises en évidence, dont une forme avec un trisaccharide sur le résidu Thr . La seconde forme possède la même structure et un oligosaccharide sur le résidu Asn . Sa masse moléculaire est de 88 kDa, la masse moléculaire apparente étant de 92 kDa en raison de sa glycosylation en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

Deux liaisons peptidiques sont clivées pour former la plasmine : entre Arg <sup>561</sup> et Val <sup>562</sup> et entre Lys <sup>77</sup> et Lys <sup>78</sup>.

L'extrémité amino-terminale est constituée du peptide de pré-activation qui représente le peptide de 8 kDa clivé par la plasmine, et de cinq kringles (numéroté de 1 à 5) qui possèdent un fort degré d'homologie entre eux (40 à 60 %) [Castellino et al. 1987]. Cependant, les différents kringles se différencient par des variations au niveau des domaines qui constituent le site de liaison aux résidus lysine, le LBS (lysine binding site), expliquant ainsi des différences d'affinité et de spécificité par rapport aux ligands. Le LBS est situé entre les boucles internes du kringle et peut être défini comme une concavité délimitée par des résidus hydrophobes, possédant un pôle cationique et un pôle anionique.

Au moins trois de ces domaines kringles (KI, KIV et KV) interagissent avec les ligands aromatiques de type acides ω-amino carboxylique tels que la lysine ou son analogue structural, l'acide 6-amino-hexanoïque (εACA). Il est maintenant bien établi que le plasminogène est replié dans une conformation compacte inactivable, qui devient de plus en plus flexible et rapidement activable après liaison de l'εACA. Une concentration d'εACA de 3,3 mM provoque une stimulation de 50% de l'activation du plasminogène en plasmine. Les kringles KI et KIV sont les deux sites ayant la plus forte affinité pour l'εACA, avec un K<sub>D</sub> de 11 et 29 μM, respectivement [Vali et al. 1982 ; Hoover et al. 1993].

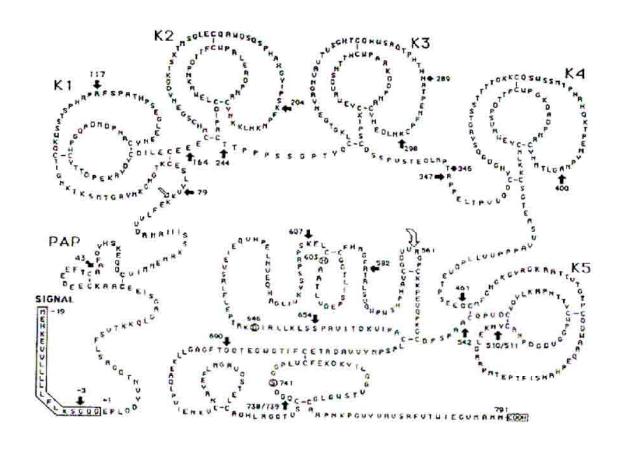


FIGURE 13 : STRUCTURE PRIMAIRE DU PLASMINOGENE

D'après Petersen et al. 1990

# II.2.2.2 – <u>Les activateurs du plasminogène</u>

#### a- Introduction

Les deux sérines protéinases plasmatiques capables de cliver spécifiquement le plasminogène en plasmine sont le tPA et l'uPA. Elles sont synthétisées sous forme monocaténaire et présentent une homologie de séquence élevée qui témoigne d'une évolution commune.

Trois voies d'activation du plasminogène sont décrites : les deux activateurs du plasminogène, et la voie dépendante du facteur XII [Lijnen et al. 1995].

Les activateurs du plasminogène sont retrouvés à de faibles concentrations dans la circulation : 5 ng/ml (80 pM) pour le tPA, et 2 ng/ml (40 pM) pour l'uPA. Bien que les deux enzymes catalysent la même réaction, elles sont impliquées dans des processus physiopathologiques différents. Le tPA se lie à la fibrine par son domaine « kringle », d'où son implication dans la fibrinolyse. L'uPA possède dans sa structure un domaine ressemblant à l'EGF qui permet sa liaison à un récepteur exprimé à la membrane cytoplasmique des cellules (uPA-R). Ainsi, l'uPA est associé aux phénomènes qui impliquent une activité plasmine péri-cellulaire.

L'activité de la plasmine et de ses activateurs est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques endogènes : l' $\alpha$ 2-antiplasmine ( $\alpha$ 2-AP) et les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI). L' $\alpha$ 2-AP est trouvée à une concentration élevée dans la circulation (70 mg/l; 1  $\mu$ M). C'est une glycoprotéine monocaténaire de 70 kDa, synthétisée par le foie.

Il existe deux types de PAI, PAI-1 et PAI-2. PAI-1 est une glycoprotéine de 50 kDa et est le principal inhibiteur des PA. Il est retrouvé dans de nombreux tissus et synthétisé par de nombreuses lignées cellulaires en culture (cellules musculaires lisses, fibroblastes, hépatocytes), sa concentration plasmatique est de 30 mg/l (essentiellement d'origine endothéliale). Un pool plaquettaire dans les granules α, libéré au cours de l'activation plaquettaire, aurait un rôle mineur dans l'activité inhibitrice du plasma, du fait de sa faible activité sur le tPA. Sa concentration plasmatique s'élève chez l'obèse et le diabétique de type 2 [Juhan Vague et al. 1981].

Le PAI-2 est une protéine de 48 kDa d'origine monocytaire. Il s'oppose à l'action de l'urokinase et réagit plus faiblement avec le tPA bicaténaire.

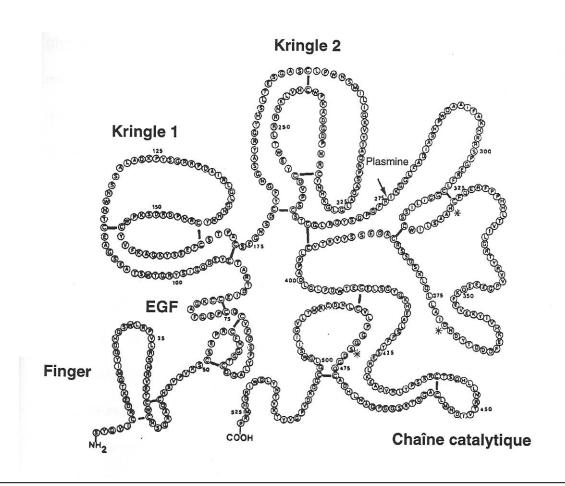
Le système Plg/Pm (plasminogène/plasmine) semble jouer un rôle pivot dans ces cascades protéolytiques. La génération de plasmine via l'uPA permet notamment l'activation de la MMP-3. L'activation de la MMP-1 fait également intervenir une cascade protéolytique où la plasmine et la MMP-3 interviennent séquentiellement. Cette cascade protéolytique a été aussi impliquée dans le processus d'activation de la MMP-9 [Ramos-DeSimone et al. 1999]. Dans les processus d'activation des gélatinases (MMP-2 et -9), la plasmine permet non seulement l'activation de la MMP-9 mais également la seconde étape d'activation de la MMP-2 (passage de la forme de 64 à 62 kDa) [Baramova et al., 1997]. Ainsi, l'assemblage du plasminogène et de ses activateurs à la surface de la fibrine ou dans la paroi vasculaire peut aboutir à la dissolution des caillots de fibrine ou à une importante activité protéolytique péri cellulaire, nécessaire à la migration cellulaire et au remodelage de la matrice extracellulaire.

## b- L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

La cellule endothéliale est la principale source de tPA. D'autres cellules sont capables de le produire, notamment lors de circonstances pathologiques. C'est une glycoprotéine de 70 kDa, synthétisée sous une forme spontanément active sur le plasminogène. Il est composé de domaines protéiques communs avec le plasminogène : le kringle 1 et le kringle 2 [Figure 14].

Le tPA a une grande affinité pour la fibrine, et son action sur le plasminogène est potentialisée en présence de fibrine, propriété attribuée aux domaines kringle 2 [Van Zonneveld et al. 1986]. Il est retrouvé dans la circulation complexé avec son inhibiteur spécifique PAI-1. Son activité catalytique est fortement stimulée quand il est lié à la fibrine [Hoylaerts et al. 1982].

Le catabolisme du tPA est assuré par les cellules endothéliales hépatiques, les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Leur contribution dans la clairance du tPA *in vivo* chez le rat a pu être évaluée à 40, 55 et 5% respectivement. Deux voies de catabolisme ont été mises en évidence, la première dépend de la glycosylation du tPA en Asn 117 et fait intervenir un récepteur spécifique du mannose.



#### FIGURE 14: REPRESENTATION BIDIRECTIONNELLE DE LA STRUCTURE DU TPA

D'après Zonneveld et al., 1986

La flèche indique le site d'activation du tPA par la plasmine et les astérisques les résidus de la triade catalytique

La seconde voie est indépendante des glycosylations et impliquerait un récepteur spécifique des complexes tPA-PAI1. Un autre récepteur, le LRP (LDL Receptor Related Protein, protéine apparentée au récepteur des LDL), est capable de fixer le tPA libre ou complexé [Strickland et al. 1994].

## c- Le système pro-urokinase/urokinase

Ce système est mis en jeu dans le compartiment intra-vasculaire (par sa présence au niveau des monocytes, des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes), mais son rôle principal s'exerce dans le compartiment extra-vasculaire.

L'urokinase est sécrétée sous la forme d'une glycoprotéine de 54 kDa avec une seule chaîne polypeptidique de 411 acides aminés [Stepanova et Tkachuk, 2002]. L'uPA est composée en trois domaines : le domaine N-terminal homologue de l'EGF (Epidermal Growth Factor), le domaine « kringle » et le domaine catalytique C-terminal.

Le domaine EGF est responsable de l'interaction de l'uPA avec son récepteur membranaire spécifique (uPAR/CD87).

Le domaine « kringle » contient une séquence qui interagit spécifiquement avec le PAI-1, inhibiteur spécifique de l'urokinase. Mukhina et al ont montré que ce domaine pouvait se lier sur un récepteur spécifique à la surface des cellules distinct de l'uPAR (Urokinase Plasminogen Activator Receptor, récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase) [Figure 15][Mukhina et al., 2000].

Le domaine catalytique comprend le site actif de l'enzyme composé des trois acides aminés spécifiques des protéinases à sérine : His204, Asp255 et Ser356.

Chaque domaine a une structure rigide grâce à des ponts disulfure internes : trois dans le domaine analogue à l'EGF, trois dans le domaine « kringle » et six dans le domaine catalytique. Les ponts disulfures intramoléculaires maintiennent les résidus d'acides aminés du site catalytique de l'enzyme dans une conformation active.

Elle est produite par les cellules monocytaires, épithéliales et leucocytaires, et présente dans les fluides extracellulaires sous la forme d'une pro-enzyme inactive, la pro-urokinase (ou « scuPA pour *single chain urokinase plasminogen activator*). L'urokinase est glycosylée dans deux régions de la molécule lors des modifications post-traductionnelles.

La conversion de la pro-urokinase en enzyme active par des quantités catalytiques de plasmine est une étape primordiale dans la régulation de l'activation du plasminogène.

Cette conversion permet l'obtention d'une urokinase active ainsi qu'une accélération autocatalytique de sa formation. A l'inverse de l'urokinase, la pro-urokinase possède une activité catalytique dépendante de la présence de fibrine [Fleury et al. 1993].

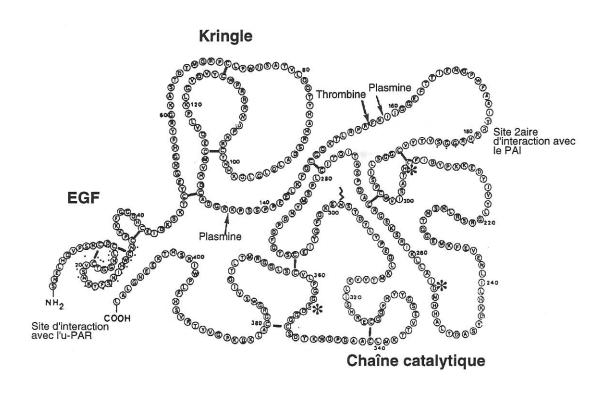


FIGURE 15 : REPRESENTATION BIDIMENSIONNELLE DE LA STRUCTURE DE LA SCUPA

D'anrès Holmes et al. 1995

Le récepteur uPAR exprimé dans de nombreux types cellulaires, a été identifié sur les monocytes humains et la lignée cellulaire U937. C'est une glycoprotéine de 65 kDa avec trois domaines extracellulaires homologues riches en cystéine. Il ne possède pas de domaine transmembranaire et se trouve ancré à la membrane plasmique par une liaison covalente entre sa partie N-terminale et un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). La liaison de l'uPA avec uPAR implique le domaine EGF de l'enzyme et le domaine N-terminal du récepteur. Elle est caractérisée par une grande affinité (Kd de l'ordre de 10-9 M) et une grande spécificité. En effet, d'autres protéines comportant un domaine EGF n'interagissent pas avec uPAR. La liaison de l'urokinase sur son récepteur active une protéolyse locale ainsi qu'une signalisation intracellulaire. En effet, la scuPA liée au récepteur active le plasminogène lié à la surface des cellules en plasmine.

## II.3- LA LIPOPROTEINE (a)

## **II.3.1-Introduction**

La première description de la lipoprotéine (a) [Lp(a)] a été faite il y a plus de 40 ans [Berg, 1963].

Son implication dans les pathologies cardio-vasculaires en a fait une cible de recherche incontournable [Ariyo et al. 2003 ; Guerra et al. 2005 ; Kronenberg et al. 1999 ; Luc et al. 2002] puisqu'elle est actuellement considérée comme un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant [Boffa, et al. 2004 ; De la Pena-Diaz et al. 2000 ; Jauhiainen et al. 1991 ; Nguyen et al. 1997 ; Candido et al., 2006]. L'expression du gène de l'apo(a) au sein de la paroi des artères coronariennes et de l'aorte est le témoin de sa production in situ [Fu et al., 2001].

Des corrélations positives entre la concentration de Lp(a) et la survenue d'accident vasculaire ischémique [Peng et al.,1999], d'hypertension artérielle [HTA] [Catalano et al., 1998], d'infarctus [Fujino et al.2001; Luc et al., 2002], de complications macro-angiopathiques du diabète sucré [Gazzaruso et al., 2006; Habib et al., 2004] ont été mises en évidence.

Malgré son rôle dans les processus athéro-thrombogènes liés à la plaque d'athérome [Koschinsky et al. 2003], la physiopathologie de cette lipoprotéine reste actuellement méconnue [Hobbs et al. 1999; Koschinsky et al., 2004],

La Lp(a) est une molécule proche des lipoprotéines de faible densité, dont elle se distingue par la présence d'une glycoprotéine hautement polymorphe, l'apolipoprotéine (a). Cette dernière dérive d'un gène ancestral commun avec celui du plasminogène, ce qui lui confère des homologies structurales avec celui ci, expliquant ainsi certaines de ses propriétés athéro-thrombogènes [Hancock et al. 2004]. La compétition de l'apolipoprotéine (a) avec le plasminogène favoriserait des dépôts de fibrine et de cholestérol au sein de la plaque d'athérome [Hervio et al. 1995].

Les interactions monocytes/ Lp(a) semblent jouer un rôle essentiel dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

## II.3.2- Structure de la lipoprotéine(a)

## II.3.2.1 -Généralités

Sur le plan protéique, la Lp(a) est composée de deux apolipoprotéines, une apolipoprotéine (a) et une apolipoprotéine B100 [apo B100] similaire à celle des LDL Elles sont reliées entre elles par un pont disulfure localisé dans la région C-terminale [Gabel et al., 1994]. La cystéine 4326 et la cystéine 3754 ont été proposées pour permettre une liaison covalente entre apo B100 et apo(a). Les liaisons non covalentes sont médiées par des interactions entre des site de liaisons des lysines (Lysine Binding Site : LBS) situés sur les kringles IV<sub>7-8</sub> de l'apo(a) [Xia et al., 2000] et des résidus lysine de l'apo B100. L'apo(a) neutraliserait ainsi la capacité de liaison de l'apo B100 au récepteur des LDL [Berglund et al., 2004].

La partie lipidique comprend un noyau composé d'un cœur riche en cholestérol estérifié et d'une périphérie formée par du cholestérol non estérifié, et des phospholipides [Berglund et al. 2004].

L'apo B100 est une glycoprotéine de 4536 acides aminés, de masse moléculaire d'environ 513 kDa. La présence de séquences très hydrophobes lui permet d'importantes interactions avec le noyau lipidique, permettant ainsi la solubilisation et la stabilisation du noyau en milieu aqueux.

L'apo(a) fait partie des protéines contenant des « kringles », comme le plasminogène, l'activateur du plasminogène tPA (tissue-type plasminogen activator), la prothrombine, facteur XII, et le facteur de stimulation des macrophages MSF (macrophage stimulating factor)[Huby et al., 1997]. Les kringles sont des domaines protéiques homologues de ceux du plasminogène [Kratzin et al. 1987]. Le kringle de type IV est identique à celui du plasminogène et est formé de dix sous-classes. Le kringle IV-2 est présent en nombre variable, de 3 à 40 selon l'individu, et responsable de l'hétérogénéité de la molécule et de ses différents isoformes.

La concentration plasmatique de Lp(a) varie d'un individu à l'autre, sa synthèse hépatique étant essentiellement déterminée par des facteurs génétiques [cf chap II.3.3]. On observe des variations plasmatiques importantes interindividuelles, avec dans 90% des cas une concentration sérique inférieure à 0,3 g/l dans la race blanche. Le risque relatif de pathologie coronarienne est nettement augmenté lorsque l'on dépasse une concentration de 0,2 g/l [Danesh et al. 2000].

Sa concentration, quasiment invariable chez le sujet sain, est susceptible d'être augmentée dans certaines situations telles que : le diabète insulinorequérent [Bruckert et al. 1990 ; Durlach et al. 1996] l'hypothyroïdie [Tzotzas et al. 2000], l'insuffisance rénale chronique [Ganotel et al. 1996], le syndrome néphrotique [Garnotel et al. 1998 ; Kronenberg et al. 1997]. Le traitement étiologique ou symptomatique de ces pathologies permet de réduire cette concentration, sauf dans le cas du diabète insulinorequérant. A l'inverse, la concentration de Lp(a) diminue dans l'insuffisance hépatique [Feely et al.,1992] et l'hyperthyroïdie [Kung et al., 1995 ; Hayashi et al., 1996].

Actuellement, aucun traitement n'a prouvé son efficacité dans la diminution de la concentration de Lp(a). Les traitements hypolipémiants classiques tels que les fibrates ou les statines n'ont pas permis d'obtenir un résultat satisfaisant, même lorsqu'elles ont entraîné une réduction importante du cholestérol.

Des études récentes ont cependant mis en évidence l'efficacité de certains traitements combinés dans le cas du diabète de type 2, notamment l'association de la pioglitazone (glitazone) avec le glimepiride (sulfamide) [Derosa et al. 2006] après un an de traitement, et de la L-carnitine associé à la simvastatine (statine) [Solfrizzi et al. 2006]. Jusqu'à présent seul l'acide nicotinique avait montré une efficacité mais les concentrations utilisées (supérieures à 4g/jour) impliquaient de nombreux effets secondaires et rendaient improbable son utilisation en clinique humaine.

#### II.3.2.2 –La structure de l'apolipoprotéine (a)

L'apolipoprotéine (a) dérive d'un gène commun à celui du plasminogène, et présente d'importantes homologies structurales avec lui. Le gène du plasminogène code cinq domaines protéiques différents appelés les kringles (KI à KV), deux de ces domaines étaient présents dans le gène de l'apo(a) le KIV et KV. La séquence codante pour le KIV est répétée plusieurs fois dans le gène de l'apo(a). Le gène de l'apo(a) contient 10 types différents de domaines KIV allant de 1 à 10. Les domaines KIV de type 1 et de type 3 à 10 ne sont exprimés qu'une fois alors que le KIV de type 2 est répété de 3 à plus de 40 copies [Van Deer Hoek et al.,1993] [Berglund, 2004].

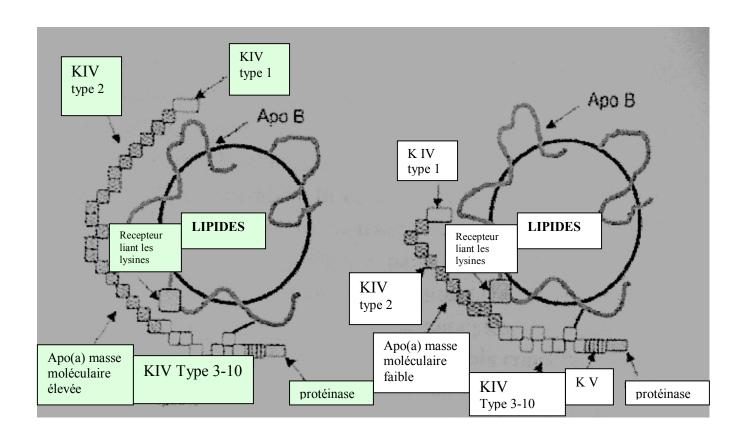


FIGURE 16: DEUX PARTICULES DE LP(A) AVEC DIFFERENTES TAILLES D'APOLIPOPROTEINE(A).

D'après Berglund, 2004

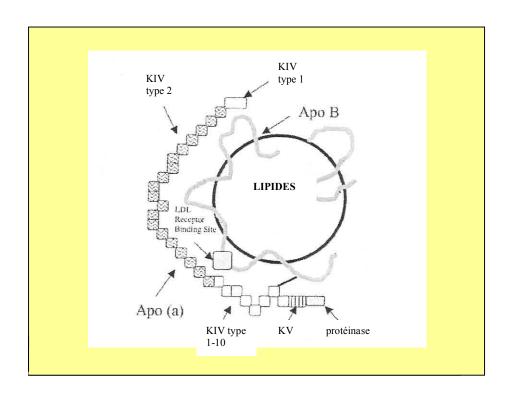
Le nombre variable des copies du KIV de type 2 détermine l'existence de plusieurs isoformes dont la taille varie 300 à 800 kDa [Hobbs et al.,1999] [Berglund, 2004]. On parle ainsi d'isoformes de masse moléculaire élevée et d'isoformes de faible masse moléculaire [Figure 16].

L'apo(a) est donc constituée de plusieurs copies du kringle IV, d'une copie du kringle V et du domaine sérine protéinase contenant la triade catalytique [Figure 17]. Cependant, à l'inverse du plasminogène, l'apo(a) reste un zymogène inactif, une mutation dans la zone correspondant au site de clivage du plasminogène par ses activateurs empêchant sa transformation en enzyme active.

Tout comme le plasminogène, l'apo(a) peut se lier à la fibrine intacte ou dégradée par la plasmine [Loscalzo et al., 1990], ou à certaines cellules dont les monocytes [Miles et al., 1989].

Le plasminogène interagit avec la fibrine, la matrice extra cellulaire (MEC), et la surface des cellules par l'intermédiaire des LBS contenus dans les domaines protéiques de type kringle.

Ces interactions permettent l'activation du plasminogène et par conséquence la fibrinolyse et la protéolyse extracellulaire. L'apo(a) interagit également par l'intermédiaire des LBS et est ainsi en compétition avec le plasminogène lors de l'interaction avec la fibrine, les cellules monocytaires et la MEC [Xue et al., 1999; Angles-Cano et al., 2002]. L'inhibition de la liaison du plasminogène et l'absence d'activité enzymatique de l'apo(a) conduisent à une diminution de la quantité de plasmine formée à la surface de la fibrine, responsable d'une diminution de la fibrinolyse.



#### FIGURE 17: MODELE DE LP(A)

## D'après Berglund et al. 2004

La partie de la Lp(a) similaire aux LDL est formée d'un cœur lipidique associant des esters de cholestéryle et des triglycérides encerclé par une couche de phospholipides et de cholestérol non estérifié. En plus de la partie lipidique, l'apolipoprotéine B est liée à l'apolipoprotéine (a) par un pont disulfure. L'éventuel domaine de liaison de l'apoB au récepteur des LDL est indiqué sur la Figure 17. La partie apo(a) est formée d'une copie de KIV type 1 et 3 à 10, un KV, et un domaine protéinase analogue à celui du plasminogène mais inactif. Elle contient une répétition de KIV de type 2.

Les LBS de l'apo(a) diffèrent en fonction du type de kringles [Rahman et al., 2002]:

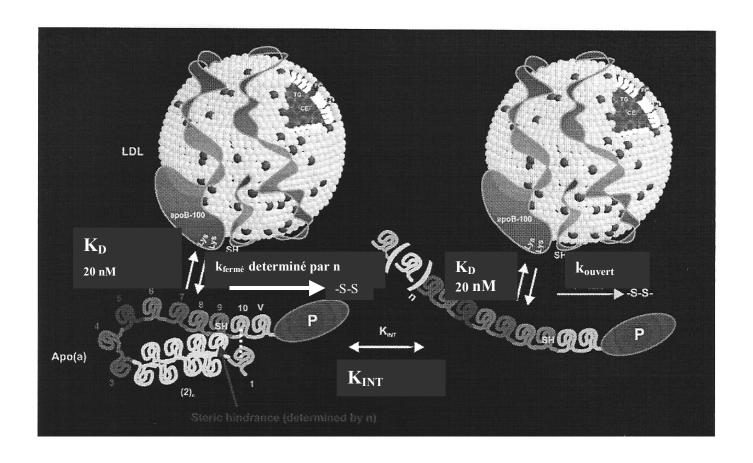
<u>Les KIV de type 5 à 8</u> contiennent des sites de liaison de faible affinité aux résidus de lysine (weak lysine binding site : WLBS).

<u>Les KIV de type 10</u> présentent des sites de liaison de forte affinité aux résidus lysines (strong lysine binding site : SLBS) [Belczewski et al. 2005].

<u>Le KIV de type 9</u> possède un résidu cystéine (Cys <sup>67</sup>) supplémentaire permettant la liaison covalente de l'apo(a) à l'apoB100 [Koschinsky et al., 1993]. L'efficacité de cette dernière est régentée par une liaison non covalente entre apo(a) et apoB100 qui la précède. Cette liaison non covalente est sous la dépendance de l'interaction des sites de faible liaison aux lysines des KIV de type 7 et 8 de l'apo(a) et les résidus lysines contenus dans la partie amino-terminale de l'apoB100 [Gabel et al., 1998]. Cette liaison non covalente joue un rôle important dans la conformation de l'apo(a) et donc dans l'efficacité de la formation covalente de la particule Lp(a) [Becker et al., 2003]. En effet, l'apo(a), en conformation ouverte, permet d'obtenir des particules covalentes de Lp(a) six fois plus efficaces que la molécule en conformation fermée [Becker et al., 2003]. Les analogues des lysines tels que l'εACA, entraînent à faibles concentrations une modification de la conformation d'apo(a) favorisant ainsi la formation de particule de Lp(a), inversement à de fortes concentrations où ils altèrent celle ci en inhibant les liaisons covalentes entre apo(a) et LDL [Beker et al., 2004] [Figure 18].

La taille de l'isoforme d'apo(a) est inversement corrélée à la concentration de Lp(a) sérique [Brunner et al., 1996 ; Gavish et al., 1989]. En effet, pour des isoformes de faible masse moléculaire, on constate une concentration sérique de Lp(a) élevée, avec toutefois de grandes disparités interindividuelles.

D'après Becker et al. les liaisons covalentes entre apo(a) et apo B100 sont inversement corrélées à la taille de l'isoforme, permettant une concentration plus importante de Lp(a) [Becker et al., 2003].



#### FIGURE 18: MODELE D'ASSEMBLAGE DE LP(A)

D'après Becker, 2004.

L'assemblage de Lp(a) dépend de deux phénomènes. Le taux de formation de particule de Lp(a) covalente est déterminé par l'affinité de l'apo(a) pour les LDL ( $K_D$ ) et par un taux constant de formation de ponts disulfures (k). Les WLBS contenus dans KIV type 7 et 8 médient les liaisons non covalentes aux LDL, mais ne sont pas impliqués dans la conformation fermée de l'apo(a). Une anomalie de ces domaines serait responsable d'une altération de la liaison non covalente aux LDL en altérant le  $K_D$ . A l'inverse, une anomalie des KIV de type 10 peut influencer la conformation de l'apo(a) et son équilibre intrinséque ( $K_{INT}$ ), en augmentant la proportion de molécule d'apo(a) en conformation ouverte ( $k_{open}$ ,  $k_{ouverte}$ ), alors que l'inhibition ( $k_{closed}$ ,  $k_{fermé}$ ) imposée par la conformation fermée de l'apo(a) est régulée par le nombre de répétition de KIV de type 2.

## II.3.3- Génétique de la lipoprotéine(a) [Lp(a)]

Le gène de l'apo(a) est localisé dans la région q26-27 du chromosome 6, à proximité du gène du plasminogène [Ichinose et al., 1992]. La transmission génétique s'effectue selon un mode codominant [Lackner et al. 1991].

Le gène de l'apo(a) présente un grand polymorphisme, et 38 allèles sont recensés actuellement [Holmer et al., 2003]. Le nombre de séquences codant le kringle IV de type 2 est à l'origine de l'hétérogénéité de la taille de l'apo(a) et est inversement corrélé à la concentration sérique de Lp(a) [Rosby et al., 2000]. Le polymorphisme de taille de l'apo(a) explique les variations de masse moléculaire de 250 à 800 kDa. Celle ci est également influencée par le polymorphisme de répétition d'un pentanucléotide de la région 5' du gène LPA. Il s'agit de différents variants TTTA en position 1373 paires de bases du site ATG, et un polymorphisme G/A en position 914. Ces différents polymorphismes semblent intervenir dans la détermination de la concentration de Lp(a), mais leur contribution dans la variabilité interindividuelle de la concentration et du polymorphisme de taille n'est que de respectivement 9,7 % et 3,5 % [Rosby et al., 2000].

On note une grande disparité entre les ethnies, ainsi les populations noires ont une concentration de Lp(a) plus élevée que les asiatiques ou les caucasiens. Cette différence n'est pas expliquée par la taille de l'apo(a) [Marcovina et al., 1996; Berglund et al., 2004]. Une étude récente sur les populations afro-américaines et les américains de race blanche, menée par Barkley, ne montre pas de facteurs génétiques évidents expliquant ces disparités [Barkley et al., 2003] [Figure 19].

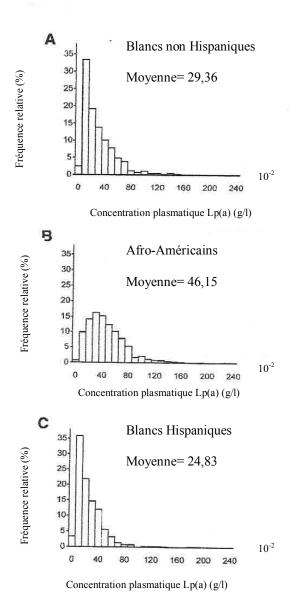


FIGURE 19 : HISTOGRAMME DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE DE LP(A) DANS TROIS POPULATIONS.

D'après Barkley, 2003.

## II.3.4 - Pathologies et Lp(a)

## II.3.4.1 – Lp(a) et diabète sucré

Le risque cardio-vasculaire est multiplié par 3 ou 4 chez les patients présentant un diabète par rapport à la population générale. Chez le diabétique de type 2, les facteurs de risque comme l'obésité, les dyslipidémies et l'HTA, n'expliquent pas complètement l'augmentation des pathologies cardio-vasculaires [Koschinsky et al. 2003]. La rigidité vasculaire fait partie des facteurs de risque indépendants des autres facteurs cardio-vasculaires. Elle est due à l'accumulation de cellules musculaires et de calcium dans le vaisseau, entraînant ainsi une perte d'élasticité de la paroi. Le diabète de type 2 est un des éléments favorisant la rigidité vasculaire [Dart et al. 1991]. Une étude récente met en évidence une corrélation positive entre la Lp(a) et la rigidité aortique dans le diabète de type 2 [Wakabayashi et al., 2006]. Ainsi, la Lp(a) est un facteur de risque de macroangiopathie dans le diabète de type 2.

En revanche, l'élévation de la concentration de Lp(a) dans le diabète de type 2 reste un sujet de controverse. En effèt, les résultats diffèrent en fonction des études. Ainsi, les plus anciennes ne retrouvent pas d'élévation de la concentration de Lp(a) dans les populations de diabétiques de type 2 [Csaszar et al., 1993 ; Durlach et al., 1996], cependant que d'autres plus récentes comme celle de Habib et al. dans une population de diabétiques de type 2 d'origine pakistanaise retrouvent à l'inverse une augmentation de la concentration de Lp(a), ainsi qu'une corrélation positive de celle-ci avec la concentration plasmatique de LDL [Habib et al., 2004]. La concentration de Lp(a) serait également inversement corrélée à l'insulinémie. Ainsi l'hyperinsulinisme retrouvé dans le diabète de type 2 serait responsable de la diminution de la concentration de Lp(a), en accord avec l'étude in vitro menée par Neele et al. en 1999, qui mettait en évidence la suppression par l'insuline de la synthèse d'apo(a) par des hépatocytes de singes [Neele et al., 1999]. La Lp(a) est insensible aux variations de la glycémie, et ne semble PA influencée par son équilibre [Haffner et al., 1992].

La concentration de Lp(a) est inversement proportionnelle à sa masse moléculaire, et donc à la taille de l'isfoforme. Ainsi, les isoformes de plus faible masse moléculaire correspondent à une concentration élevée de Lp(a) [McCormik et al., 1994 ; Kraft et al., 1992].

Une seule étude a rapporté la répartition identique des phénotypes d'apo(a) dans une population de diabétiques de type 2 et une population témoin [Calmarza et al., 1999].

Une étude plus récente observe une fréquence plus élevée des isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire dans une population de diabétiques de type 2 [Ribault et al., 2000].

Dans le diabète de type 1, on retrouve des controverses identiques avec des études mettant en évidence une augmentation de la concentration de Lp(a) [Bruckert et al., 1990 ; Salzer et al., 1993], et d'autres ne confirmant pas cette observation [Taupin et al., 1993 ; Koschinsky et al., 2003]. L'étude de Kronenberg et al. en 1999 montre chez les patients diabétiques de type 1 avec 15 ans d'évolution des concentrations de Lp(a) élevées comparées au groupe contrôle, principalement associées à des isoformes de faible masse moléculaire.

Une étude portant sur 148 patients diabétiques (59 patients de type 1 et 89 de type 2) met en évidence une plus grande fréquence des isoformes de faible masse moléculaire dans la population des diabétiques de type 2 [Ribault et al. 2000]. A l'inverse, les études sur le phénotype de l'apo(a) dans le diabète de type 1 ne montrent pas de différence significative [Csaszar et al., 1993; Klausen et al., 1992].

#### II.3.4.2 – Lp(a) et pathologies cardio-vasculaires.

La Lp(a) est un facteur de risque cardio-vasculaire qui suscite depuis quelques années une attention toute particulière d'autant plus que sa physiopathologie reste en grande partie méconnue.

Une première méta-analyse, de Craig et al. met en évidence le risque le risque de pathologies ischémiques chez les sujets présentant une élévation de la concentration de Lp(a) [Craig et al., 1998]. L'étude de Pedreno et al. retrouve une concentration de Lp(a) augmentée chez 355 patients caucasiens avec une pathologie cardiaque authentifiée versus population témoin non malade, la présence d'un diabète ne semble pas la modifier [Pedreno et al., 2000]. Dans l'étude de 2006 de Candido et al. on remarque l'importante corrélation de la concentration de Lp(a) avec l'âge, la concentration de LDL, le cholestérol total, la masse grasse et l'infarctus du myocarde. Cette étude ne montre pas de lien entre hypertension artérielle et Lp(a), ce qui corrobore les résultats de l'étude de Catalano et al. [Catalano et al., 1998]. Elle confirme également les données de la littérature décrivant la Lp(a) comme un facteur prédictif indépendant d'évènements coronariens [Agewall et al., 2002]. L'étude PRIME publiée en 2002 indique qu'une concentration élevée de Lp(a) augmente le risque d'infarctus du myocarde, et d'angor en particulier chez l'homme présentant une concentration élevée de LDL [Luc et al., 2002].

Dans l'étude très récente de Gazzaruso et al. la Lp(a) semble être un indicateur très fiable du risque de pathologies coronariennes [Gazzaruso et al., 2006].

Zorio et al. montrent que la concentration élevée de Lp(a) et la présence d'isoformes de faible masse moléculaire représentaient d'éventuels marqueurs précoces de risque d'infarctus du myocarde [Zorio et al., 2006].

#### II.3.4.3 – Lp(a) et pathologies rénales.

La Lp(a) est augmentée dans l'insuffisance rénale. Dans la néphropathie diabétique, il existe une corrélation entre l'augmentation de la microalbuminurie et celle de la concentration d'apo(a). Cette relation semble plus forte pour les diabétiques type 2 [Jerums et al. 1993], mais existe également dans le diabète de type 1. En effet, dans une étude comparant 199 diabétiques de type 1 avec une néphropathie diabétique (et donc une augmentation de la microalbuminurie) et 198 diabétiques type 1 avec une normo-microalbuminurie, le premier groupe présentait une augmentation significativement plus élevée de la concentration d'apo(a) [Tarnow L et al., 1996]. De même dans l'étude de Durlach et al. on note une élévation de la concentration de Lp(a) chez les diabétiques de type 1 lorsque la concentration de créatinine est supérieure à 120 μmol/l [Durlach et al., 1998].

Les patients atteints de syndrome néphrotique présentent de façon constante une augmentation de la concentration de Lp(a), qui intervient dans la survenue de manifestations occlusives vasculaires [Fujita et al., 1992; Wanner et al., 1993]. Chez l'enfant, l'augmentation de la concentration de Lp(a) coïncide avec les phases d'échappement de la maladie, et peut indiquer un risque de complications thromboemboliques [Garnotel et al., 1996; Garnotel et al., 1998].

La Lp(a) semble présentée une affinité particulière pour les protéines de la matrice mésangiale, ce qui explique sa présence dans les structures glomérulaires dans des maladies rénales très variées [Kramer-Guth et al., 1996].

La taille des isoformes d'apo(a) a un rôle important chez l'insuffisant rénal dialysé. Effectivement, les isoformes de faible masse moléculaire sont prédictives du risque de mortalité, indépendamment des autres facteurs de comorbidité associés [Longenecker et al. 2002].

On observe également des différences dans le cadre des greffes rénales. Un étude rétrospective de 2001 met en évidence une survie des greffons moins longue chez les patients présentant des isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire, surtout chez des patients de moins de 35 ans, et indépendamment du système HLA, du sexe, et du traitement immunosuppresseur [Wahn et al., 2001].

La Lp(a) et, tout particulièrement, le polymorphisme de l'apo(a), jouent un rôle fondamental dans la physiopathologie de l'athérosclérose. L'ensemble des études cliniques mettent en évidence un risque vasculaire augmenté en présence d'isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire, avec des concentrations très différentes en fonction des populations. La physiopathologie de la Lp(a) reste cependant méconnue. Jusqu'à présent aucun traitement n'a prouvé son efficacité.

Dans ce travail, nous avons décidé de mettre en place un système d'étude expérimental du rôle des interactions entre l'apo(a), les monocytes et le collagène de type I dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Les monocytes jouent un rôle essentiel dans la formation de la plaque d'athérome. Lors de leur activation, ils sont responsables de la production de radicaux libres oxygénés entraînant la formation de LDL oxydées, de métalloprotéinases de type MMP-9, d'inhibiteurs des métalloprotéinases de type TIMP-1 et TIMP-2 agissant sur le remodelage de la plaque. Ils se transforment après leur migration transendothéliale en cellules spumeuses (macrophages chargés de vacuoles lipidiques) formant la strie lipidique, première étape de la plaque d'athérome. Les travaux réalisés antérieurement au sein de notre laboratoire avaient montré que le collagène de type I stimulait les fonctions des monocytes par mise en jeu de l'intégrine  $\alpha_X$   $\beta_2$  [Garnotel et al. 2000].

Le premier objectif de ce travail a été :

> l'étude de l'influence de l'apo(a) en fonction de sa taille sur l'interaction monocytescollagène type I par différentes isoformes d'apo(a) recombinante (10, 18 et 34 K).

Connaissant les homologies de séquences entre apo(a) et plasminogène, nous avons analysé :

➤ le rôle du système plasmine/plasminogène dans les cascades protéolytiques menant à l'activation de la pro-MMP-9 en MMP-9. Dans un dernier temps nous avons mis en évidence :

les différents mécanismes d'action de l'apo(a) en fonction de sa taille.

Ce travail avait pour but d'identifier *in vitro* des bases moléculaires et cellulaires permettant d'expliquer les mécanismes d'action de l'apo(a) *in vivo* dans la formation de la plaque, et de déterminer de nouvelles approches thérapeutiques.

# IV. MATERIEL ET METHODES

## IV.1- <u>Liste des matériels et réactifs</u>

## Liste des matériels

Matériel	Utilisation	Fournisseur
Automate Image	Dosage immunonéphélémétrique	Beckman Coulter
Analyseur multicanaux	Contrôle numération cellulaire	Coultronics
Boudins de dialyse ( MWCO 12-14 kDa)	Dialyse	Medicell Int.
Centrifugeuse	Centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse	Centrifugation	Beckman
Cônes Eppendorf 1,5 ml	Dépôt des cellules	Eppendorf
Elutriateur J6MC; rotor JE 5,0	Elutriation	Beckman
Hotte à flux luminaire MSC 12	Culture cellulaire	Jouan
Lecteur de microplaques Multiskan Plus	Spectrophotométrie	Titertek
Logiciel d'analyse densitométrique BioProfil	Traitement des données	Vilbert Lourmat
Logiciel PDQuest 4.0	Traitement des données	Biorad
Lyophilisateur	Lyophilisation	Edman
Membrane en difluorate de polyvinylidène	Transfert	Millipore
pH-mètre	рН	Metler Toledo
Plaques de culture Nuncleon Delta	Culture cellulaire	Dominique Dutscher
Thermocycleur	PCR	Eppendorf

## Liste des Réactifs

Réactifs	Fournisseur
β-mercaptoéthanol	Sigma
Acide Ethylène-diamine-tetraacétique (EDTA)	Sigma
Acide ε-amino-caproïque (AHA)	Sigma
Amorces pour PCR	MG biotech
Apolipoprotéine (a) recombinantes	INSERM U 460 (Paris)
Bleu de Coomassie	Sigma
Bleu de Nitrotétrzolium (NBT)	Sigma
Bleu Trypan	Sigma
Glutaraldéhyde	Sigma
Monocytes	CHU Reims
N-Ethyl-Maléimide (NEM)	Sigma
PAI-1 anticorps	American diagnostica
Para-Amino-Phényl-Mercuriacétate	Sigma
Péroxydase HRP	Amersham
Phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF)	Sigma
Plasminogène	Calbiochem

## Liste des Réactifs (suite)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Euromedex
Solution SLF « BF 77 »	Bruneau
Témoin TIMP-2	Amersham Pharmacia
Témoin uPA	Sigma
Tampon phosphate PBS	Gibco
Triton X-100	Sigma
Ultraculture	Biowhittaker
Violet cristal	Sigma

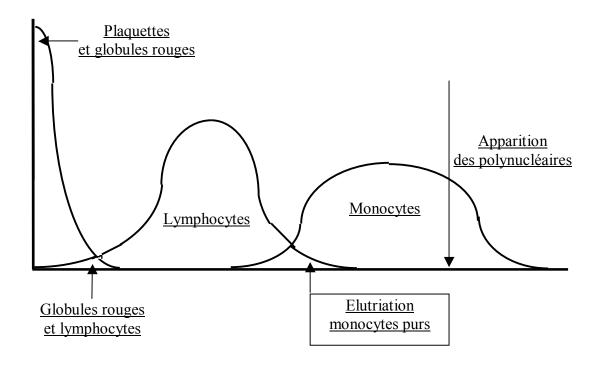
## IV.2- <u>Préparatation des monocytes humains par</u> <u>cytaphérèse-élutriation.</u>

Les monocytes proviennent de dons de cytaphérèse réalisés chez des donneurs volontaires sains ayant donné leur consentement (Pr Nguyen, Laboratoire Central d'Hématologie du CHU de Reim). L'aphérèse est réalisée sur un séparateur de cellules (Cobe, Colorado, USA). L'anticoagulant utilisé est de type acide citrique/citrate/dextrose (Maco pharma). La poche d'aphérèse est ensuite élutriée. L'élutriateur est de type J6MC; il est équipé du rotor JE 5,0 et d'une chambre large d'élutriation (Beckman-Coulter, France). Avant utilisation, l'élutriateur est stérilisé 20 min à 120°C. Le système est amorcé par la solution SLF"BF 77" (Bruneau, France) contenant 1 % (m/v) d'albumine humaine. La vitesse d'injection de l'échantillon est de 40 ml/min, à la vitesse initiale du rotor de 2000 tours par min (tpm) à la température de 4°C. Le débit est augmenté par paliers de 2,5 ml/min tout en contrôlant la numération cellulaire [analyseur multicanaux Coulter ZF® (Coultronics, France)].

Les plaquettes et les globules rouges sont élutriés en premier, puis, lorsque le débit est de l'ordre de 45-55 ml/min, ce sont les lymphocytes qui sont élutriés. Le débit est ensuite réduit progressivement jusqu'à la valeur de 30 ml/min de façon à limiter la dilution de l'échantillon.

Les monocytes sont élutriés en diminuant progressivement la vitesse du rotor, autour de 1400 tpm. Ils sont recueillis sur la glace et l'élutriation est arrêtée lorsque le pourcentage de polynucléaires neutrophiles est voisin de 3 %. L'ensemble des manipulations est effectué dans des conditions strictes d'asepsie. Le schéma du procédé d'élutriation est présenté sur la figure 20.

Le schéma de sortie des cellules, défini par comptage différentiel, montre que les globules rouges et les lymphocytes sont élutriés les premiers, puis ce sont les monocytes et enfin les polynucléaires qui sortent de l'élutriateur.



## IV.3-Préparation du collagène de type I

Le collagène de type I est extrait à partir de tendons de queues de rat (type Sprague Dawley) conservées congelées à -20°C [Piez *et al.*, 1963]. Au moment de l'extraction, les queues sont plongées dans l'éthanol 70 % (v/v) pendant 5 min pour être désinfectées puis séchées. Les tendons sont extirpés en tirant sur l'extrémité de la queue à l'aide d'une pince et sont ensuite plongés 24 h à 4°C sous agitation dans un tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; NaN3 1 % (m/v); pH 7,4) en présence d'inhibiteurs de protéases : benzamidine 5 mM; PMSF 1 mM; N-éthyl-maléimide (NEM) 5 mM.

Après centrifugation (10 000 g ; 30 min ; 4°C), les tendons sont placés dans l'acide acétique 500 mM pendant 48 h à 4°C sous agitation. Au volume de surnageant obtenu après centrifugation (10 000 g ; 30 min ; 4°C) est ajouté un volume égal d'acide acétique 500 mM contenant 1,4 M NaCl (0,7 M final : précipitation spécifique des collagènes fibrillaires). Après 24 h d'agitation à 4°C, un précipité de collagène se forme. Ce précipité est centrifugé (10 000 g ; 30 min ; 4°C) puis solubilisé dans de l'acide acétique 18 mM pendant 24 h à 4°C. Le collagène soluble est ensuite dialysé contre de l'eau distillée pendant 5 jours à 4°C puis lyophilisé. Sous sa forme lyophilisée, le collagène peut être conservé pendant plusieurs mois à - 80°C. Avant toute utilisation, le collagène lyophilisé est stérilisé par des bains successifs d'éthanol 70 % (v/v) (2 bains de 30 min et 1 bain de 24 h à 4°C). Celui ci est ensuite éliminé par évaporation sous hotte stérile pendant 30 min, puis le collagène est solubilisé à la concentration de 2 mg/ml dans une solution d'acide acétique 18 mM sous agitation pendant 24 h à 4°C.

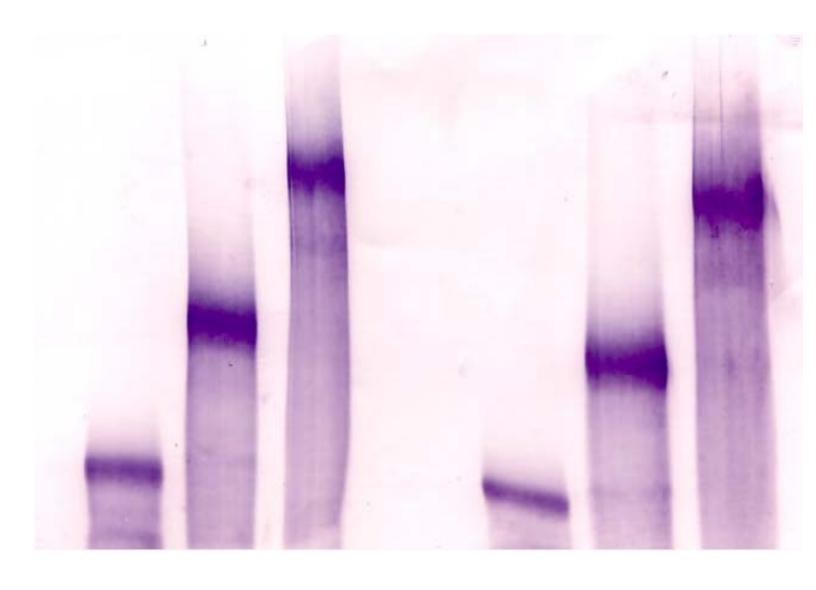
## IV.4- <u>Préparation des isoformes d'apo(a)</u> recombinantes.

Les échantillons d'apo(a) nous sont fournis par le Dr Anglès-Cano E. (INSERM U460). Les plasmides pCMV-A10, A18, A34, obtenus comme précédemment décrits par cette équipe, et sont transfectés de façon stable par électroporation dans un adenovirus transformé de cellules embryonnaires rénales humaines lignée 293. Le milieu de culture (RPMI + 10% (v/v) SVF) contenant les différentes formes recombinantes d'apo(a) est supplémenté avec des inhibiteurs de protéinases (inhibiteur de kallicréine 20 unités/ml, aprotinine, 0,5 mmol/l aminoéthyl-benzène-sulfonylfluoride (AEBSF), 2 mM/l EDTA, et 0,01 % NaN<sub>3</sub> (m/v), concentrations finales) et conservé à –80°C [Anglès-Cano et al.,1999].

Les échantillons d'apo(a) sont dialysés avant utilisation afin d'éliminer les inhibiteurs de protéinases. Les boudins de dialyse sont préalablement plongés dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) à 1% (v/v), puis rincés dans de l'eau distillée une nuit à 4°C. Ils sont ensuite utilisés pour dialyser les préparations d'apo(a) contre du RPMI pendant une nuit à + 4°C. Des préparations contenant les isoformes 10 K, 18 K, 34 K ont été utilisées. Dans tous les cas, une série témoin constituée de RPMI contenant 10 % (v/v) SVF a été traitée dans les mêmes conditions.

Les échantillons sont ensuite congelés en aliquotes de 250 µl ou 500 µl. La concentration des protéines totales et d'apo(a) des échantillons est mesurée avant et après dialyse, respectivement par la réaction du biuret et dosage immunonéphélémétrique sur automate Immage<sup>®</sup> (Beckman Coulter). Nous n'avons trouvé aucune différence de concentrations de protéines totales ni d'apo(a) avant et après dialyse.

La pureté des préparations est également vérifiée, par électrophorèse en gel de polyacrylamide/agarose/SDS, puis transfert sur une membrane de nylon (PVDF) et révélation immunologique. Après saturation des sites réactifs libres par la sérum albumine bovine, la membrane est incubée avec un anticorps polyclonal de lapin anti Lp(a) humaine. L'excès du premier anticorps est éliminé par lavage. Les bandes sont visualisées par incubation avec un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline, et addition de substrat (5-bromo-4-hloro-3-indoxyl-phosphate en présence de nitrobleu de tétrazolium) [Figure 21].



10 K 18 K 34 K 10 K 18 K 34 K

Phénotypage avant dialyse Phénotypage après dialyse

FIGURE 21: PHENOTYPAGE DES ECHANTILLONS D'APO(A)

## IV.5- Préparation des microplaques.

Les microplaques utilisées sont de type Nunclon® delta (96, 24 et 6 puits). Les puits de  $0.4~\rm cm^2$  (pour les plaques de 96 puits) et 2 cm² (pour les plaques 24 puits) et 4 cm² (pour les plaques 6 puits) sont tapissés de collagène selon le protocole suivant : le collagène est solubilisé dans l'acide acétique 18 mM (2 mg/ml) sous agitation pendant une nuit à +4°C, puis dilué (250  $\mu$ g/ml), de façon stérile dans la même solution. On dépose 100  $\mu$ l (plaque 96 puits), 500  $\mu$ l (plaque 24 puits) et 1000  $\mu$ l (plaque 6 puits) de cette solution dans chaque puits, qu'on laisse évaporer stérilement pendant 24 à 48 heures, sous la hotte à flux laminaire.

## IV.6- Evaluation de l'adhésion des monocytes.

La quantification des cellules adhérentes mise au point par Kueng et al. (1989) est utilisée pour dénombrer le nombre de monocytes ayant adhéré. Les monocytes sont déposés dans les plaques 96 puits à raison de 15x10<sup>4</sup> cellules par puits dans 100 μl de solution de Dulbecco (HEPES 30 mM pH 7,5; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; glucose 10 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>0 1,3 mM; MgCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>0 1mM) et laissés en contact avec leur substrat pendant 1 à 2 heures. Les monocytes n'ayant pas adhérés sont éliminés par trois lavages, en solution de Dulbecco, et les cellules adhérentes sont fixées pendant 15 minutes par addition dans chaque puits de 100 μl d'une solution de glutaraldéhyde à 1,1 % (v/v). La fixation est suivie de trois lavages en eau distillée, puis les noyaux cellulaires sont colorés par addition de 25 μl d'une solution de violet cristal 0,1 % (m/v) dans du tampon HEPES 200 mM, pH 6,0 pendant 15 minutes. Le violet cristal fixé est solubilisé dans 100 μl d'acide acétique à 10 % (v/v) et l'absorbance de la coloration obtenue est mesurée avec un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 560 nm.

# IV.7- <u>Evaluation de la sécrétion des métalloprotéinases</u> <u>matricielles et de leurs inhibiteurs.</u>

## IV.7.1- <u>Dépôt des cellules</u>

Les monocytes (10<sup>6</sup>/ml de milieu UltraCulture Biowhittaker<sup>®</sup>) sont cultivés en plaques 24 puits NUNCLON<sup>®</sup> Delta tapissés ou non de collagène de type I (125 μg/puits) pendant 24 et 48 h à 37°C, sous atmosphère contenant 5 % CO<sub>2</sub>.

Après chaque période d'incubation, les surnageants sont recueillis dans des cônes Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5ml et centrifugés à 600 g pendant 5 min. Les extraits cellulaires sont préparés à 4°C dans 200 μl d'un tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1 contenant 0,4 % (v/v) de Triton X-100 [Baramova, 1994]. Les surnageants et les extraits cellulaires sont conservés à – 20°C avant utilisation.

## IV.7.2-Zymographie en gel de gélatine

#### IV.7.2.1-Principe de la zymographie

La présence des métalloprotéinases matricielles sécrétées dans le milieu de culture est mesurée par une technique de zymographie [Overall et Limeback, 1988]. Le principe est celui d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), avec addition initiale d'un substrat protéique spécifique. Le substrat se trouve alors piégé dans le gel de polyacrylamide pendant la polymérisation. La séparation des protéinases est obtenue, comme pour une SDS-PAGE classique, en fonction de leur masse moléculaire apparente. Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) est ensuite éliminé afin de renaturer les protéinases, puis le gel est incubé 18 heures à 37°C. Les protéinases sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, ce qui se traduit, après coloration au bleu de Coomassie, par des bandes blanches sur fond bleu. L'intensité de dégradation pour une bande est proportionnelle à la quantité de protéinase présente.

Cette technique permet de visualiser les proformes des MMP aussi bien que les formes activées. L'activation des pro-MMP nécessite la conversion d'une liaison Cys-Zn en Zn-H<sub>2</sub>O. Le SDS supprime l'interaction Cys-Zn par dénaturation et permet donc l'activation des MMP. Après son élimination, la protéine retrouve sa forme initiale mais conserve la liaison Zn-H<sub>2</sub>O. Un phénomène d'auto-clivage élimine le prodomaine et permet ainsi l'activation de la proforme. Ce phénomène se produisant après la migration, la proforme conserve sa masse moléculaire apparente avec une distance de migration électrophorétique plus faible que celle de la forme active.

## IV.7.2.2- Zymographie en gel de gélatine

Ce type de zymographie permet la révélation des gélatinases (MMP-2 et MMP-9). On ajoute 0,1 % (m/v) de gélatine à la préparation du gel de polyacrylamide à 10 % (m/v). La gélatine préalablement préparée par chauffage à 50°C, puis aliquotée et congelée à - 20°C, est chauffée 30 minutes à 37°C dans un bain-marie avant utilisation. Les échantillons à analyser sont mis en suspension dans un volume maximal de 25 µl de tampon échantillon sans réduction. La migration est réalisée sous une intensité de 20 mA/gel. Après migration des échantillons, le gel est démoulé et placé pendant deux fois 30 minutes dans un bain d'eau distillée contenant 2,5 % (m/v) de Triton X-100. Le Triton X-100 déplace le SDS fixé aux protéines et permet donc leur renaturation. Le gel est ensuite incubé pendant 18 heures à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Triton X-100 0,02 % (m/v) pH 7,6, puis est coloré à l'aide de bleu de Coomassie G-250 (bleu de Coomassie G-250 0,1 % (m/v), en solution dans un mélange d'acide acétique/méthanol/eau 10/40/60 v/v/v). Il est ensuite décoloré à l'aide d'une solution acide acétique à 10 % (v/v) et de méthanol à 20 % (v/v). Le gel est étudié à l'aide d'un système d'analyse d'image BioProfil<sup>®</sup> couplé au logiciel BioCapt<sup>®</sup>. Les MMP apparaissent sous forme de bandes blanches sur fond bleu, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéinase présente. Un témoin négatif est utilisé en ajoutant 10 mM d'EDTA dans le tampon d'incubation. Cette méthode permet de mesurer l'activité enzymatique dans une zone de linéarité comprise entre 10 et 200 pg d'enzyme [Kleiner et Stetler-Stevenson, 1994]. Le gel est ensuite séché entre deux feuilles de cellophanes pendant 1 h 30.

#### IV.7.2.3- **Zymographie inverse**

Le principe général est identique à celui de la zymographie. La technique se caractérise par l'addition de 20 ng/ml de MMP-2 au mélange acrylamide 15 % (m/v)/gélatine 0,1 % (m/v). Pendant l'incubation, la MMP-2 dégrade la gélatine contenue dans le gel, sauf au niveau des zones où les TIMP sont présents. Ainsi, seules ces zones apparaissent après coloration du gel au bleu de Coomassie. Un témoin de TIMP-2 est déposé dans chaque série (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>, 3ng/ml).

## IV.7.3- Dosages immunoenzymatiques

Le dosage des MMP-2 et -9 et des TIMP-1 et -2 est réalisé par technique ELISA à l'aide de coffrets commercialisés par Amersham Pharmacia Biotech.

Ces dosages immunoenzymatiques [Figure 22] sont basés sur les interactions spécifiques antigène-anticorps, en utilisant deux anticorps dirigés contre des épitopes différents de la protéine dosée. Les milieux de culture sont incubés avec l'anticorps primaire monoclonal fixé aux parois d'une microplaque à 96 puits. Après élimination du milieu de culture et trois lavages, l'anticorps secondaire polyclonal couplé à la peroxydase de Raifort (Horseradish Peroxydase) est ajouté, et la quantité d'anticorps liée déterminée par l'ajout du substrat (solution de 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine TMB). La réaction est arrêtée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique 1M et l'intensité de la coloration est évaluée par mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (DU640 Beckman). La concentration de la protéine d'intérêt est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations connues de protéines recombinantes.

Les surnageants de monocytes utilisés pour ce dosage sont préparés comme précédemment pour les techniques de zymographie (chap IV.7.2).

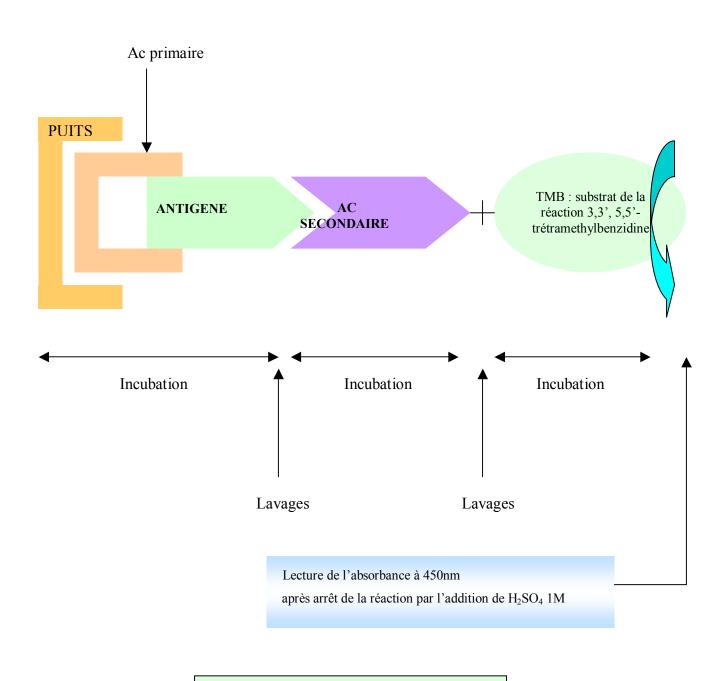


FIGURE 22 : PRINCIPE DU DOSAGE ELISA

## IV.7.4- <u>Dosage de l'ARN messager par RT-PCR quantitative</u>

Les monocytes (10<sup>6</sup>/ml de milieu UltraCulture Biowhittaker<sup>®</sup>) sont incubés en présence des différents isoformes d'apo(a) en plaques 6 puits NUNCLON<sup>®</sup> Delta tapissés de collagène de type I (500 μg/puits) pendant 6 heures à 37°C.

L'extraction des ARN est effectuée par le Tri Reagent<sup>®</sup> en utilisant la trousse fournie par Roche Diagnostics (Meylan, France). L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu par transcription inverse à partir de 1 µg d'ARN total. Toutes les réactions de PCR quantitatives utilisent le kit de détection Lightcyler-FirstStart DNA Master SYBR Green kit<sup>®</sup>, (Roche Diagnostic. Les amorces utilisées sont les suivantes :

- MMP-9 sens 5' -GCG GAG ATT GGG AAC CAG CTG T-3'
- MMP-9 anti-sens 5'-GAC GG T GTG TAC ACC CAC A-3'
- GAPDH sens 5'-ACG CAT TTG GTC GTA TTG GG-3'
- GAPDH anti-sens 5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3'

L'amplification du gène de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), gène constitutif, est utilisée comme base standardisée d'expression des résultats.

Les ADNc sont initialement dénaturés pendant 8 min à 95°C. L'amplification est réalisée progressivement par 50 cycles (95°C pendant 10 secondes, 60°C pendant 5 secondes, et 72°C pendant 7 secondes). L'acquisition de la fluorescence est réalisée à 72°C dans un mode unique à la fin du processus d'élongation. L'étape de fusion est obtenue de 65 à 95°C avec l'acquisition de la fluorescence. Le produit est ainsi analysé à l'aide d'une courbe d'étalonnage et une électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. La fluorescence est mesurée par le programme d'analyse du Light Cycler<sup>®</sup> (Roche Diagnostic). Les résultats sont exprimés en rapportant le ratio de la concentration de la cible/standart (GAPDH) de l'échantillon au ratio de la concentration de la cible/standart du calibrateur.

# IV.8- <u>Etude de la production des radicaux libres</u> oxygénés.

## IV.8.1- <u>Etude de la production des radicaux libres oxygénés par la mesure de la réduction du bleu de nitrotétrazolium (NBT).</u>

Le NBT est un composé dicationique électrophile qui capte facilement les électrons d'un donneur d'électrons et sa réduction complète en diformazan [Figure 23] [Auclair et Voisin, 1985] nécessite 2 électrons et 4 protons selon la réaction :

$$NBT^{++}$$
,  $2Cl^{-} + 4H^{+}$  diformazan +  $2HCl$ 

En solution aqueuse, les réactions produisant des ions  $O_2^-$  conduisent à la réduction du NBT en monoformazan selon la réaction :

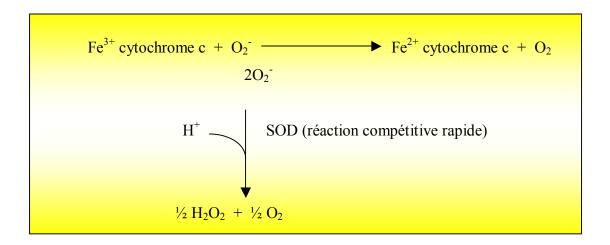
$$NBT^{++}$$
, 2  $C\Gamma + 2 O_2^- + 2 H^+$   $\longrightarrow$   $NBT^+$ ,  $C\Gamma + 2 O_2 + HC1$ 

La forme oxydée du NBT est de couleur jaune, sa réduction s'accompagne d'une perte des charges positives conduisant à la diminution de sa solubilité et à une modification de son spectre d'absorption dans le visible, caractérisée par l'apparition d'une couleur bleue.

La réduction du NBT est mesurée dans des plaques 96 puits, dans lesquels 10 µl d'une solution de NBT 1,36 mg/ml sont introduits en même temps que la suspension de monocytes. La précipitation intracellulaire du formazan induite par la réduction du NBT est mesurée directement dans les cellules, sans solubilisation, à l'aide d'un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 560 nm, selon la méthode décrite par Pick (1986).

## IV.8.2- <u>Mesure de la production d'ions superoxyde (02) par la réduction du</u> ferricytochrome inhibable par la superoxyde dismutase.

La production d'ions  $O_2^-$  est mesurée par la réduction du ferricytochrome c en ferrocytochrome c, inhibable par la superoxyde dismutase [English et al. 1981]. Le cytochrome c oxydé absorbe la lumière à 550 nm, tandis que le cytochrome c réduit n'absorbe pas à cette longueur d'onde.



La réaction est obtenue par incubation de 0,1 ml d'une suspension de monocytes (10<sup>6</sup>/ml) préalablement préincubée à 37°C pendant 5 min, dans des tubes à hémolyse en verre contenant 0,8 ml de solution de Dulbecco, 0,1 ml d'une solution de ferricytochrome c (1 mM) et 0,1 ml de collagène dénaturé (2 mg/ml). Dans les séries témoins le collagène est remplacé par 0,1 ml d'acide acétique 18 mM.

Chaque expérience nécessite la réalisation d'un tube parallèle dans lequel 50 U de SOD (0,05 ml d'une solution de SOD à 1000U/ml) sont ajoutées avant l'addition de la suspension cellulaire. Ce tube est utilisé comme référence pour la lecture de l'absorbance.

A la fin de la période d'incubation, 50 U de SOD sont ajoutés afin de stopper la réduction du ferricytochrome c, à l'exception du tube contrôle. Les tubes sont ensuite plongés dans la glace et centrifugés à 3200 g pendant 10 min à + 4°C.

Le cytochrome c réduit présent dans les surnageants est évalué par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 550 nm.

Les quantités d'ions  $O_2^-$  formés sont calculées en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 15,5 mmol<sup>-1</sup>.l.cm<sup>-1</sup> qui tient compte de la différence d'absorbance entre le ferricytochrome c et le ferrocytochrome c dans les conditions de mesure [Margoliash et Frohwirt, 1959]. Ces quantités sont exprimées en nmol d'ions  $O_2^-$  libérés en 5 min et pour  $10^6$  cellules.

A

B

#### FIGURE 23: STRUCTURE DU NITROBLEU DE TETRAZOLIUM (A) ET DU DIFORMAZAN (B)

### IV.9- Etude du système plasmine-plasminogène

### IV.9.1-Zymographie en gel gélatine-plasminogène

Cette technique de zymographie permet de mettre en évidence les activateurs du plasminogène comme l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) ou urokinase, qui est une sérine protéinase. Elle est caractérisée par l'addition à la préparation du gel de polyacrylamide à 10 % (m/v), de 0,2 % (m/v) de gélatine et de 10 µg/ml de plasminogène. Après migration électrophorétique et élimination du SDS, le gel est incubé pendant 18 heures à + 37°C dans un tampon glycine 100 mM, pH 8,0 contenant 5 mM d'EDTA. Après coloration du gel au bleu Coomassie G250 et décoloration, la présence d'une activité caséinolytique due à l'activation du plasminogène en plasmine est mise en évidence par l'apparition de bandes blanches. L'activité gélatinolytique est quantifiée par densitométrie (Vilbert\_Lourmat, Marne la Vallée). Un témoin positif par dépôt d'uPA recombinant est réalisé dans chaque série (American Diagnostica®, 100µg/ml).

#### IV.9.2- Mise en évidence de PAI-1 par Western Blot

Cette technique permet la caractérisation immunologique du PAI-1 par immunodétection indirecte après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane.

Les échantillons sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % (m/v) sous un courant continu de 100 Volts pour le gel de compression et 150 Volts pour le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride) après avoir équilibré le gel dans un tampon de transfert [Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5], placé celui ci contre la membrane entre du papier Whatman et appliqué un courant continu de 80 Volts pendant 2 heures à 4°C.

La membrane est saturée pendant 1 heure sous agitation à température ambiante dans du tampon TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 % (m/v)) contenant 2 % (m/v) de sérum albumine bovine (SAB).

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire anti-PAI-1 (American Diagnostica) dilué à  $0.5 \mu g/ml$  dans le tampon TBST/ 1 % SAB (m/v) sous agitation pendant 1 heure à température ambiante ou pendant une nuit + 4°C.

Après trois lavages de 10 min dans le tampon TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la péroxydase, dilué dans le tampon TBST/ 1 % SAB (m/v) pendant 45 min sous agitation, à température ambiante. La membrane est à nouveau lavée dans trois bains de TBST et un bain de TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM) puis révélée par un substrat de la péroxydase (Amersham), dont le produit est mis en évidence par autoradiographie.

#### IV.9.3-Mesure de l'activité plasmine

L'activité enzymatique de la plasmine est mesurée par l'hydrolyse d'un substrat spécifique, le S-2251 : H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 2 HCl (pNA, para-nitroanilide) [Christensen U., 1979]. La cinétique de libération du para-nitroaniline est suivie par mesure de l'absorbance à 405 nm.

20 µl de surnageants sont ajoutés à 160 µl de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 en plaques de 96 puits. La réaction est initiée par addition du substrat S-2251 à la concentration finale de 0,3 mM dans un volume réactionnel final de 200 µl. Les variations d'absorbance à 405 nm sont suivies à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

La vitesse initiale de la réaction est déterminée par le calcul de la pente de la tangente à l'origine. L'activité plasmine contenue dans les différents surnageants est calculée par conversion de la variation d'absorbance par min en variation de mole de substrat libéré par min en appliquant la Loi de Beer Lambert :  $A = \varepsilon l C$  ou A représente l'absorbance ;  $\varepsilon$ , le coefficient d'extinction molaire ( $l \mod^{-1} \mod^{-1}$ ) ; l, l'épaisseur de solution traversée (cm) et C, la concentration de la solution (moll).

Une courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide de différentes concentrations de para-nitroaniline [Figure 24] afin de déterminer la valeur du coefficient d'extinction molaire du para-nitroalinine dans nos conditions expérimentales ainsi que la valeur de l'absorbance correspondant à 10 % d'hydrolyse du substrat.

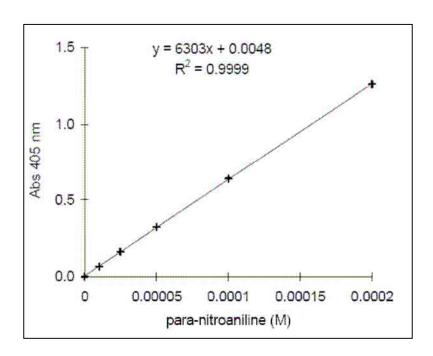


FIGURE 24 : COURBE D'ETALONNAGE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE PLASMINE

#### IV.9.4- Effet du plasminogène sur l'interaction monocytes-collagène type I

### IV.9.4.1- <u>Etude de l'adhésion et de l'activation des monocytes sur collagène type I en présence de plasminogène</u>

L'ensemble des manipulations effectuées avec l'apo(a) est reproduit avec le plasminogène.

Ainsi, l'analyse de l'adhésion des monocytes sur collagène I en présence de plasminogène 100 mM, l'activation des monocytes (études de la production de RLO et sécrétion activation de la MMP-9) sont étudiés dans les mêmes conditions.

### IV.9.4.2- <u>Effet de l'amiloride sur l'interaction monocytes- collagène type I en présence de plasminogène</u>

L'amiloride, inhibiteur d'uPA, est utilisé à une concentration de 5mM. Les manipulations sont reproduites à l'identique pour l'étude de l'adhésion et l'activation des monocytes en présence de plasminogène et d'amiloride.

### IV.10- Etude des Lysines Binding Sites (LBS).

Le rôle des LBS a été mis en évidence par un analogue de lysine : l'ɛACA. Les monocytes sont incubés avec 100 nM d'apo(a) dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 µg de collagène type I, en absence et en présence de 100 mM ɛACA pendant 48 heures à 37°C. L'étude de la production de MMP-9 est effectuée par zymographie en gel de gélatine et de TIMP-1 et TIMP-2 par zymographie inverse.

### IV.11. Statistiques.

Toutes les expériences ont été réalisées sur plusieurs préparations en triplicata et les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Les calculs ont été réalisés à l'aide du test t de Student. La significativité des différences entre les valeurs des moyennes a été schématisée de la manière suivante : NS : différence non significative ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01.

# V. RESULTATS

### V. 1- <u>Influence de l'apo(a) 18 K sur l'interaction entre</u> monocytes et collagène de type I monocytes

L'isoforme 18 K a été choisie comme isoforme de référence pour les manipulations préliminaires.

#### V.1.1- Etude de l'effet de l'apo(a) 18 K sur l'adhésion des monocytes.

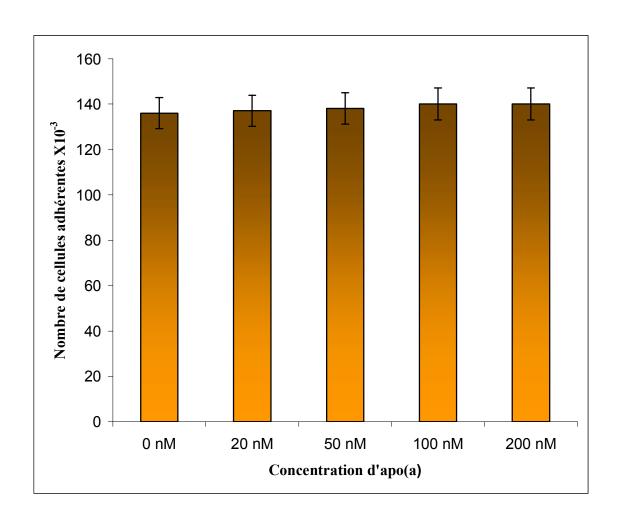
Les monocytes ont été incubés en plaques de 96 puits tapissés avec du collagène type I, en présence de concentrations croissantes d'apo(a) 18 K (20, 50, 100 et 200 nM). La durée de l'incubation était de une et deux heures. On constate l'absence de modification de l'adhésion des monocytes, même en présence de fortes concentrations d'apo(a) [Figure 25A].

L'adhésion des monocytes a également été mesurée sur les substrats suivants : la fibronectine, l'albumine, et le plastique. Aucune différence d'adhésion des cellules n'a été observée, quel que soit le substrat et quelle que soit la concentration d'apo(a) utilisée [Figure 25B]. Les résultats obtenus après 2 heures d'incubation sont présentés sur la figure 25.

## V.1.2- <u>Etude de l'effet de l'apo(a) 18 K sur la production des radicaux libres oxygénés par les monocytes</u>

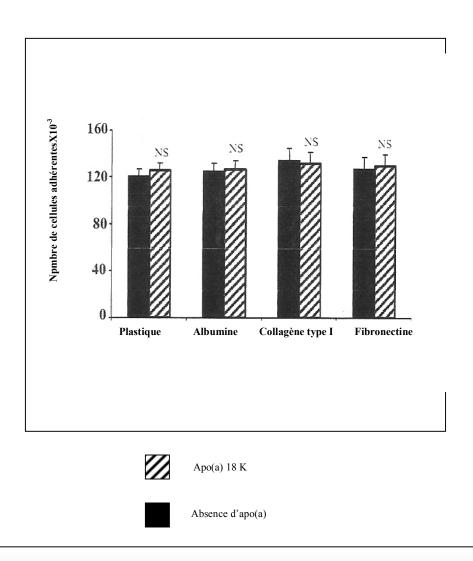
#### V.1.2.1- Mesure de la production de RLO par les monocytes adhérents en plaques 96 puits

La production de RLO par les monocytes incubés en plaques de 96 puits tapissés par du collagène type I a été étudiée après 30 minutes, 1, 2, 3 et 4 heures, en présence de concentrations croissantes d'apo(a) 18 K. Des séries contrôles ont été réalisées dans des puits non tapissés par du collagène type I. Aucune production de RLO n'est induite par le contact des monocytes avec le plastique, quelle que soit la concentration d'apo(a) utilisée. Ce contrôle sert de témoin négatif pour les manipulations effectuées par la suite.



#### FIGURE 25A: EFFET DE L'APO(A) SUR L'ADHESION DES MONOCYTES AU COLLAGENE TYPE I.

L'adhésion de 1,5.10<sup>5</sup> monocytes incubés en microplaques de 96 puits est mesurée après 2 heures d'incubation par la méthode de coloration des noyaux au cristal violet. Les résultats représentent le nombre de cellules adhérentes en présence d'apo(a) aux concentrations 0, 20, 50, 100, et 200 nM. Aucune différence n'est significative.



## FIGURE 25B : ETUDE DE L'EFFET DE L'APO(A) SUR L'ADHESION DES MONOCYTES A DIFFERENTS SUBSTRATS.

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont incubés dans des puits (plaque 96 puits Nunclon<sup>®</sup>) tapissés par 25 µg d'albumine, de fibronectine, de collagène type I ou non tapissés (plastique) en présence de 200 nM d'apo(a) 18 K pendant 4 heures à 37°C. L'adhésion a été évaluée par la coloration au cristal violet. Aucune différence n'est significative.

Lorsque les monocytes sont incubés sur le collagène de type I, une augmentation rapide de la production des RLO apparaît durant la première heure, puis plus progressivement, atteignant un plateau après la 2<sup>ème</sup> heure. La production de RLO est proportionnelle à la concentration d'apo(a) ajoutée, et significative dès la concentration de 50 nM, (p<0,05) [Figure 26A].

Ainsi, on observe + 38 % de production de RLO à la concentration de 200 nM par rapport au témoin sans apo(a)(p<0,01). L'effet est maximal dès la concentration de 100 nM.

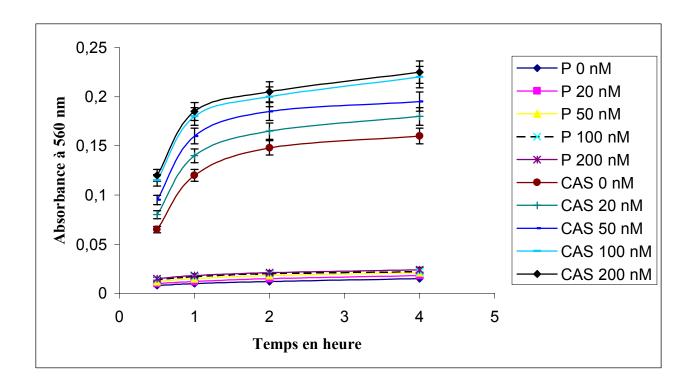
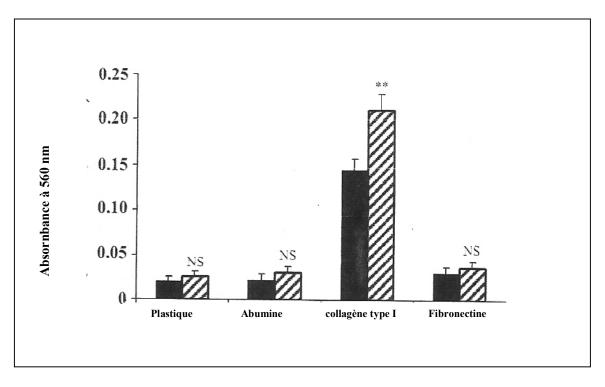
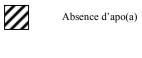


FIGURE 26A : CINETIQUE DE PRODUCTION DES RLO PAR DES MONOCYTES CULTIVES SUR COLLAGENE DE TYPE I OU PLASTIQUE EN PRESENCE D'APO(A) 18K.

1,5x10<sup>5</sup> monocytes sont déposés dans des puits tapissés de collagène de type I et des puits non tapissés (témoin plastique : P), en présence d'apo(a) 18 K à 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM. La production de RLO est mesurée par la méthode de réduction intracellulaire du bleu de nitrotétrazolium (NBT).

Lorsque l'apo(a) 18 K à la concentration de 200 nM est en contact de plastique, de fibronectine ou d'albumine la production de RLO par rapport au témoin est inchangée, alors qu'elle est augmentée de + 45 % lorsqu'il est au contact du collagène type I (p<0,01), mettant en évidence la spécificité de l'interaction apo(a) monocytes, collagène type I [Figure 26B].







### FIGURE 26B : EFFET DE L'APO(A) 18 K SUR LA LIBERATION DES RLO PAR DES MONOCYTES CULTIVES SUR PLASTIQUE, ALBUMINE, COLLAGENE TYPE I, ET FIBRONECTINE.

1,5x10<sup>5</sup> monocytes sont déposés dans des puits tapissés d'albumine, de collagène type I et de fibronectine et des puits non tapissés, en présence ou non d'apo(a) 18 K à 200 nM. La production de RLO est mesurée après la méthode de réduction intracellulaire du bleu de nitrotétrazolium (NBT).

#### V1.2.2- Mesure de la production d'ions superoxyde par les monocytes en suspension

L'étude de la production d'ions superoxyde en suspension par la réduction du ferricytochrome inhibable par la superoxyde dismutase conforte les résultats trouvés précédemment avec la réduction du NBT. En effet, le production d' $O_2^-$  est 15 fois fois plus importante lors de l'interaction de l'isoforme apo(a) 18 K à une concentration de 200 nM et de collagène type de type I, qu'au cours de l'interaction de l'isoforme 18 K à la même concentration avec de la solution dulbecco. En présence de collagène de type I, la production d'ions  $O_2^-$  est majorée de plus de 50 % en présence d'une concentration d'apo(a) de 200 nM par rapport à une concentration de 50 nM [Figure 27].

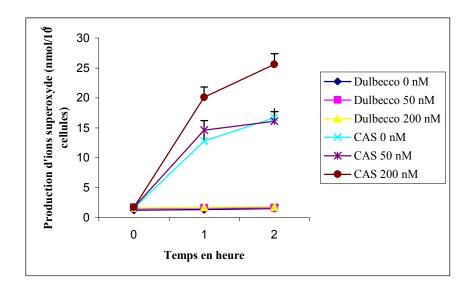
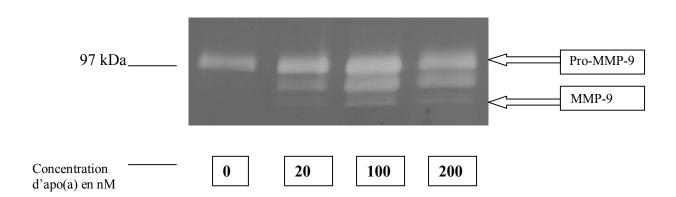


FIGURE 27 : CINETIQUE DE PRODUCTION D'IONS SUPEROXYDE PAR DES MONOCYTES EN SUSPENSION

Les monocytes en suspension sont incubés en présence de collagène de type I dénaturé ou en présence de dulbecco, et l'isoforme d'apo(a) 18 K à une concentration croissante (de 0 à 200 nM). La production d'ions superoxyde est mesurée par la tehnique de réduction du ferricytochrome c inhibable par la SOD. Les résultats représentent les moyennes de production d'ions d'O<sub>2</sub> de 3 expériences.

## V.1.3- <u>Etude de l'effet de l'apo(a) 18 K sur la production et l'activation de la MMP-9 par les monocytes.</u>

L'étude de la production et de l'activation de la MMP-9 dans les surnageants de monocytes cultivés sur du collagène type I en présence de concentrations croissantes d'apo(a) 18 K a été réalisée par zymographie en gel de gélatine. On observe une bande d'activation plus intense pour les concentrations d'apo(a) les plus fortes. A la concentration de 100 mM, la pro-MMP-9 est quatre fois plus élevée et la MMP-9 activée est douze fois plus élevée que dans la série contrôle [figure 28]. L'effet de l'apo(a) n'étant pas plus important à 200 nM, nous avons choisi la concentration de 100 nM comme condition standard dans la suite de nos manipulations.



### FIGURE 28: EFFET DE LA CONCENTRATION DE L'APO(A) 18 K SUR LA PRODUCTION ET L'ACTIVATION DE LA PROMMP-9 EN MMP-9 PAR LES MONOCYTES.

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont cultivés dans des plaques de 24 puits tapissées de 125 µg de collagène pendant 48 heures à +37°C, en présene de oncentrtaions croissantes d'apo(a) 18 K. 10 µl de surnageants ou d'extraits cellulaires sont déposés par puits. Les monocytes produisent 12 fois plus de MMP-9 activée à la concentration d'apo(a) de 100 nM qu'en l'absene d'apo(a). (chap IV.6.2.1)

# V. 2-<u>Influence du nombre de kringles IV sur</u> l'interaction collagène de type I-monocytes.

## V.2.1- <u>Etude de l'effet des différents isoformes d'apo(a) sur l'adhésion et</u> l'activation des monocytes.

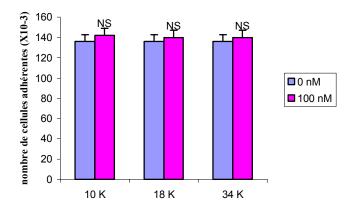
L'effet de trois isoformes d'apo(a) contenant un nombre différent de kringles (10, 18 et 34 K), utilisées à la concentration de 100 mM a été étudié.

#### V.2.1.1- Effet des trois isoformes d'apo(a) sur l'adhésion des monocytes

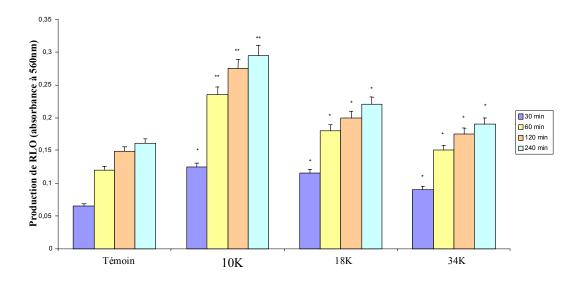
L'étude de l'adhésion des monocytes sur collagène type I a été effectuée en l'absence et en présence des trois différentes isoformes à la concentration de 100 mM. Après une incubation de 1 et 2 heures, aucune différence significative n'a été constatée, quel que soit le nombre de kringles de l'apo(a) [Figure 29A].

### V.2.1.2- Effet des trois isoformes d'apo(a) sur la production de radicaux libres oxygénés (RLO) par les monocytes.

La libération des RLO augmente progressivement avec le temps d'incubation, jusqu'à atteindre un plateau à la deuxième heure, quelle que soit l'isoforme utilisée. Cependant, l'augmentation des RLO est inversement proportionnelle au nombre de kringles, étant maximale pour l'isoforme 10 K [Figure 29B]. Ainsi, après 2 heures d'incubation, on observe une augmentation de la production de + 86 %, + 35 % et + 18 % [Tableau 4] respectivement pour les isoformes 10, 18 et 34 K par rapport au témoin sans apo(a) (p<0,01).



A.



B.

### FIGURE 29A : EFFET DES DIFFERENTS ISOFORMES D'APO(A) SUR L'ADHESION DES MONOCYTES

Les monocytes sont cultivés dans des plaques de 96 puits tapissés de 25 µg de collagène de type I pendant 4 heures à 37°C sans apo(a) (colonne bleue) ou les différents isoformes d'apo(a) (colonne rose). La concentration des isoformes est de 100nM. L'adhésion est mesurée par la méthode du cristal violet.

#### FIGURE 29B: EFFET DES DIFFERENTS ISOFORMES D'APO(A) SUR LA PRODUCTION DE RLO

Les monocytes sont incubés sur des plaques de 96 puits tapissés de 25 μg de collagène de type I, pendant 30 min (colonne bleue), 1 h (colonne jaune), 2 h (colonne orange) et 4 h (colonne turquoise) à 37°C en présence des isoformes 10, 18 et 34 K. La production de RLO est mesurée par le test de réduction du NBT. Les différences statistiques par rapport à la série témoin sans apo(a) sont notées de la façon suivante : NS : non significatif, \* : p<0,05, \*\* : p<0,01.

...

Temps	Témoin	10 K	18 K	34 K
60 min	0,12	0,235	0,18	0,15
120 min	0,148	0,275	0,2	0,175
240 min	0,16	0,295	0,22	0,19

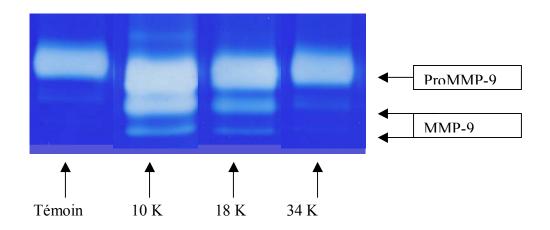
Tableau 5: Production de RLO (absorbance à 560 nm) en fonctions des isoformes d'apo(a).

La production de RLO est étudiée par la méthode de réduction du NBT (chap IV.7.1) et les résultats représentent les moyennes des absorbances de l'ensemble des trois expériences.

## V.2.2- <u>Etude de l'effet des différentes isoformes d'apo(a) sur la production et l'activation de la MMP-9 par les monocytes.</u>

#### V.2.2.1- Etude de la MMP-9 par zymographie en gel de gélatine

Les monocytes sont cultivés dans des plaques de 24 puits préalablement tapissés de 125 µg de collagène de type I en présence de 100 nM d'isoformes d'apo(a) 10, 18 et 34 K pendant 24 et 48 heures à 37°C. On constate une augmentation de la production et de l'activation de la proMMP-9 dans les surnageants pour les isoformes de faible masse moléculaire [Figure 30A]. L'effet est plus net après 48 heures, où l'analyse de l'activité gélatinolytique dans les surnageants met en évidence une production de la MMP-9 respectivement 3 fois plus importante pour l'isoforme 10 K par rapport au témoin et 2,5 fois plus par rapport à l'isoforme 34 K, qui ne présente pas d'effet significatif par rapport à la série témoin [Tableau 6].



A.

### FIGURE 30A: ETUDE PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE DE LA PRODUCTION DE LA MMP-9 PAR LES MONOCYTES EN FONTION DU NOMBRE DE KRINGLES IV.

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100 nM, pendant 24 et 48 heures à 37°C. 20 μl sont déposés par puits.

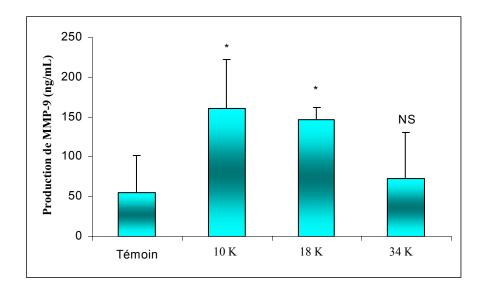
	10 K	18 K	34 K
PRO-MMP-9	X 10	X 4	X 1,8
MMP-9	X 25	X 12	X1,5

### <u>Tableau 6 : Quantification de la production de MMP-9 et de Pro-MMP-9 sur zymographie en gel de gélatine par les monocytes en fonction des trois isoformes.</u>

Les valeurs indiquées se réfèrent à la série témoin, augmentée à la valeur 1.

#### V.2.2.2- Quantification de la MMP-9 par ELISA.

Le dosage par ELISA de la MMP-9 dans les surnageants après 24 et 48 heures d'incubation met en évidence une augmentation significative de la production de MMP-9 par les monocytes au contact du collagène I, en présence des isoformes de plus faible masse moléculaire, et surtout à 48 heures [Figure 30B]. A 24 heures, on note peu de différence entre les différents isoformes, avec respectivement pour les isoformes 10, 18 et 34 K une augmentation de + 16%, + 32 % et 0 %. A 48 heures, la production de MMP-9 induite par l'isoforme 10 K est de 160,8 ng/mL *versus* 55,6 ng/mL pour le témoin soit 3 fois plus importante (p<0,05). En revanche, l'isoforme 34 K n'exerce pas d'effet significatif sur la production de MMP-9, celle ci étant de 55,6 ng/mL dans la série témoin *versus* 73,1 ng/mL pour l'isoforme 34 K soit une augmentation de 30 % (NS) [Tableau 7].



B.

### FIGURE 30B : ETUDE QUANTITATIVE PAR ELISA DE LA MMP-9 PAR LES MONOCYTES EN FONCTION DU NOMBRE DE KRINGLES IV.

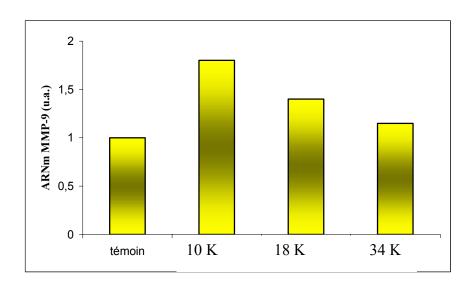
10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100 nM, pendant 24 et 48 heures à 37°C. 20 μl sont déposés par puits.

	MMP-9 24H (ng/mL)	MMP-9 48H (ng/mL)
Témoin	21,9	55,6
10 K	25,5	160,8
18 K	28,9	146,9
34 K	20,8	73,16

Tableau 7: Quantification de la production de MMP-9 par ELISA

#### V.2.2.3- Quantification de l'ARNm de MMP par RT-PCR

L'analyse par RT-PCR de l'ARNm de la MMP-9 dans les surnageants après 24 heures d'incubation met en évidence une augmentation de la synthèse de MMP-9. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (u.a.) en rapport MMP-9/GAPDH. On constate une augmentation de 80 % de la production d'ARNm lorsque l'on compare le témoin à l'isoforme 10 K. En effet la production de MMP-9 pour le témoin est de 1 u.a., de 1,8 u.a pour le 10 K, de 1,45 u.a. pour le 18 K, et de 1,2 u.a pour le 34 K [Figure 30C].



C.

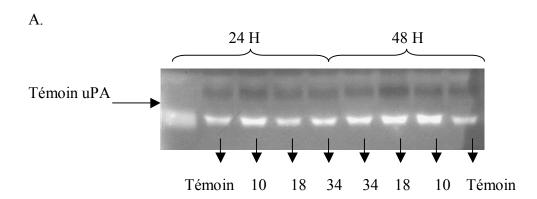
FIGURE 30C : ETUDE PAR RT PCR DE LA PRODUCTION DE MMP-9 (ARNM) PAR LES MONOCYTES EN FONTION DU NOMBRE DE KRINGLES IV.

10<sup>7</sup> monocytes sont incubés dans des plaques 6 puits tapissés de 500 μg de collagène de type pendant 24 heures, en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100 nM. Le résultat est exprimé en rapport MMP-9/GAPDH (unité arbitraire, u.a.).

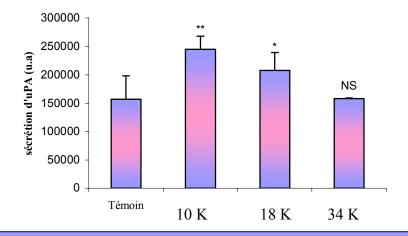
# V.2.3-<u>Etude de l'effet des différentes isoformes d'apo(a) sur le système</u> plasmine-plasminogène dans des monocytes cultivés en présence de collagène type I.

#### V.2.3.1- Etude de la production d'uPA par les monocytes

Les monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 µg de collagène de type I en présence des isoformes 10, 18, et 34 K, à la concentration de 100 nM, à 37°C pendant 24 et 48 heures. Les surnageants sont soumis à une zymographie en gel de gélatine-plasminogène, et l'activité gélatinolytique de l'uPA est mesurée par densitométrie [Figure 31A]. On constate une augmentation de la production d'uPA inversement corrélée à la taille de l'apo(a), l'effet étant plus net à 48 heures. Ainsi, l'isoforme 10 K entraîne une augmentation de + 40 % de la production d'uPA par rapport au témoin, alors que l'isoforme 34 K n'exerce pas d'effet significatif à 48 heures [Figure 31B].



B.



## FIGURE 31A : ETUDE DE LA SECRETION D'UPA PAR LES MONOCYTES EN FONCTIONS DU NOMBRE

DE KRINGLES IV.

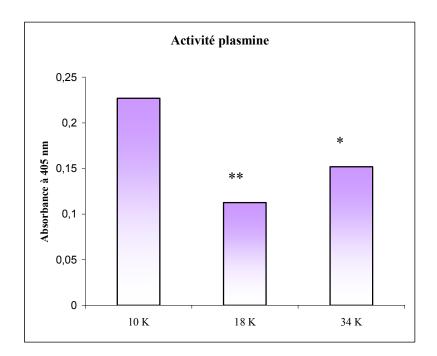
10<sup>6</sup> monocytes sont mis en culture dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I pendant 24 et 48 heures à 37°C (15 μl de surnageant déposé par puits). La zymographie en gel gélatine–plasminogène met en évidence l'activité gélatinolytique d'uPA

FIGURE 31B : EVALUATION DENSITOMETRIQUE DE L'ACTIVITE GELATINOLYIQUE D' UPA A 48 HEURES

•

#### V.2.3.2- Etude de l'activité plasmine

Les monocytes sont incubés dans des plaques de 96 puits tapissés de 25 µg de collagène type I en présence des isoformes 10, 18, et 34 K, à la concentration de 100 nM, à 37°C pendant 48 heures. On observe une diminution de l'activité plasmine en présence des isoformes 18 et 34 K par rapport à l'isoforme10 K. Il n'y a pas de différence significative entre les séries réalisées en présence d'isoformes 18 K et 34 K. On observe respectivement une diminution de + 50 % et de + 45 % par rapport à l'activité plasmine mesurée en présence de l'isofrome 10 K [Figrure 32].



#### FIGURE 32: MESURE DE L'ACTIVITE PLASMINE DES MILIEUX CONDITIONNES.

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont incubés 48 heures dans des plaques de 96 puits tapissés de collagène de type I en présence des trois isoformes à une concentration de 100 nM. Les surnageants sont utilisés pour mesurer l'activité plasmine.

La diminution de l'activité plasmine des isoformes 18 K et 34 K est comparée à l'isoforme 10 K. NS : non significatif, \* : p<0,05, \*\* : p<0,01.

#### V.2.3.3- Etude de la production de PAI-1

Les monocytes sont incubés dans les mêmes conditions que pour l'étude de la production d'uPA. La production de PAI-1 est stimulée par l'apo(a), d'autant plus que sa masse moléculaire est élevée. Après 48 heures, en présence d'isoforme 34 K on note une production de PAI-1 significativement plus importante qu'en présence du témoin ou de l'isoforme 10 K, avec une augmentation de + 42 % par rapport à ce dernier et + 62 % par rapport au témoin [Figure 33].

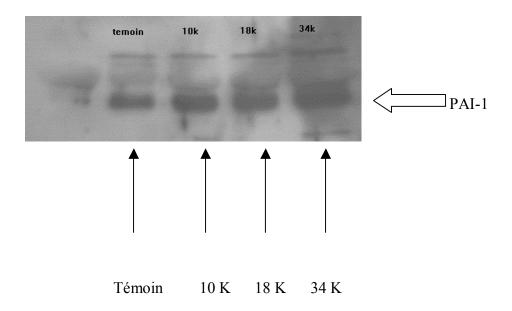


FIGURE 33 : EFFET DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(A) SUR LA PRODUCTION DE PAI-1.

 $10^6$  monocytes sont incubés 48 heures dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 µg de collagène de type I, en présence des trois isoformes à la concentration de 100 nM à 37°C, pendant 48 heures. La production de PAI-1 est mise en évidence par Western Blot.

## V.2.4- Effet du nombre de kringles de l'apo(a) sur la production deTIMP-1 et TIMP-2.

#### V.2.4.1- Etude de la production de TIMP-1 et TIMP-2 par zymographie inverse

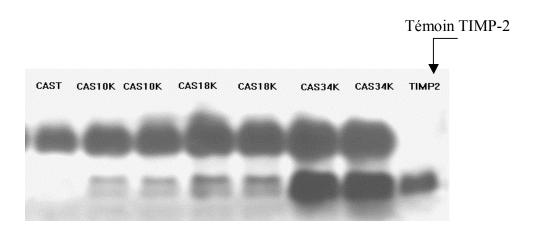
La production de TIMP-1 et de TIMP-2 a été étudiée par zymographie inverse dans les milieux surnageants des monocytes incubés à 37°C dans des plaques de 24 puits tapissées de collagène de type I en présence des trois isoformes d'apo(a) à 100 nM pendant 24 et 48 heures. En présence de collagène seul, on observe une production de TIMP-1 mais pas de TIMP-2 [Figure 34]. Les isoformes d'apo(a) provoquent une augmentation de la production de TIMP-1, proportionnellement au nombre de kringles IV. Ainsi, lors de la quantification de l'activité gelatinolytique, on note respectivement une production de TIMP-1 de + 49 % pour l'isoforme 10 K, + 86 % pour le 18 K, et + 130 % pour le 34 K.

La production de TIMP-2 est induite par l'apo(a), et de façon majeure pour l'isoforme 34 K avec une augmentation de plus de quarante huit fois la production du témoin, et de seulement neuf fois avec l'isoforme 10 K.

#### V.2.4.2- Etude de la production de TIMP-1 et TIMP-2 par ELISA

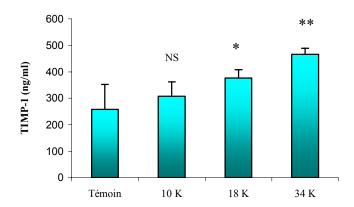
Les dosages ELISA confirment les résultats observés en zymographie inverse. La sécrétion de TIMP-1 est d'autant plus élevée que le nombre de kringles IV est important, avec un effet plus net à 48 heures [Figure 35]. La stimulation de la production de TIMP-1 est deux fois plus importante en présence d'apo(a) 34 K qu'en présence d'apo(a) 10 K à la concentration de 100 nM. On observe par rapport au témoin une augmentation de plus de

97 % en présence de l'isoforme 34 K, de 75 % avec l'isoforme 18 K et seulement 25 % avec l'isoforme 10 K. La production de TIMP-2 n'est pas significativement modifiée par les isoformes10 K et 18 K, alors que l'isoforme 34 K provoque une très importante augmentation [Figure 36]. La production de TIMP-2 est de 35 ng/ml en présence du témoin, de 120,8 ng/ml en présence de l'isoforme 34 K, de 36,8 ng/ml en présence de l'isoforme 18 K, et de 38 ng/ml en présence de l'isoforme 10 K.

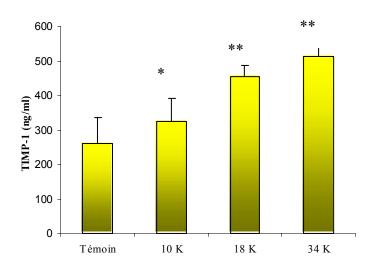


### FIGURE 34 : EFFET DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(A) SUR LA PRODUCTION DE TIMP-LET DE TIMP-2

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I, en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100 nM, à 37°C pendant 48 heures. 15 μl de milieu surnageant déposés par puits sont étudiés par zymographie inverse.



A.



B.

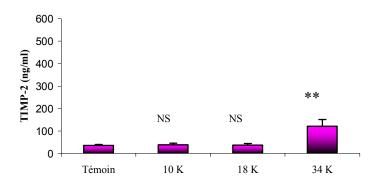
### FIGURE 35A: DOSAGE DU TIMP-1 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(A) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 24 HEURES

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I pendant 24 heures à 37°C en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100n nM. L'analyse de la production de TIMP-1 est effectuée sur les surnageants.

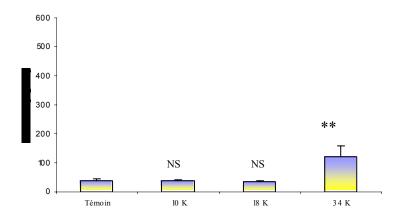
### FIGURE 35B : DOSAGE DU TIMP-1 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(A) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 48 HEURES

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I pendant 48 heures à 37°C en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100n nM. L'analyse de la production de TIMP-1 est effectuée sur les surnageants.

Différence significative avec le témoin : NS : non significatif, \* : p<0,05 et \*\* : p<0,01.



A.



B.

### FIGURE 36A : DOSAGE DU TIMP-2 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(A) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 24 HEURES

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I pendant 24 heures à 37°C en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100n nM. L'analyse de la production de TIMP-2 est effectuée sur les surnageants.

### FIGURE 36B : DOSAGE DU TIMP-2 PRODUIT PAR LES MONOCYTES EN PRESENCE DES DIFFERENTES ISOFORMES D'APO(A) PAR METHODE ELISA AU TEMPS 48 HEURES

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I pendant 48 heures à 37°C en présence des trois isoformes d'apo(a) à la concentration de 100n nM. L'analyse de la production de TIMP-2 est effectuée sur les surnageants.

Différence significative avec le témoin : NS : non significatif, \* : p<0,05 et \*\* : p<0,01.

## V.3- <u>Implications des kringles IV dans les interactions de l'apo(a)</u> avec les monocytes et le collagène de type I.

#### V.3.1- Etude de l'effet du plasminogène

#### V.3.1.1- Effet du plasminogène sur l'adhésion des monocytes

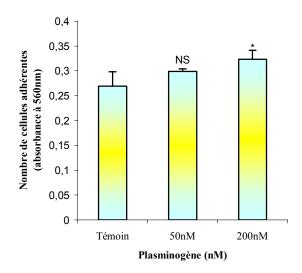
Les monocytes sont incubés en plaques de 96 puits tapissés de 25 µg de collagène de type I pendant 1 et 2 heures à 37°, en présence de concentrations croissantes de plasminogène (0, 50, 200 nM). Après une heure, on n'observe pas d'effet significatif. Après 2 heures, l'adhésion est plus importante en présence de plasminogène 200 nM que dans la série témoin. On observe effectivement une augmentation de + 39 % (p<0,05), celle-ci n'est que de 11% (NS) lorsque la concentration est de 50 nM [Figure 37A].

### V.3.1.2-<u>Effet du plasminogène sur la production de radicaux libres oxygénés par les monocytes</u>

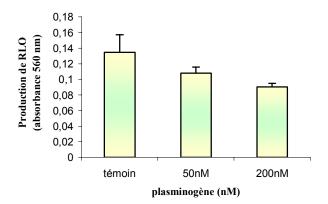
Dans les mêmes conditions, on constate une inhibition de la production des RLO par les monocytes dès la première heure à la concentration de plasminogène 200 nM. L'effet est plus net à la deuxième heure. Ainsi, on constate une diminution de la production de RLO de 33 % par rapport au témoin, en présence de plasminogène 200 nM, alors que l'effet n'est pas significatif à 50 nM [Figure 37B].

## V.3.1.3- <u>Effet du plasminogène sur production et l'activation de la MMP-9 par les monocytes</u>

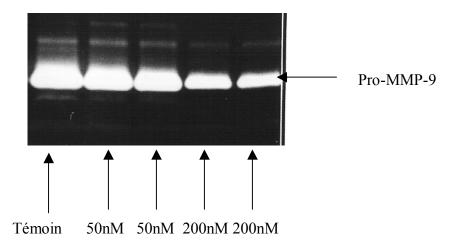
Les monocytes sont cultivés sur plaques de 24 puits tapissés de 125 µg de collagène de type I pendant 24 et 48 heures à 37°C en présence de 50 nM et 200 nM de plasminogène. Le plasminogène, à la concentration de 200 nM, entraîne une inhibition significative de la production et de l'activation de la MMP-9, avec plus de 30 % d'inhibition sur la sécrétion de pro-MMP-9 [Figure 37C].



A.



B.



C.

#### FIGURE 37A: ETUDE DE L'EFFET DU PLASMINOGENE SUR L'ADHESION DES MONOCYTES

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont incubés pendant 1 et 2 heures à 37°C dans des plaques de 96 puits tapissés de collagène type I, en absence (témoin) ou en présence de 50 nM et 200 nM de plasminogène. L'adhésion des monocytes est mesurée à l'aide de la méthode de coloration au cristal violet. Différence par rapport à la série témoin NS: non significatif, \*: p<0,05.

### FIGURE 37B : ETUDE DE L'EFFET DU PLASMINOGENE SUR LA PRODUCTION DE RLO PAR LES MONOCYTES

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 96 puits tapissés de 25 µg de collagène de type I, pendant 1 heure à 37°C, en présence de plasminogène 50 et 200 nM. La production de RLO est mesurée par le test de réduction intracellulaire du NBT. Différence par rapport à la série témoin NS : non significatif, \* : p<0,05.

### FIGURE 37C : ETUDE DE L'EFFET DU PLASMINOGENE SUR LA SECRETION ET L'ACTIVATION DE LA

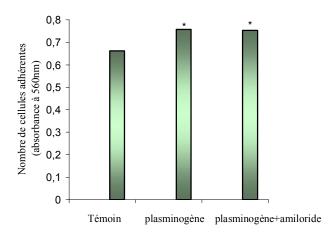
#### MMP-9 PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE

10<sup>6</sup> monocytes sont incubés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I, en absence (témoin) ou en présence de 50 nM et 200 nM de plasminogène. 15 μl sont déposés par puits.

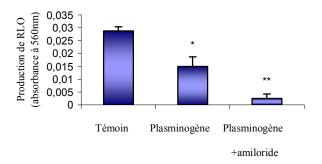
.

### V.3.1.4- Effet de l'amiloride sur l'interaction entre le plasminogène, les monocytes et collagène de type I

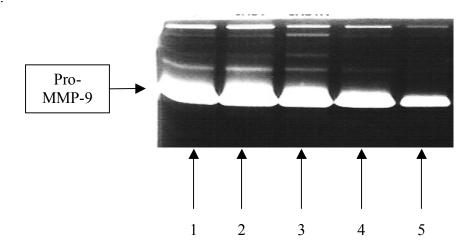
Les manipulations décrites ci dessus sont reproduites en présence de plasminogène à la concentration de 200 nM et d'amiloride à la concentration de 5 mM. La libération de RLO et l'adhésion des monocytes au collagène I sont mesurées après 1 et 2 heures, la production et l'activation de la MMP-9 sont évaluées après 24 et 48 heures. L'amiloride entraîne une diminution significative de la libération de RLO de plus de 90 % par rapport au témoin sans plasminogène [Figure 38B], sans modification de l'adhésion cellulaire [Figure 38A]. La production de la pro-MMP-9 par les monocytes au contact de collagène de type I et de plasminogène, est diminuée significativement en présence d'amiloride. On constate une diminution de 30 % en présence de 200 nM de plasminogène et de 60 % en présence d'amiloride, elle est peu importante (11 %) en présence du témoin amiloride seul [Figure 38C].



A.



B.



C.

### FIGURE 38A: ETUDE DE L'EFFET DE L'AMILORIDE SUR L'ADHESION DES MONOCYTES.

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont cultivés pendant 1 et 2 heures à 37°C dans des plaques de 96 puits tapissés de collagène de type I, en absence (témoin) ou en présence de plasminogène 200 nM et/ou d'amiloride 5mM. L'adhésion des monocytes est mesurée à l'aide de la méthode de coloration au cristal violet. Différence par rapport à la série témoin : NS : non significatif, \* : p<0,05.

#### FIGURE 38B: ETUDE DE L'EFFET DE L'AMILORIDE SUR LA PRODUCTION DE RLO.

 $1,5.10^5$  monocytes sont cultivés pendant 1 et 2 heures à 37°C dans des plaques de 96 puits tapissés de collagène de type I, en absence (témoin) ou en présence de plasminogène 200 nM et/ou d'amiloride 5mM. La production de RLO est mesurée par le test de réduction intracellulaire du NBT. Différence par rapport à la série témoin : NS : non significatif, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

### FIGURE 38C : ETUDE DE L'EFFET DE L'AMILORIDE SUR LA PRODUTION ET L'ACTIVATION DE MMP-9 PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE

10<sup>6</sup> monocytes sont cultivés dans des plaques de 24 puits tapissés de collagène de type I pendant 48 heures à 37°C. L'activation et la production de la MMP-9 sont mises en évidence par zymographie en gel de gélatine. 1 : témoin, 2 : témoin, 3 : amiloride seul, 4 : plasminogène, 5 : plasminogène et amiloride.

#### V.3.2- Etude de l'implication des LBS.

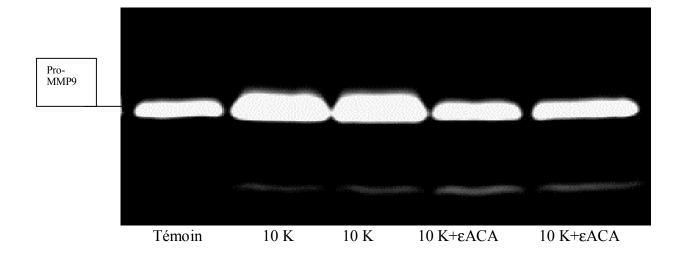
## V.3.2.1- Rôle de l'acide $\varepsilon$ -amino-caproïque ( $\varepsilon$ ACA) sur la production de la MMP-9 stimulée par l'apo(a) 10 K

Les monocytes sont cultivés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125  $\mu g$  de collagène de type I avec l'isoforme 10 K (100 nM), en présence ou en absence de 100 mM  $\epsilon$ ACA , à 37°C pendant 24 et 48 heures. La production et l'activation de la MMP-9 sont étudiées par zymographie en gel de gélatine [Figure 39A] et par dosage ELISA [Figure 39B].

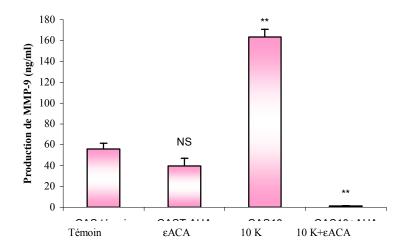
On observe une inhibition significative de plus de 40 % de l'effet de l'apo(a) 10 K sur la production de MMP-9 par l'ɛACA lors de la quantification de l'activité gélatinolytique. L'étude de la libération des RLO a été étudiée en présence de l'isoforme 10 K associée ou non à l'ɛACA. Après 48 heures, on observe une diminution de la production des RLO de 20 % lorsque l'isoforme 10 K est associée à l'ɛACA.

## IV.3.2.2- <u>Rôle de l'acide ε-amino-caproïque (εACA) sur la production de TIMP-1 et de TIMP-2 stimulée par l'isoforme 34 K</u>

Les monocytes sont cultivés dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 µg de collagène de type I en présence de l'isoforme 34 K, en présence ou en absence de 100 mM d'ɛACA à 37°C pendant 24 et 48 heures. La production et l'activation de TIMP-1 et TIMP-2 sont étudiées dans les milieux surnageants par zymographie. On constate l'absence d'effet significatif de l'ɛACA sur la production de TIMP-1 et de TIMP-2 basale ou stimulée par l'apo(a) 34 K [Figure 40].



A.



B.

C.

### FIGURE 39A : EFFET DE L'E-ACA SUR LA PRODUCTION ET L'ACTIVATION DE LA MMP-9 PAR ZYMOGRAPHIE EN GEL DE GELATINE.

10<sup>6</sup> monocytes sont cultivés en absence ou en présence d'apo(a) 10 K (100 nM) et /ou d' ε-ACA (100 mM) dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg collagène de type I à 37°C pendant 48 heures. 15 μl de milieu de surnageant sont utilisés pour mettre en évidence l'activation de la pro-MMP9 par zymographie en gel de gélatine.

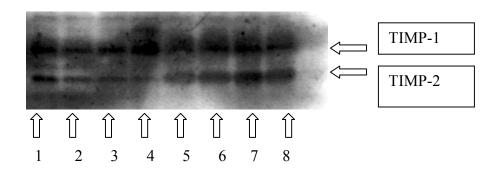
### FIGURE 39B : EFFET DE L'ε-ACA SUR LA PRODUCTION DE LA MMP-9, QUANTIFICATION PAR ELISA

10<sup>6</sup> monocytes sont cultivés en absence ou en présence d'apo(a) 10 K (100 nM) et /ou d' ε-ACA (100 mM) dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg collagène de type I à 37°C.

#### FIGURE 39C: EFFET DE L'E-ACA SUR LA PRODUCTION DE RLO PAR LES MONOCYTES

1,5.10<sup>5</sup> monocytes sont cultivés en absence ou en présence d'apo(a) 10 K (100 nM) et /ou d' ε-ACA (100mM) dans des plaques de 96 puits tapissés de 25 µg collagène de type I pendant 1 heure à 37°C. La production de RLO est mesurée par le test de réduction intracellulaire du NBT. Les résultats sont exprimés par rapport à la série témoin apo(a).

Différence significative avec le témoin : \*p<0,05 et \*\*p<0,01.



### FIGURE 40 : ETUDE DE L'EFFET DE &ACA SUR LA PRODUCTION DE TIMP-1 ET TIMP-2 EN PRESENCE D'ISOFORME 34K, PAR ZYMOGRAPHIE INVERSE.

10<sup>6</sup> monocytes sont cultivés en absence ou en présence d'isoforme 34 K (100 nM) et/ou εACA (100 mM) dans des plaques de 24 puits tapissés de 125 μg de collagène de type I à 37°C pendant 48 heures. 15μl de milieu surnageant sont déposés par puits.

1, 2 Témoin; 3, 4 εACA; 5, 6 34 K; 7, 8 34 K+εACA

# VI. DISCUSSION

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle complexe, associée dans ses phases précoces à une inflammation, notamment liée à l'accumulation de lipoprotéines de basse densité oxydées, qui représentent un agent d'agression au niveau de l'intima des grosses artères. Cette inflammation est le point de départ d'une cascade d'évènements impliquant la libération de chimiokines, de protéine C- réactive (CRP), l'activation du complément, et l'accumulation sélective de monocytes et de macrophages (forme tissulaire de ces derniers) et de lipoprotéines oxydées. Dans une étude très récente, il a été démontré que la plasmine générée lors de l'inflammation au sein des lésions d'athérosclérose permet la libération de cytokines par les macrophages [Li et al. 2007]. L'oxydation des lipoprotéines de basse densité par la production de RLO, notamment monocytaire, est à l'origine de la formation des cellules spumeuses, ellesmêmes responsables de la strie lipidique, première étape de la formation de la plaque [Ragab et al. 1996]. Les parois vasculaires sont formées principalement de collagène de type I, avec lequel les monocytes vont interagir par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques dont les intégrines  $\alpha_X\beta_2$  (CD11c/CD18) [Garnotel et al. 2000], ce qui entraı̂ne leur activation. Cette activation est responsable de la libération des RLO, mais également de métalloprotéinases matricielles (MMP-9) et de leurs inhibiteurs (TIMP-1 et 2), qui jouent un rôle essentiel dans le remodelage vasculaire [Galis et al. 1994; Hobeika et al. 2007].

La lipoprotéine (a) est un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant, dont la concentration est génétiquement déterminée, pour lequel aucun traitement n'est actuellement disponible chez l'homme. C'est une lipoprotéine proche des LDL, dont l'apolipoprotéine B100 est reliée par un pont disulfure à une apolipoprotéine particulière, l'apolipoprotéine (a). L'apolipoprotéine (a) fait partie de la famille des protéines contenant des kringles comme le plasminogène, le tPA, la prothrombine, le facteur XII de la coagulation, et le facteur de stimulation des macrophages (Macrophage Stimulating Factor, MSF). Elle présente de fortes homologies structurales avec le plasminogène, qui lui confèrent la capacité de se fixer à la fibrine et d'inhiber la fibrinolyse.

Son rôle dans la physiopathologie de l'athérosclérose reste cependant méconnu. Nous avons décidé, dans ce travail, d'analyser le rôle de l'apolipoprotéine (a) sur les fonctions inflammatoires des monocytes lors de leur interaction avec le collagène type I.

Les différents objectifs de ce travail ont été :

- ➤ l'étude de l'influence de l'apo(a) en fonction de sa taille sur l'interaction monocytescollagène type I et les effets biologiques en résultant par différentes isoformes d'apo(a) recombinante (10, 18 et 34 K).
- ➤ le rôle du système plasmine/plasminogène dans les cascades protéolytiques menant à l'activation de la pro-MMP-9 en MMP-9.
- les différents mécanismes d'action de l'apo(a) en fonction de sa taille.

#### Influence de l'apo(a) 18 K sur l'adhésion et l'activation des monocytes

L'étude de l'adhésion des monocytes sur le collagène de type I en comparaison à d'autres substrats en présence d'apo(a) 18 K ne met en évidence aucune différence, quel que soit le substrat (sérum albumine bovine, fibronectine) et quelle que soit la concentration d'apo(a) utilisés.

Ainsi, l'adhésion des monocytes sur collagène n'est pas modifiée en présence des concentrations d'apo(a) variant de 20 à 200 nM. L'apo(a) permet cependant l'attraction des cellules au niveau du site inflammatoire et représente donc un chimioattractant puissant pour les monocytes par l'intermédiaire du GMP cyclique, favorisant ainsi leur présence dans la plaque [Syrovets et al., 1997]. L'étude de Ganné et al. en 1999, met en évidence une augmentation de l'adhésion des monocytes à la vitronectine et au fibrinogène par l'intermédiaire d'une augmentation des récepteurs u-PAR et ICAM-1 en présence de Lp(a) et LDL oxydées [Ganné et al., 1999]. Ces résultats laissent supposer que l'effet observé est sous la dépendance de l'apoB100 ou de son oxydation. Dans une étude récente, il est mis en évidence une interaction de l'apo(a) avec l'intégrine β<sub>2</sub> Mac-1, facilitant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et leur migration transendothéliale [Sotiriou et al., 2006]. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'avait été consacrée à l'adhésion monocytaire sur le collagène de type I.

Si l'apo(a) ne modifie pas l'adhésion des monocytes sur collagène de type I, elle provoque leur activation de façon dose dépendante pour des concentrations allant de 20 à 200 nM, mise en évidence par une production de RLO proportionnelle à la concentration d'apo(a) utilisée, avec un effet maximum noté dès la concentration de 100 nM.

L'activation des monocytes par l'apo(a) est constatée spécifiquement en présence du collagène de type I. En effet, la libération de RLO est significativement augmentée uniquement lorsque les monocytes sont incubés dans des puits tapissés de collagène de type I, en présence d'apo(a) de 50 à 200 nM. L'effet activateur de l'apo(a) n'est pas retrouvé sur des monocytes en contact avec le plastique, l'albumine, ou la fibronectine. Ainsi, pour la première fois, une étude décrit la spécificité des effets observés lors de l'interaction monocytes apo(a), en présence de collagène de type I.

Dans la paroi vasculaire, les monocytes sont attirés au niveau du site inflammatoire par des facteurs chimioattractants comme le MCP-1, dont la réaction est notamment stimulée par les LDL oxydées, et par le CC Chemokine I-309, produit par les cellules endothéliales et induit par la Lp(a) [Haque et al., 2000].

Ces résultats permettent de formuler l'hypothèse qu'au cours de la formation de la plaque, la Lp(a) permet le recrutement des monocytes et, par l'intermédiaire de l'apo(a) (concentration de 100 nM), déclenche leur activation lors du contact avec le collagène type I.

La libération des RLO est responsable de l'oxydation des lipoprotéines telles que les LDL et la Lp(a). Celle-ci modifie les propriétés des LDL et augmente leurs caractéristiques athérogènes. En 1981, Henriksen et al. ont décrit une modification marquée des propriétés des LDLox (LDL oxydées) lors de leur incubation avec les cellules endothéliales, permettant ainsi une épuration plus importante par les macrophages de ces lipoprotéines modifiées [Henriksen et al., 1981]. Plusieurs études ont mis en évidence, par la suite, la présence préférentielle de ces LDL oxydées au niveau des lésions vasculaires, contrairement aux LDL « saines » majoritairement plasmatiques [Nielsen, 1999]. Effectivement le transfert dans la paroi intimale des artères est nettement augmenté lorsqu'il s'agit de LDL oxydées.

L'oxydation des LDL joue un rôle dans l'athérogénèse par l'intermédiaire de deux voies principales *in vivo* :

- la fusion des LDL oxydées dans la paroi artérielle, qui augmente l'affinité de liaison des LDLox à leur récepteur et leur rétention dans la paroi artérielle
- la formation d'amyloïde par l'apoB des LDLox qui augmente la capture des LDLox par les récepteurs scavengers CD36 qui reconnaissent l'amyloïde.

Une étude récente met en évidence l'absence de formation d'amyloïde et une inhibition de la fusion lors de l'oxydation des lipoprotéines *in vitro*, suggérant la participation de mécanismes additionnels *in vivo*, comme le transport par l'albumine des produits de peroxydation lipidique et/ou la liaison des LDL aux protéoglycannes artériels [Jayaraman et al. 2007].

L'augmentation de la production des RLO intervient également dans le remodelage de la plaque en activant la MMP-9 sécrétée par les monocytes On observe par ailleurs une augmentation parallèle de la production d'ions O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de la concentration de MMP-9 plasmatique chez des sujets asymptomatiques mais porteurs de lésions carotidiennes sub-cliniques, l'association de ces deux facteurs représentant ainsi un marqueur précoce de risque vasculaire [Zalba et al. 2007].

Dans notre étude, l'isoforme d'apo(a) de taille intermédiaire 18 K est responsable de l'augmentation de la production et de l'activation de la MMP-9 par les monocytes issus de donneurs sains.

L'intensité de l'activation de la pro-MMP-9 est cependant variable en fonction du donneur, ce qui explique l'absence sur certains zymogrammes de bande gélatinolytique correspondant à la forme active de la MMP-9. De façon similaire à la libération des RLO, on constate une production et une activation maximale de la MMP-9 à 24 et 48 heures dans les milieux conditionnés pour la concentration de 100 nM d'apo(a), correspondant à une concentration observée dans des conditions physiologiques. L'effet est plus net après 48 heures d'incubation.

La MMP-9 est une collagénase impliquée dans le remodelage de la plaque et l'augmentation de son activité est corrélée avec le risque d'instabilité de la plaque et donc d'embole vasculaire. Une étude très récente a montré que la MMP-9 est préférentiellement impliquée dans les stades avancés de la plaque d'athérome [Chap II1.2 tableau 1] [De Nooijer et al. 2006].

Cette constatation a une importance capitale pour la prise en charge thérapeutique ; en effet, une thérapeutique inhibant l'activité MMP-9 serait surtout efficace dans le cadre d'une stabilisation des lésions avancées et non une prise en charge des lésions précoces. Formato et al. ont mis en évidence une corrélation positive entre la concentration de MMP-9 et MMP-2 et les médiateurs de l'inflammation IL-6 et IL-8 dans des extraits d'artères carotidiennes [Formato et al., 2004]. De même, l'apo(a) par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale permet l'augmentation de la sécrétion de IL-8 par les macrophages *in vitro* [Klezovitch et al., 2001].

De fortes concentrations de MMP-9 sont retrouvées dans les plaques classées histologiquement comme instables associées à une protéolyse des apolipoprotéines suggérant le caractère actif de ces protéinases [Formato et al. 2004].

Ainsi, d'après nos résultats, l'apo(a) augmente la production et l'activation de la MMP-9, responsable d'un remodelage matriciel dans la plaque. L'apo(a) intervient également dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 par un effet direct et indirect par l'intermédiaire de la MMP-9. L'IL-8 est une cytokine ayant une longue durée de vie et résistante à la dégradation protéolytique contrairement aux autres et intervient notamment dans le chimiotactisme des monocytes [Klezovitch et al. 2001].

Le système plasminogène/plasmine joue également un rôle dans la production de la MMP-9 par les monocytes, et notamment par l'intermédiaire de l'uPA [Menshikov et al. 2002] via ERK1/2 ainsi que l'activation de la phospholipase A2 et la production d'eicosanoides [Menshikov et al. 2006]. Nous verrons au cours de la discussion sur les différents isoformes, le rôle de l'apo(a) sur la sécrétion d'uPA.

Le nombre de kringles IV définit le caractère athérogène de l'apo(a), les faibles masses moléculaires étant les plus athérogènes [Kraft et al., 1996; Marcovina et al., 1999; Longenecker et al., 2002; Lundstam et al., 2002; Paultre et al., 2002]. Nous avons donc comparé l'effet de trois isoformes d'apo(a) constituées d'un nombre variable de kringles IV, définissant ainsi : une isoforme de faible masse moléculaire (10 K), une isoforme intermédiaire (18 K), et une isoforme de masse moléculaire élevée (34 K).

A la concentration de 100 nM aux temps 24 et 48 heures, l'augmentation de production des RLO par les monocytes cultivés sur collagène de type I est inversement proportionnelle au nombre de kringles IV.

En effet, la libération des RLO est respectivement augmentée de 86 %, 35 %, et 18 % pour les isoformes 10, 18 et 34 K. Cet effet est net dès la deuxième heure d'incubation, et est indépendant de l'adhésion puisque, comme nous l'avions observé pour l'isoforme 18 K, l'adhésion des monocytes sur collagène type I n'est pas significativement modifiées par les différentes isoformes [10, 18 et 34 K] utilisées à la concentration de 100 nM.

Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature, les isoformes de faible masse moléculaire étant responsables d'une augmentation du stress oxydatif et donc de la peroxydation lipidique des lipoprotéines.

De façon identique, la production et l'activation de la MMP-9 par les isoformes d'apo(a) sont inversement proportionnelles au nombre de kringles IV, comme l'ont montré les études par zymographie, confirmées par ELISA et RT-PCR. Les quantités de MMP-9 libérées sont significativement plus élevées à 48 heures. Les données de la littérature sur le rôle de la plasmine et de la MMP-9 mettent en évidence leur implication dans l'athérogénèse.

La plasmine permet non seulement l'activation de la pro-MMP-9 en MMP-9 mais aussi l'augmentation de la transcription du gène et de la synthèse de MMP-9 [Menshikov et al. 2002]. La plasmine et la MMP-9 sont capables *in vitro* de modifier de façon non oxydative les LDL, leur conférant ainsi un potentiel athérogène. Les isoformes de faible masse moléculaires se lient avec plus d'affinité à la fibrine et sont plus efficaces dans l'inhibition de la formation de plasmine au niveau des surfaces de fibrine [Kang et al. 2002].

*In vitro*, ces deux enzymes sont colocalisées avec les LDL modifiées dans les lésions d'athérosclérose précoces et avancées [Torzewski et al. 2004].

En adéquation avec nos résultats, une étude récente a mis en évidence une relation inverse entre le nombre de kringles IV de l'apo(a) et la force d'adhésion des monocytes dépendant de l'intégrine β2 Mac-1 à l'apo(a), permettant ainsi le recrutement des cellules inflammatoires au niveau du site vasculaire lésionnel [Sotiriou et al., 2006].

Nous avons également étudié l'influence de la taille de l'apo(a) sur la production par les monocytes des deux principaux inhibiteurs physiologiques de MMP, le TIMP-1 et le TIMP-2.

Les monocytes produisent du TIMP-1 et du TIMP-2, le TIMP-1 étant synthétisé en grande quantité et de façon inductible, contrairement au TIMP-2, dont la synthèse est constitutive [Shapiro et al. 1992]. La production de TIMP-1 est augmentée par l'apo(a), de manière proportionnelle au nombre de kringles IV. Ainsi on note, lors de la quantification de l'activité gélatinolytique, une augmentation de production de 49 % pour le 10 K, de 86 % pour le 18 K et de 130 % pour le 34 K. Les résultats ont été confirmés par ELISA.

La production de TIMP-2 n'est pas modifiée par les isoformes 10 K et 18 K, alors qu'elle est fortement augmentée par l'isoforme 34 K.

Le TIMP-2 forme un complexe tétramérique avec la MMP-2 pour permettre l'activation de celleci par la MT1-MMP. A l'inverse, le TIMP-2 en excès inhibe cette activation. La MMP-2 active la pro-MMP-9 et ce processus est inhibé par le TIMP-2 [Baramova et al. 1997].

Ces résultats mettent donc en évidence une stimulation par l'apo(a) de la production de MMP-9 par les monocytes, inversement proportionnelle au nombre de kringles IV. Cette observation contraste avec l'effet sur la production de TIMP-1 et TIMP-2, plus marqué sous l'influence des isoformes de masse moléculaire élevée, ce qui suggère un mécanisme d'action différent des isoformes d'apo(a). L'effet athérogène est inversement proportionnel au nombre de kringles IV. Ces différences d'interaction avec les monocytes pourraient être en partie liées à des différences conformationnelles, les isoformes de faible masse moléculaire ayant une conformation plus flexible et ouverte, alors que celle-ci serait plus fermée lorsque les répétitions de kringle IV augmentent [Becker et al., 2004].

Plus généralement, ces données pourraient expliquer l'effet athérogène inversement proportionnel au nombre de kringles IV. Le rôle des LBS et de la conformation de l'apo(a) dans cette interaction sera discuté plus loin.

# Etude des mécanismes d'action des kringles IV de l'apo(a) et du rôle des sites de liaison aux lysines (LBS) dans l'interaction monocytes-collagène de type I

Compte tenu de l'homologie de structure entre la Lp(a) et le plasminogène nous avons étudié l'effet du plasminogène sur les fonctions inflammatoires des monocytes dans le même modèle d'interaction avec le collagène de type I, afin d'éliminer un éventuel « effet plasminogène » de l'apo(a).

Cette compétition a été notamment mise en évidence, *in vivo*, chez des enfants présentant un syndrome néphrotique, où la liaison de la Lp(a) avec la fibrine est proportionnelle au ratio apo(a)/plasminogène, donc à la concentration de Lp(a), et inversement proportionnelle à la concentration de plasminogène. Dans la même étude *in vitro*, on observe une augmentation de la liaison de la Lp(a) aux cellules monocytaires lorsque la concentration plasmatique de la Lp(a) est élevée (au cours de la phase aiguë du syndrome néphrotique) [Soulat et al., 2000].

Dans notre étude, nous n'avons pas constaté de modification de l'adhésion des monocytes sur le collagène de type I en présence de concentrations croissantes de plasminogène (de 0 à 50 nM) après une heure d'incubation.

En revanche, après deux heures d'incubation et en présence de 200 nM de plasminogène, l'adhésion des monocytes sur collagène de type I est significativement plus importante.

L'étude de l'activation des monocytes par la libération des RLO met en évidence une inhibition de leur production dès la première heure en présence de plasminogène à 200 nM, l'effet étant plus net à la deuxième heure, avec une diminution de plus de 30 % de la production de RLO par rapport au témoin. La diminution de l'activation des monocytes ne peut être attribuée à une diminution de l'adhésion puisqu'au contraire, celle ci est augmentée à la deuxième heure. L'effet sur l'adhésion des monocytes sur le collagène de type I en présence de plasminogène implique des mécanismes différents que ceux observés en présence d'apo(a).

La production de MMP-9 est également diminuée d'environ 30 % en présence de plasminogène à 200 nM par rapport au témoin, avec un effet plus net à 48 heures.

L'addition d'un inhibiteur de l'uPA, l'amiloride, aux expériences réalisées en présence de plasminogène, ne modifie pas l'adhésion des monocytes au collagène de type I. En revanche, elle entraîne une diminution significative de la production de RLO et de pro-MMP-9 par rapport au témoin sans plasminogène et sans amiloride (le témoin amiloride seul ne modifie pas significativement l'activation des monocytes) et au témoin plasminogène seul. Le plasminogène activé par l'uPA en plasmine permettrait, par l'intermédiaire de celle-ci, une activation directe des monocytes avec libération de MMP-9, elle même inhibée par l'amiloride.

L'effet de l'apo(a) sur les fonctions inflammatoires des monocytes n'est donc pas lié à un effet « plasminogène like » mais à des propriétés intrinsèques de la molécule.

On peut rapprocher nos résultats de données obtenues *in vivo* chez des souris transgéniques surexprimant l'apo(a) et déficientes en plasminogène, montrant un effet propre de l'apo(a), indépendant du plasminogène, sur l'augmentation de l'incidence des thromboses à la suite d'une lésion vasculaire [Sha et al., 2005].

#### **Implication des LBS**

Les résultats obtenus suggèrent la possibilité d'une interaction spécifique impliquant les LBS. Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié la production de pro-MMP-9 et de TIMP-1 et TIMP-2 en présence ou en absence d'acide amino-caproïque (ɛACA).

L'EACA est un analogue des LBS [Van Zonneveld et al. 1986] et permet de modifier la conformation de l'apo(a) en une structure ouverte [Becker et al., 2004].

Nos résultats mettent en évidence une diminution de l'activation des monocytes par l'isoforme apo(a) 10 K en présence d'&ACA.

En effet, on constate, particulièrement à 48 heures, une diminution de plus de 40 % de la production de pro-MMP-9 et de 20 % de la libération de RLO.

A l'inverse, l'EACA n'entraîne pas de modification de la production de TIMP-1 et TIMP-2 par les monocytes en présence de l'isoforme d'apo(a) 34 K. Ces résultats nous permettent de conclure à des interactions avec les LBS différentes en fonctions des isoformes d'apo(a), avec des conséquences différentes sur la physiopathologie de l'athérosclérose en fonction du nombre de kringles IV.

Les isoformes de faible masse moléculaire, plus athérogènes, associées à une conformation ouverte de la molécule, vont interagir avec les monocytes par l'intermédiaire des LBS. A l'inverse, les isoformes de masse moléculaire plus élevée, en conformation plus repliée, n'interagissent pas avec les monocytes par les LBS. La libération importante de TIMP-1 et TIMP-2 en présence d'isoforme 34 K démontre un mécanisme d'interaction avec les monocytes qui lui confère un caractère potentiellement protecteur contre la formation de la plaque d'athérome [Figure 42].

# Influence du nombre de kringles IV de l'apo(a) sur le système plasminogène/plasmine

Devant les homologies structurales entre l'apo(a) et le plasminogène, et pour expliquer l'activation de la MMP-9, nous avons étudié les effets de l'apo(a), en fonction du nombre de kringles IV, sur le système plasminogène-plasmine. La différence de concentration interindividuelle de Lp(a) explique *in vivo* les variations de plasmine formée à la surface de la fibrine [Soulat et al., 1999].

*In vitro*, Marcovina et al. ont mis en évidence une formation de plasmine inversement reliée à la concentration de Lp(a), alors qu'elle n'est pas modifiée par l'addition de LDL à différentes concentrations, concluant ainsi à l'implication de l'apo(a) dans la diminution de la concentration en plasmine [Testa et al., 1999].

La plasmine et l'activité plasmine résultent de l'activation du plasminogène par ses activateurs et notamment l'uPA. En effet, celui-ci exprimé par les macrophages, est retrouvé en concentration élevée dans les lésions d'athérosclérose humaine.

L'uPA induit sa propre expression dans les monocytes via son domaine EGF, et en se fixant sur son récepteur qui est capable d'induire une signalisation [Li et al. 2001].

Les souris transgéniques surexprimant l'uPA, présentent une accélération de l'athérosclérose, des occlusions coronariennes, des infarctus du myocarde, et une mort précoce [Cozen et al. 2004]. Il a été démontré que la Lp(a) native et ou oxydée augmente l'expression de l'uPA et l'uPA-R [Ganne et al., 1999].

Dans notre travail, la production d'uPA par les monocytes a été étudiée en présence des différentes isoformes d'apo(a) à la concentration de 100 nM.

On constate, et ce de façon plus nette à 48 heures, une augmentation de la production d'uPA, inversement proportionnelle au nombre de kringles IV. Ainsi l'isoforme 10 K est responsable d'une augmentation de plus de 40 % de la production d'uPA (p<0,01). A l'inverse, l'isoforme 34 K n'a aucun effet.

L'uPA est impliqué dans divers mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose, une étude de Luikart et al. ayant notamment montré que la dégradation de l'actinine-α en fragments de plus petite masse moléculaire par l'uPA permettait la maturation des monocytes en macrophages lors de l'inflammation, et participait ainsi à la formation des cellules spumeuses [Luikart et al., 2002]. Les souris apoE<sup>-/-</sup> surexprimant l'uPA présentent une augmentation de l'épaisseur de la média vasculaire. L'uPA joue également un rôle dans la clairance de la fibrine du compartiment intravasculaire [Fay et al. 2007].

Dans ce contexte, notre étude est la première a montrer l'implication de l'apo(a) sur la production d'uPA variable en fonction du nombre de kringles IV. Elle suggère la participation des isoformes de faible masse moléculaire au développement de la plaque d'athérome par notamment une action sur l'uPA [Figure 41].

En effet, le plasminogène, après son activation en plasmine par ses activateurs, comme l'uPA, joue un rôle important dans l'athérogénèse. Après l'étude de la production d'uPA, nous avons donc étudié l'activité plasmine dans les milieux conditionnés par les monocytes après 48 heures d'incubation en présence des différentes isoformes d'apo(a), et montré que l'activité plasmine était significativement plus basse pour les isoformes 34 K et 18 K par rapport à l'isoforme 10 K.

Compte tenu de cette observation, nous avons étudié la production de l'inhibiteur principal des activateurs du plasminogène, PAI-1, dans les mêmes conditions.

Les théories actuelles sur le rôle de PAI-1 dans l'athérogénèse restent très controversées du fait de résultats discordants rapportés dans la littérature.

En effet, lors d'une méta-analyse très récente, les résultats de plusieurs études sur des souris hyperlipidémiques déficientes en PAI-1 par rapport à des souris hyperlipidémiques exprimant normalement celui-ci, mettent en évidence soit une stabilité, soit une diminution, soit une augmentation de l'athérosclérose au niveau de l'aorte, ou au niveau de la bifurcation distale de l'artère carotidienne. Cependant les effets de PAI-1, sur l'infiltration des cellules comme les macrophages, dans la plaque, sur la prolifération, la migration ou l'apoptose des cellules musculaires vasculaires et l'accumulation de la matrice extracellulaire dans la plaque représentent des mécanismes par l'intermédiaire desquels PAI-1 peut moduler l'athérogénèse [Lijnen, 2005; Fay et al. 2007].

Une étude chez la souris PAI-1-/-, a montré un rôle protecteur de PAI-1 sur la progression de l'athérosclérose au niveau des zones de turbulence vasculaire comme la bifurcation carotidienne [Eitzman et al. 2000]. Luttun et al. retrouvent une diminution de PAI-1 chez les souris déficientes en ApoE, au niveau des gros vaisseaux (due à l'augmentation de la MEC) mais uniquement lors de stades avancées de l'athérosclérose [Luttun et al., 2002].

Dans notre étude, la production de PAI-1 par les monocytes est inversement corrélée à la taille de l'isoforme d'apo(a) et donc à la production d'uPA. Après 48 heures d'incubation, l'analyse des milieux conditionnés met en évidence une production de PAI-1 augmentée de en présence de l'isoforme + 62 % par rapport au témoin en présence de l'isoforme 34 K [Figure 41 et 42].

Dans l'étude de Buechler et al. on observe une augmentation de l'expression de l'ARNm monocytaire de PAI-2 chez les hommes atteints de coronaropathie et les sujets sains avec une concentration élevée de Lp(a), par rapport à des sujets sains sans élévation de la Lp(a) (ce résultat est retrouvé uniquement pour les sujets de sexe masculin). Dans la même étude, on note une diminution de PAI-1 chez les sujets coronariens avec une élévation de Lp(a), mais pas de modification pour les sujets sains avec élévation de la concentration de Lp(a). L'observation également d'une inhibition de la production de PAI-1 *in vitro* lorsque les monocytes sont en présence de la Lp(a) purifiée, permet aux auteurs de conclure à un effet probable d'autres éléments liés à la pathologie coronariennes sur la production de PAI-1 [Buechler et al., 2001].

Cependant, notre étude, qui met en évidence un effet différent de l'apo(a) sur la production de PAI-1 par les monocytes en fonctions du nombre de kringles IV, peut apporter des éléments complémentaires pour expliquer les différences retrouvées chez des patients.

Sur le plan thérapeutique, nos résultats suggèrent que seuls les patients ayant des isoformes de faible masse moléculaire nécessitent la mise en route d'un traitement, d'autant plus que, chez les caucasiens, les isoformes de faible masse moléculaire sont souvent associées à une concentration élevée de Lp(a). Ce qui confirme l'importance du dosage et du phenotypage de l'apo(a) chez des patients présentant des facteurs de risque cardio-vasculaire. Un étude très récente met en evidence une augmentation importante du risque coronariens chez des patients diabétiques de type 2 ou dyslipidémiques (hypercholestérolémie) ayant une Lp(a) >100mg/dl [Murase et al., 2007]. Un polymorphisme sur le domaine protéinase de l'apo(a) vient d'être mis en evidence et semble associé aux coronaropathies sévères chez des sujets présentant déjà un facteur de risque cardio-vasculaire (diabète de type 2 ou hypercholestérolémie), définissant ainsi un nouveau variant génétique [Luke et al., 2007].

Une molécule capable de modifier la conformation de l'apo(a) pour bloquer l'accès des sites de liaison aux lysines permettrait probablement d'inhiber l'effet délétère de ces isoformes [Figure 41].

La méconnaissance de la physiopathologie de l'apo(a) explique qu'il n'existe pas à ce jour de traitement efficace permettant de diminuer sa concentration plasmatique.

Dans les études récentes, on note cependant une efficacité relative de la pioglitazone associée au glimepiride par rapport à la rosiglitazone associée au glimepiride après un an de traitement chez des patients diabétiques de type 2 [Derosa et al. 2006]. D'autres études contredisent ces résultats, comme celle de Ko et al. qui ne retrouve pas de diminution de la Lp(a) dans une population de patients diabétiques Coréens traités par la rosiglitazone pendant 12 mois [Ko et al., 2003].

D'autres études ont montré l'absence d'efficacité des traitements par statines ou fibrates, utilisés pour diminuer le risque cardio-vasculaire.

Une étude portant sur des sujets diabétiques de type 2 avec une concentration élevée de Lp(a), a décrit une diminution de la concentration plasmatique de celle-ci lors de l'association d'une statine (simvastatine) et de la L-carnitine, mais ces résultats portant sur un nombre réduit de patients doivent être conforter par des études complémentaires [Solfrizzi et al., 2006].

La L-carnitine a été utilisée pour la première fois en 1978 par l'équipe de Maebashi chez des patients présentant une dyslipidémie de type IV, et a permis une diminution significative de la concentration plasmatique des triglycérides. Par la suite, plusieurs auteurs ont démontré son effet sur la diminution des triglycérides et du LDL cholestérol [Derosa et al. 2003].

Plusieurs études ont analysé l'effet de l'acide nicotinique, et le plus souvent mis en évidence son efficacité dans la diminution de la concentration plasmatique de Lp(a), mais les effets secondaires de la molécule (toxicité hépatique, flush, céphalées) restent un frein majeur à son utilisation chez l'homme. Les oestrogènes et le tamoxifène diminuent chez la femme post ménopausique la concentration de Lp(a) [Dalessandri, 2002].

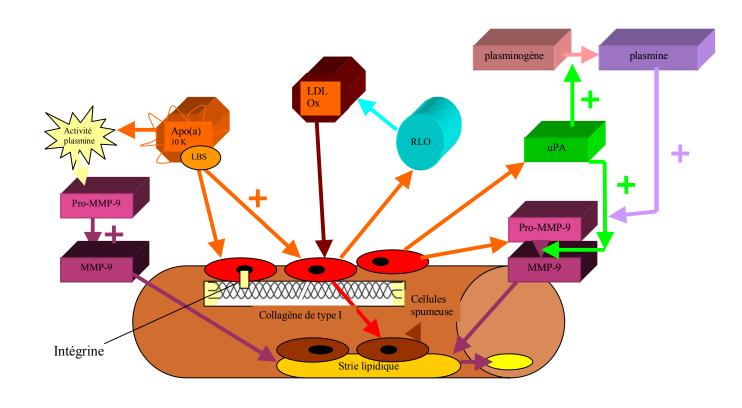


FIGURE 41 : INFLUENCE DES ISOFORMES D'APO(A) DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE SUR LES PROPRIETES INFLAMMATOIRES DES MONOCYTES DANS UN MODELE *IN VITRO* D'INTERACTION AVEC LE COLLAGENE DE TYPE I

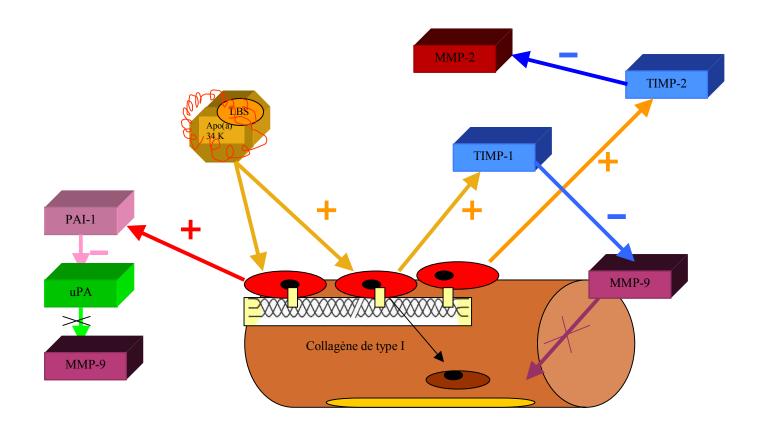


FIGURE 42 : INFLUENCE DES ISOFORMES D'APO(A) DE MASSE MOLECULAIRE ELEVEE SUR LES PROPRIETES INFLAMMATOIRES DES MONOCYTES DANS UN MODELE *IN VITRO* D'INTERACTION AVEC LE COLLAGENE DE TYPE I

# VII. CONCLUSIONS

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la physiopathologie de l'athérosclérose sont encore incomplétement connus. Au cours de cette thèse, nous avons particulièrement étudié les interactions entre apo(a), monocytes et matrice extra cellulaire.

Notre étude a mis en evidence, *in vitro*, **un effet spécifique** de l'apo(a) sur le collagène de type I, lors de l'interaction avec les monocytes. Cette spécificité de substrat n'a, jusqu'à présent, jamais été décrite. Nous avons également observé un rôle différentiel de l'apo(a) en fonction du nombre de kringles IV lors de l'interaction.

Les **isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire**, semblent intervenir sur les fonctions inflammatoires des monocytes, lors de leur interaction avec la matrice extra cellulaire, en favorisant l'athérogènèse par **augmentation des processus oxydatifs**, caractérisés par la libération de RLO. Cette libération est responsable de l'oxydation des lipoprotéines athérogènes comme les LDL ou la lipoprotéine (a), et de l'augmentation **du processus thrombogène**, en favorisant l'instabilité de la plaque par une augmentation de la libération et de l'activation de la MMP-9. Cet effet est inversement proportionnel au nombre de kringles IV.

Nous avons mis en évidence une augmentation de la production de l'activateur du plasminogène uPA, par les isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire permettant ainsi d'expliquer la formation de plasmine et donc l'activation de la pro-MMP-9 en MMP-9. Malgré les similitudes entre l'apo(a) et le plasminogène, les effets de l'apo(a) sur l'activation des monocytes lors de l'interaction avec le collagène de type I, n'ont pas été reproduits avec le plasminogène.

A l'inverse, les **isoformes d'apo(a) de masse moléculaire élevée** semblent posséder **un rôle protecteur**, en empêchant le remodelage matriciel de la chape fibreuse contenue dans la plaque d'athérome. En effet, ils sont responsables de l'augmentation de la production de TIMP-1 et de TIMP-2, et de la diminution de la formation de plasmine par production de PAI-1.

Les mécanismes d'interaction de l'apo(a) avec les monocytes en présence de collagène de type I sont différents en fonction du nombre de kringles IV ce qui peut expliquer la différence des effets observés.

L'effet des isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire sur l'activation des monocytes est sous la dépendance des LBS, contrairement aux isoformes de masse moléculaire élevée.

Le statut conformationnel de l'apo(a) joue très probablement un rôle important dans cette interaction.

Le manque de données de la littérature sur le mécanisme d'action de la Lp(a) dans la physiopathologie de l'athérosclérose, explique l'absence de traitement efficace dans la prise en charge des patients présentant une élevation de sa concentration plasmatique.

Nos résultats peuvent avoir un impact thérapeutique réel, permettant de mieux cibler les patients à risque (importance du dosage et du phénotypage de la Lp(a)), et d'orienter vers un traitement bloquant certaines interactions avec les LBS.

Il sera cependant nécessaire de poursuivre ces investigations avec l'étude des récepteurs monocytaires ainsi que la signalisation impliquée dans l'interaction des isoformes d'apo(a) de faible masse moléculaire avec les monocytes sur collagène de type I. Ces résultats devront être confirmés avec la Lp(a).

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

#### A

#### ACTONS S, RIGOTTI A, LANDSCHULZ KT, XU S, HOBBS HH, KRIEGER M.

Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor.

Science 1996; 271: 518-520.

#### ACTON SL, SCHERER PE, LODISH HF, KRIEGER M.

Expression cloning of SR-BI, a CD36 related class B scavenger receptor.

J Biol Chem 1994; 269 (33): 21003-21009.

#### AGEWALL S, FAGERBERG B.

Lipoprotein(a) was an independent predictor for major coronary events in treated hypertensive men.

Clin Cardiol 2002; 25 (6): 287-290.

#### AHN JH, KIM JS, YU HK, LEE HJ, YOON Y.

A truncated kringle domain of human apoliprotein(a) inhibits the activation of extracellular signal regulated kinase 1 and 2 through a tyrosine phosphatase-dependent pathway.

J Biol Chem 2004; 279 (21): 21808-21814.

#### ANGLES-CANO E, LOYAU S, CARDOSO-SALDANA G, COUDERC R, GILLERY P.

A novel kingle-4 number-based recombinant apo[a] standard for human apo[a] phenotyping. J Lipid Res 1999; 40 (2): 354-359.

#### ANGLES-CANO E, ROJAS G.

Apolipoprotein(a): structure-function relationship at the lysine-binding site and plasminogen activator cleavage site.

Biol Chem 2002; 383 (1): 93-99.

#### AMENTO EP, EHSANI N, PALMER H, LIBBY P.

Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.

Arterioscler Thromb 1991; 11 (5): 1223-1230.

#### AUCLAIR C, VOISIN E.

Nitroblue tetrazolium reduction.

In:

Handbook of methods for oxygen radical research.

Ed Greenwald RA.

Boca raton: CRC Press; 1985: 123-132.

## ARIYO AA, THACH C, TRACY R, CARDIOVASCULAR HEALTH STUDY INVESTIGATORS.

Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly.

N Engl J Med 2003; 349 (22): 2108-2115.

#### B

BARAMOVA EN, BAJOU K, REMACLE A, LHOIR C, KRELL HW, WEIDLE UH *et al.* Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation.

FEBS Lett 1997; 405: 157-162.

BARKLEY RA, BROWN AC, HANIS CL, KARDIA SL, TURNER ST, BOERWINKLE E. Lack of genetic linkage evidence for a trans-acting factor having a large effect on plasma lipoprotein(a) levels in African Americans.

J Lipid Res 2003; 44: 1301-1305.

BDEIR K, CANE W, CANZIANI G, CHAIKEN I, WEISEL J, KOSCHINSKY ML *et al.* Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. Blood 1999; 94 (6):2007-2019.

#### BECKER L, COOK PM, KOSCHINSKY ML.

Identification of sequences in apolipoprotein(a) that maintain its closed conformation: a novel role for apo(a) isoform size in determining the efficiency of covalent Lp(a) formation. Biochemistry 2004; 43 (31): 9978-9988.

#### BECKER L, COOK PM, WRIGHT TG, KOCHINSKY ML.

Quantitative evolution of the contribution of weak lysine-binding site present within apolipoprotein(a) kringle IV types 6-8 to lipoprotein(a) assembly. J Biol Chem 2004; 279 (4): 2679-2688.

#### BECKER L, WEBB BA, CHITAYAT S, NEISHEIM TG, KOCHINSKY ML.

A ligand-induced conformational change in apolipoprotein(a) enhances covalent Lp(a) formation.

J Biol Chem 2003; 278 (16): 14074-14081.

#### BELCZEWSKI AR, HO J, TAYLOR FB, BOFFA MB, JIA Z, KOCHINSKY ML.

Baboon lipoprotein(a) binds very weakly to lysine-agarose and fibrin despite the presence of a strong lysine binding site in apolipoprotein(a) kringle IV type 10. Biochemistry 2005; 44 (2): 555-564.

BELKIN AM, STEPP MA. Integrins as receptors for laminins.

Microsc Res Techn 2000; 51 (3): 280-301.

#### BELL E, IVARSSON B, MERRILL C.

Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*.

Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 1274-1278.

#### BERG K.

A new serum system in man: the Lp(a) system. Acta Pathol Microbiol Scand 1963; 59: 362-382.

#### BERGLUND L, RAMAKRISHNAN R.

Lioprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24 (12): 2219-2226.

### BERLINER JA, NAVAB M, FOGELMAN AM, FRANK JS, DEMER LL, EDWARDS PA

Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxydation, inflammation, and genetics.

Circulation 1995; 91 (9): 2488-2496.

#### BOFFA MB, MARCOVINA SM, KOCHINSKY ML.

Lipoprotein(a) as a risk factor for atherosclerosis and thrombosis: mechanistic insights from animal models.

Clin Biochem 2004; 37 (5): 333-343.

#### BOSMAN FT, STAMENKOVIC I.

Functional structure and composition of the extracellular matrix.

J Pathol 2003; 200 (4): 423-428.

#### BOTTALICO LA, KEESLER GA, FLESS GM, TABAS I.

Cholesterol loading of macrophages leads to marked enhancement of native lipoprotein(a) and apoprotein(a) internalisation and degradation.

J Biol Chem 1993; 268 (12): 8569-8573.

### BRUCKERT E, DAVIDOFF P, GRIMALDI A, TRUFFERT J, GIRAL P, DOUMITH R et al.

Increased serum levels of lipoprotein(a) in diabetes mellitus and their reduction with glycemic control.

JAMA 1990; 263 (1): 35-36.

### BRUNNER C, LOBENTANZ EM, PETHO-SCHRAMM A, ERNST A, KANG C, DIEPLINGER H et al.

The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells.

J Biol Chem 1996; 271 (50): 32403-32410.

BROOKS PC, STROMBLAD S, SANDERS LC, VON SCHALSCHA TL, AIMES RT, STETLER-STEVENSON WG et al.

Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction

with integrin alpha v beta 3.

Cell 1996; 85: 683-693.

BUECHLER C, ULLRIH H, RITTER M, PORSH-OEZCUERUEMEZ M, LACKNER KJ, BARLAGE S, et al.

Lipoprotein(a) up-regulates the expression of the plasminogen activator inhibitor 2 in human blood monocytes.

Blood 2001; 97: 981-986.

BUTLER GS, BUTLER MJ, ATKINSON SJ, WILL H, TAMURA T, VAN WESTRUM SS, et al.

The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase « receptor » regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study.

J Biol Chem 1998; 273: 871-880

### C, D

#### CALMARZA P, VELLA JC.

Lipids, lipoproteins and apolipoprotein(a) isoforms in type 2 diabetic patients. J Cardiovasc Risk 1999; 6 (3): 171-175.

CANDIDO AP, FERREIRA S, LIMA AA, NICOLATO RL, FREITAS SN, BRANDAO P $\mathit{et}$   $\mathit{al}$ 

Lipoprotein(a) as a risk factor associated with ischemic heart disease: Ouro Preto Study. Atherosclerosis 2006; in press.

#### CASTELLINO FJ, BEALS JM.

The genetic relationships between the kringles domains of human plasminogen, prothrombin, tissue plasminogen activator, urokinase and coagulation factor XII.

J Mol Evol 1987; 26 (4): 358-359.

CATALANO M, PERILLI E, CARZANIGA G, COLOMBO F, CAROTTA M, ANDREONI S.

Lp(a) in hypertensive patients.

J Hum Hypertens 1998; 12 (2): 83-89.

#### CHAIT A, WIGHT TN.

Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix.

Curr Opin Lipidol 2000; 11 (5): 457-463.

#### CHISOLM GM, HAZEN SL, FOX PL, CATHCART MK.

The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms.

J Biol Chem 1999; 274 (37): 25959-25962.

#### CHRISTENSEN U, IPSEN HH.

Steady-state kinetics of plasmin and trypsin-catalysed hydrolysis of a number of tripepetide-p-nitroanilides.

Biochem Biophys Acta 1979; 596 (2): 177-183.

### COLLOT-TEIXEIRA S, MARTIN J, McDERMOTT-ROE C, POSTON R, McGREGOR JL.

CD36 and macrophages in atherosclerosis.

Cardiovasc Res 2007; in press

## COZEN AE, MORIWAKI H, KREMEN M, DEYOUNG MB, DICHEK HL, SLEZIKI KI, et al.

Macrophage-targeted overexpression of urokinase causes accelerated atherosclerosis, coronary artery occlusions, and end premature death.

Circulation 2004; 109: 2129-2135.

#### CRAIG WY, NEVEUX LM, PALOMAKI GE, CLEVELAND MM, HADDOW JE.

Lipoprotein(a) as a risk factor for ischemic heart disease: metaanalysis of prospective studies.

Clin Chem 1998; 44 (11): 2301-2306.

## CSASZAR A, DIEPLINGER H, SANDHOLZER C, KARADI I, JUHAZS E, DREXEL H et al.

Plasma lipoprotein(a) concentration and phenotypes in diabetes mellitus.

Diabetologia 2000; 36 (1): 47-51.

#### DALESSANDRI KM.

Letter to the editor: multiple methods for reduction of Lipoprotein(a).

Atherosclerosis 2002; 163: 409-410.

#### DANESH J, COLLINS R, PETO R.

Lipoprotein(a) and coronary disease. Meta-analysis of prospective studies.

Circulation 2000; 102 (10): 1082-1085.

### DANIELSON KG, BARIBAULT H, HOLMES DF, GRAHAM H, KADLER KE, IOZZO RV.

Targeted disruption of decorine leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.

J Cell Biol 1997; 136 (3): 729-743.

## DART AM, LACOMBE F, YEOH JK, CAMERON JD, JENNINQS GL, LAUFER E *et al.* Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolaemia, coronary artery disease,

or cardiac transplant.

Lancet 1991; 338 (8762): 270-273.

### DESCHAMPS AM, YARBROUGH WM, SQUIRES CE, ALLEN RA, MC CLISTER DM, DOWDY KB et al.

Trafficking of the membrane type-1 matrix metalloproteinase in ischemia and reperfusion : relation to interstitial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity.

Circulation 2005; 111 (9): 1166-1174.

#### DEROSA G, CIERO AF, D'ANGELO A, GADDI A, CICARELLI L, PICINNI MN et al.

Effects of one year treatment with pioglitazone or rosiglitazone added to glimepiride on lipoprotein(a) and homocysteine concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: a multicenter, randomised, double-blind, controlled clinical trail. Clin Ther 2006; 28 (5): 679-688.

#### DINGEMANS KP, TELLING P, LAGENDIJK JH, BECKER AE.

Extracellular matrix of the human aortic media : an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media.

Anat Rec 2000; 258 (1): 1-14.

#### DOLLERY CM, LIBBY P.

Atherosclerosis and proteinase activation.

Cardiovasc Res 2006; 69: 625-635.

#### DURLACH V, GILLERY P, BERTIN E, TAUPIN JM, GRULET H, GROSS A et al.

Serum lipoprotein(a) concentrations in a population of 819 non-insulin-dependent diabetic patients.

Diabetes Metab 1996; 22 (5): 319-323.

### **E**, **F**, **G**

#### EITZMAN D, WESTRICK RJ, XU Z, TYSON J, GINSBURG D.

Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in mouse carotid artery.

Blood 2000; 96: 4212-4215.

#### EMONARD H, BELLON G, TROEBERG, BERTON A, ROBINET A, HENRIET P et al.

Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2. TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism.

J Biol Chem 2004; 279 (52): 54944-59951.

#### FAY WP, GARG N, SUNKAR M.

Vascular functions of the plasminogen activation system.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27: 454-460.

#### FELLY J, BARRY M, KEELING PW, WEIR DG, COOKE T.

Lipoprotein(a) in cirrhosis.

BMJ 1992; 304 (6826): 454-456.

#### FLEURY V, LIJNEN HR, ANGLES-CANO E.

Mechanisms of the enhanced intrinsic activity of single-chain urokinase-type plasminogen activator during ongoing fibrinolysis.

J Biol Chem 1993; 268 (25): 18554-18559.

#### FORD ES, GILES WH, DIETZ WH.

Prevalence of the metabolic syndrome among US adults : findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey.

JAMA 2002; 287 (3): 356-359.

#### FU L, JAMIESON DG, USHER DC, LAVI E.

Gene expression of apolipoprotein(a) within the wall of human aorta and carotid arteries. Atherosclerosis 2001; 158 (2): 303-311.

#### FUHRMAN B, VOLKOVA N, AVIRAM M.

Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase.

Atherosclerosis 2002; 161(2): 307-316.

#### FUJINO T, KATOU J, FUJITA M, OHTA T, HARADA T, HASEBE N, KIKUCHI K.

Relationship between serum lipoprotein(a) level and thrombin generation to the circadian variation in onset of acute myocardial infarction.

Atherosclerosis 2001; 155: 171-178.

#### FUJISAWA M, HARAMAKI R, MIYAZAKI H, IMAIZUMI T, OKUDA S.

Role of lipoprotein(a) and TGF-β1 in artherosclerosis of haemodialysis patients.

J Am Soc Nephrol 2000; 11 (10): 1889-1895.

#### FUJITA T, SAITO E, OHI H, YASUGI T, HATANO M.

Lipoprotein(a) predicts the risk if thrombogenic complications in nephrotic syndrome. Nephron 1992; 61 (1): 122.

#### GABEL BR, MAY LF, MARCOVINA SM, KOSCHINSKY ML.

Lipoprotein(a) assembly. Quantitative assessment of the role of apo(a) kringle IV types 2-10 in particle formation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 1559-1567.

#### GABEL BR, MCLEOD RS, YAO Z, KOSCHINSKY ML.

Sequences within the amino terminus of apoB100 mediate its no covalent association with apo(a).

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18 (11): 1738-1744.

#### GABEL BR, YAO Z, MCLEOD RS, YOUNG SG, KOSCHINSKY ML.

Carboxyl-terminal truncation of apolipoprotein B-100 inhibits lipoprotein(a) particle formation.

FEBS Lett 1994; 350 (1): 77-81.

#### GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, LIBBY P.

Increased expression of matrix mettalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.

J Clin Invest 1994; 94: 2493-2503.

#### GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, LIBBY P.

Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of humans atherosclerotic plaques.

J Clin Invest 1989; 94 (6): 2493-503.

#### GANNE F, VASSE M, BEAUDEUX JL, PEYNET J, FRANCOIS A, PAYSANT J, et al.

Increased expression of uPA and uPAR on monocytes by LDL and Lp(a) lipoproteins-Consequences for plasmin generation and monocyte adhesion.

Throm Haemost 1999; 81: 594-600.

## GARNOTEL R, RITTIE L, POITEVIN S, MONBOISSE JC, NGUYEN P, POTRON G et al.

Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD1lc-CD18, gp150-95).

J Immunol 2000; 164 (11): 5928-5934).

#### GARNOTEL R., ROUSSEL B., MONIER F., GILLERY P.

Unusually high concentrations of serum lipoprotein(a) in a child with nephrotic syndrome. Clin Nephrol 1998; 50: 334-335.

#### GARNOTEL R, ROUSSEL B, PENNAFORTE F, RANDOUX A, GILLERY P.

Changes in serum lipoprotein(a) levels in children with corticosensitive nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol 1996; 10: 699-701.

#### GAVISH D, AZROLAN V, BRESLOW JL.

Plasma Lp(a) concentration is inversely correlated with the ratio of kringle IV / kringle V encoding domains in the apo(a) gene.

J Clin Invest 1989; 84 (6): 2021-2027).

#### GAZZARUSO C, BRUNO R, PUJIA A, DE AMICI E, FRATINO P, SOLERTE SB et al.

Lipoprotein(a), apolipoprotein(a) polymorphism and coronary atherosclerosis severity in type 2 diabetic patients.

Int J Cardiol 2006; 108 (3): 354-358.

#### GILLERY P, MAQUART FX, BOREL JP.

Fibronectin dependence of the contraction of collagen lattices by human fibroblasts. Exp Cell Res 1986; 167: 29-37.

#### GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSEL WC, NAIRN R.

Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 1977; 36 (1): 1471-1479.

#### GREAVES DR, GORDON S.

Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors.

J Lipid Res 2005; 46: 11-20.

#### GUERRA R, YU Z, MARCOVINA S, PESHOK R, COHEN JC, HOBBS HH.

Lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) isoforms : no association with coronary artery calcification in The Dallas Heart Study.

Circulation 2005; 111 (12): 1471-1479.

#### GUPTAS S, PABLO AM, JIANG XC, WANG N, TALL AR, SCHINDLER C.

IFN-gamma potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice.

J Clin Invest 1997; 99 (11): 2752-2761.

### H, I, J

#### HABIB SS, ASLAM M.

Lipids and lipoprotein(a) concentrations in Pakistani patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Obes Metab 2004; 6 (5): 338-343.

#### HAFFNER SM, TUTTLE KR, RAINWATER DL.

Lack of change of lipoprotein(a) with improved glycemic control in subjects with type II diabetes.

Metabolism 1992; 41 (2): 116-120.

#### HANCOK MA, SPENCER CA, KOSCHINSKY ML.

Definition of the structural elements in plasminogen required for high-affinity binding to apolipoprotein(a): a study utilizing surface plasmin resonance.

Biochemistry 2004; 43 (38): 12337-12248.

#### HAQUE NS, ZHANG X, FRENCH DL, LI J, POON M, FALLON JT et al.

CC Chemokine I-309 is the principal monocyte chemoattractant induced by apolipoprotein(a) in human vascular endothelial cells.

Circulation 2000; 102 (7): 786-792.

### HAYASHI H, MIZUSHIMA N, YOSHINAGA H, KAWAMITSU H, MATSUDA S, TANOUE M et al

The relationship between lipoprotein(a) and low density lipoprotein receptors during the treatment of hyperthyroidism.

Horm Metab Res 1996; 28 (8): 384-387.

### HAYASHIDANI S, TSUTSUI H, IKEUCHI M, SHIOMI T, MATSUSAKA H, KUBOTA T et al.

Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285 (3): H1229-1235.

#### HERVIO L, DURLACH V, GIRARD-GLOBA A, ANGLES-CANO E.

Multiple binding with identical linkage: a mechanism that explains the effects of lipoprotein(a) on fibrinolysis.

Biochemistry 1995; 34 (41): 13353-13358.

#### HINEK A, KEELEY FW, CALLAHAN J.

Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin.

Exp Cell Res 1995; 220 (2): 312-324.

#### HOBBS HH, WHITE AL.

Lipoprotein(a): intrigues ans insights.

Curr Opin Lipidol 1999; 10 (3): 225-236.

#### HOBEIKA MJ, THOMPSON RW, MUHS BE, BROOKS PC, GAGNE PJ.

Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease.

J Vasc Surg 2007; 45: 849-857.

### HOLMER SR, HENGSTENBERG C, KRAFT HG, MAYER B, POLL M, KURZINGER S ot al

Association of polymorphisms of the apolipoprotein(a) gene with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction.

Circulation 2003; 107 (5): 696-701.

## HOLMES WE, PENNICA D, BLADER M, REY MW, GUENZLER WA, STEFFENS G et al.

Cloning and expression of the gene for pro-urokinase in Echerichia coli.

Biotechnology 1985; 3:923-929.

#### HOOVER GJ, MENHART N, MARTIN A, WARDER S, CASTELLINO FJ.

Amino acids of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen that stabilize its interaction with  $\omega$ -amino-acids.

Biochemistry 1993; 32 (41): 10936-10943.

#### HOYLAERTS M, RIJKEN D, LIJNENE HR, COLLEN D.

Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator.

J Biol Chem 1982; 257: 2912-2919.

#### HUBY T, CHAPMAN J, THILLET J.

Pathophysiological implication of the structural domains of lipoprotein(a). Atherosclerosis 1997; 133 (1): 1-6.

#### HUO Y, HAFEZI-MOGHADAM A, LEY K.

Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectine connecting segment-1 in monocytes rolling and adhesion on early atherosclerosis lesions.

Circ Res 2000; 87 (2): 153-159.

#### HURT E, BONDJERS G, CAMEJO G.

Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived-macrophages.

J Lipid Res 1990; 31 (3): 443-454.

#### HUSEMANN J, LOIKE JD, KODAMA T, SILVERSTEIN ST.

Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine miroglia to fibrillar beta-amyloid.

J neuroimmunol 2001; 114:142-150.

#### ICHINOSE A.

Multiple members of the plasminogen-apolipoprotein(a) gene family associated with thrombosis.

Biochemistry 1992; 31 (12): 3113-3118.

#### JACOB MP.

JALKANEN J, LEPPANEN P, NARVANENE O, GREAVES DR, YLA-HERTTUALA S.

L'élastine : préparation, caractérisation, structure, biosynthèse et catabolisme.

C R Seances Soc Biol Fil 1993; 187 (2): 166-181.

#### JALKANEN J, LEPPANEN P, NARVANENE O, GREAVES DR, YLA- HERTTUALA S.

Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted decoy human macrophage scavenger receptor (SR-AI) in LDL receptor knock-out mice.

Atherosclerosis 2003; 169: 95-103.

### JAUHIAINEN M, KOSKINEN P, EHNHOLM C, FRICK MH, MANTTARI M, MANNINEN V et al.

Lipoprotein(a) and coronary heart disease risk : a nested case-control study of the Helsinki Heart Study participants.

Atherosclerosis 1991; 89 (1): 59-67.

JERUMS G, ALLEN TJ, TSALAMANDRIS C, AKDENIZ A, SINKA A, GILBERT R *et al.* Relationships of progressively increasing albuminuria to apoprotein(a) and blood pressure in type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetic patients.

Diabetologia 1993; 36 (10): 1037-1044.

#### JUHAN-VAGUE I, ALESSI MC, VAGUE P.

Increased plasma plasminogen inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis

atherothrombosis. Diabetologia 1991; 34: 457-462.

### K, L

## KANG C, DOMINGUEZ M, LOYAU S, MIYATA T, DURLACH V, ANGLES-CANO E. Lp(a) particules mold fibrin-binding properties of apo(a) in size dependant manner: a study

with different-length recombinant apo(a), native Lp(a), and monoclonal antibody.

Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 2002; 22 (7): 1232-1238.

### KEENE DR, SAN ANTONIO JD, MAYNE R, MC QUILLAN DJ, SARRIS G, SANTORO SA, et al

Decorin binds near the C terminus of type I collagen.

J Biol Chem 2000; 275 (29): 21801-21804.

#### KEESLER GA, LI Y, SKIBA PJ, FLESS GM, TABAS I.

Macrophage foam cell lipoprotein(a)/apoprotein(a) receptor. Cell-surface localization, dependece of induction on new protein sythesis, and ligand specificity.

Arterioscler Thromb 1994; 14 (8): 538-541.

#### KIELTY CM, GRANT ME.

The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix.

In : Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects. 2nd Ed.

Dir. Royce PM, Steinmann B.

New York: Wiley-Liss Eds; 2002: 159-221

## KLAUSEN IC, SCHMIDT EB, LERVANG HH, GERDES LU, DITZEL J, FAERGEMAN O.

Normal lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) isoforms in patients with insulindependent diabetes mellitus.

Eur J Clin Invest 1992; 22 (8): 538-541.

#### KLEINER DE, STETLER-STEVENSON WG.

Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases.

Anal Biochem 1994; 218 (2): 325-329.

#### KLOUCHE M., ROSE-JOHN S., SCHMIEDT W., BHAKDI S.

Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation.

Circulation 2000; 101: 1799-1805.

#### KO SH, SONG KH, AHN YB, YOO SJ, SON HS, YOON KH et al.

The effect of rosiglitazone on serum lipoprotein(a) levels in korean patients with type 2 diabetes mellitus.

Metabolism 2003; 52: 731-734.

#### KOSCHINSKY ML, COTE GP, GABEL B, VAN DER HOEK YY.

Identification of the cysteine residue in apolipoprotein(a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein B-100.

J Biol Chem 1993; 268 (26): 19819-19825.

#### KOSCHINSKY ML, MARCOVINA SM.

The relationship between lipoprotein(a) and the complications of diabetes mellitus.

Acta Diabetol 2003; 40 (2): 65-76.

#### KOSCHINSKY ML, MARCONIVA SM.

Evaluation of lipoprotein(a) as a prothrombotic factor: progress from bench to bedside.

Curr Opin Lipidol 2003; 14 (4): 361-366.

#### KOSCHINSKY ML, MARCOVINA SM.

Structure-function relationships in apolipoprotein(a): insights into lipoprotein(a) assembly and pathogenicity.

Curr Opin Lipidol 2004; 15 (2): 167-174.

#### KRAFT HG, KOCHL S, MENZEL HJ, SANDHOLZER C, UTERMANN G.

The apolipoprotein(a) gene : a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration.

Hum Genet 1992; 90 (3): 220-230.

### KRAFT HG, LINGENHEL A, KOCHL S, HOPPICHLER F, KRONENBERGF, ABE A et al.

Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16 (6): 713-719.

## KRAMER-GUTH A, GREIBER S, PAVENSTADT H, QUASCHNING T, WINKLER K, SCHOLLMEYER P et al.

Interaction of native and oxidized lipoprotein(a) with human mesangial cells and matrix.

Kidney Int 1996; 49 (5): 1250-1261.

#### KRATZIN H, ARMSTRONG VW, NIEHAUS M, HILSHMANN A, SEIDEL D.

Structural relationship of an apolipoprotein(a) phenotype (570 kDa) to plasminogen: homologous kringle domains are linked by carbohydrate-rich regions.

Biol Chem Hoppe Seyler 1987; 368 (12): 1533-1544.

#### KRAUSS RM.

Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk.

Curr Opin Lipidol 1994; 5 (5): 339-349.

### KRONENBERG F, AUINGER M, TRENKWALDER E, IRSIGLER K, UTERMANN G, DIEPLINGER H.

Is apolipoprotein(a) a susceptibility gene for type I diabetes mellitus and related to longterm survival ?

Diabetologia 1999; 42 (8): 1021-1027.

#### KUNG AW, PANG RW, LAUDER I, LAM KS, JANUS ED.

Changes in serum lipoprotein(a) and lipids during treatment of hyperthyroidism.

Clin Chem 1995; 41 (2): 226-231.

# KUNJATHOOR VV, FEBBRAIO M, PODREZ EA, MOORE KJ, ANDERSSON L, KOEHN S $\it{et~al.}$

Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages.

J Biol Chem 2002; 277: 49982-49988.

#### LACKNER C, BOERWINKLE E, LEFFERT C, RAHMIG T, HOBBS HH.

Molecular basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field electrophoresis.

J Clin Invest 1991; 87 (6): 2153-2161.

#### LACRAZ S., NICOD L.P., CHICHEPORTICHE R., WELGUS H.G., DAYER J.M.

IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes.

J Clin Invest 1995; 96 (5): 2304-2310.

#### LEFEVRE F, GARNOTEL R, GEORGES N, GILLERY P.

Modulation of collagen metabolism by the nucleolar protein fibrillarin.

Exp Cell Res 2001; 271 (1): 84-93.

#### LI C, ZHANG J, JIANG Y, GUREWICH V, CHEN Y, LIU JN.

Urokinase-type plasminogen activator up regulates its own expression by endothelial cells and monocytes via the u-PAR pathway.

Thromb Res 2001; 103, 221-232.

#### LIJNEN HR, COLLEN D.

Mechanisms of physiological fibrinolysis.

Bailleres Clin Heamatol 1995; 8 (2): 277-290.

#### LIJNEN HR, VAN HOEB B, LUPU F, MOONS L, CARMELIET P, COLLEN D.

Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18 (7): 1035-1045.

LONGENECKER J, KLAG MJ, MARCOVINA SM, POWE NR, FINK NE, GIAULLI F et al.

Small apolipoprotein(a) size predicts mortality in end stage renal disease the CHOICE study. Circulation 2002; 106 (22): 2812-2818.

#### LONGO GM, XIONG W, GREINER TC, ZHAO Y, FIOTTI N, BAXTER BT.

Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. J Clin Invest 2002; 110 (5): 625–32.

#### LOSCALZO J, WEINFELD M, FLESS GM, SCANU AM.

Lipoprotein(a), fibrin binding and plasminogen activation.

Atherosclerosis 1990; 110(2): 240-245.

#### LUC G, BARD JM, ARVEILER D, FERRIERES J, EVANS A, AMOUYEL P et al.

Lipoprotein(a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME study.

Atherosclerosis 2002; 163 (2): 377-384.

#### LUIKART S, MASRI M, WAHL D, HINKEL T, BECK JM, GYETKO MR et al.

Urokinase is required for the formation of mactinin, an  $\alpha$ -actinin fragment that promotes monocyte/macrophage maturation.

Biiohim Biophys Acta 2002; 1591: 99-107.

#### LUKE MM, KANE JP, LIU DM, ROWLAND CM, SHIFFMAN D, CASSANO J, et al.

A polymorphism in the protease-like domain of apolipoprotein(a) is associated with severe coronary artery disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27 (9): 2030-2036.

#### LUNDSTAM U, HERLITZ J, KARLSSON T, LINDEN T, WIKLUND O.

Serum lipids, lipoprotein(a) level, and apolipoprotein(a) isoforms as prognostic markers in patients with coronary heart disease.

J Intern Med 2002; 251 (2): 111-118.

#### LUSIS AJ.

Atherosclerosis.

Nature 2000; 407 (6801): 233-241.

# LUTTUN A, LUPU F, STORKEBAUM E, HOYLAERTS MF, MOONS L, CRAWLEY J. et al.

Lack of plasminogen activator inhibitor-1 promotes growth and abnormal matrix remodeling of advanced atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-deficient mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 499-505.

MC CORMICK SP, LINTON MF, HOBBS HH, TAYLOR S, CURTISS LK, YOUNG SG.

Expression of human apolipoprotein B90 in transgenic mice. Demonstration that apolipoprotein B90 lacks the structural requirements to form lipoprotein (a).

J Biol Chem 1994; 269 (39): 24284-24289.

#### MALLAT Z, HEYMES C, OHAN J, FAGGIN E, LESECHE G, TEDGUI A.

Expression of interleukin-10 in human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19 (3): 611-616.

### MARCOVINA SM, ALBERS JJ, WIJSMAN E, ZHANG Z, CHAPMAN NH, KENNEDYH.

Differences in Lp(a) concentrations and apo(a) polymorphs between black and white Americans.

J Lipid Res 1996; 37 (12): 2569-2585.

#### MARCOVINA SM, KOSCHINSKY ML.

Lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) size: a synergistic role in advanced atherosclerosis?

Circulation 1999; 100 (11): 1151-1153.

#### MARGOLIASH E, FROHWIRT N.

Spectrum of horse-heart cytochrome c.

Biochem J 1959; 71 (3): 570-572.

#### MEISEL SR, XU XP, EDGINTON T S, DIMAYUGA P, KAUL S, LEE S et al.

Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity.

Atherosclerosis 2002; 161 (1), 35-43.

#### MENG Q, MALINOVSKII V, HUANG W, HU YJ, CHUNG L, NAGASE H et al.

Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate.

J Biol Chem 1999; 274(15): 10184–10189.

#### MENSHIKOV M, ELIZAROVA E, PLAKIDA K, TIMOFEEVA A,

#### KHASPEROV G, BEABEALASHVILLI R et al.

Urokinase upregulates matrix metalloproteinases-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis.

Biochem J 2002; 367: 833-839.

#### MEYRIER A, HILL GS, SIMON P.

Ischemic renal diseases: new insights into old entities.

Kidney int 1998; 54 (1): 2-13.

#### MILES LA, FLESS GM, LEVIN EG, SCANU AM, PLOW EF.

A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a).

Nature 1989; 339 (6222): 301-303.

#### MINE S, TABAT Y, FUJISAKI, IIDA T NOGUCHI N.

Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1 dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway.

Atherosclerosis 2002; (2): 281-288.

#### MOLNAR J, FONG KS, HE QP, HAYASHI K, KIM Y, FONG SF et al.

Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins.

Biochim Biophys Acta 2003; 1647 (1-2): 220-224.

#### MOORE KJ, FREEMAN MW.

Scavenger receptors in atherosclerosis Beyong Lipid Uptake.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1702-1711.

# MUKHINA S, STEPANAOVA V, TRAKTOUEV D, POLIAKOV A, BEABEALASHVILLY R, GURSKY Y, et al.

The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringles domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis.

J Biol Chem 2000; 275: 16450-16458.

# MURASE T, OKUBO M, AMEMIYA-KUDO M, HIRAGA T, OKA J, SHIMADA M, *et al.* Impact of markedly elevated serum lipoprotein(a) levels (>=100mg/dL) on the risk of coronary heart disease.

Metabolism 2007; 56 (9): 1187-1191.

# MURPHY JE, TEDBURY PR, HOMER-VANNIASNKAM S, WALKER JH, PONNAMBALAM S.

Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors.

Atherosclerosis 2005; 182: 1-15.

#### NAGASE H, VISSE R, MURPHY G.

Structure and fiction of matrix metalloproteinases and TIMPs.

Cardiovasc Res 2006; 69 (3): 562-576.

#### NAMIKI M, KAWASHIMA S, YAMASHITA T, OZAKI M, HIRASE T, ISHIDA T et al.

Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion : synergium with hypercholesterolemia.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22 (1): 115-120.

#### NEELE DM, DE WIT EC, PRINCEN HM.

Insulin suppresses apolipoprotein(a) synthesis by primary cultures of cynomologus monkey hepatocytes.

Diabetologia 1999; 42 (1): 41-44.

#### NEWBY AC.

Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture.

Physiol Rev 2005; 85 (1): 1-31.

NGUYEN TT, ELLEFSON RD, HODGE DO, BAILEY KR, KOTTKE TE, ABU-LEBDEH HS.

Predictive value of electrophoretically detected lipoprotein(a) for coronary heart disease and cerebrovascular disease in a community-based cohort of 9936 men and women.

Circulation 1997; 96 (15): 1390-1397.

### O, P

#### OPDENAKKER G, VAN DEN STEEN PE, VAN DAMME J.

Gelatinase B: a tuner and amplifier of immun functions.

Trends Immunol 2001; 22: 571-579.

#### PACKARD CJ.

Understanding coronary heart disease as a consequence of defective regulation of apolipoprotein B metabolism.

Curr Opin Lipidol 1999; 10 (3); 237-244.

PAULTRE F, TUCK CH, BODEN-ALBALA B, KARGMAN DE, TODD E, JONES J *et al.* Relation of apo(a) size to carotid atherosclerosis in an elderly multiethnic population. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22 (1): 141-146.

PEDRENO J, FERNANDEZ R, BALLESTER A, JORNET A, USON M, CANELA J *et al.* Lack of association of serum lipoprotein(a) levels with type-2 diabetes mellitus in patients with angiographically defined coronary artery disease.

Int J Cardiol 2000; 74 (2-3): 159-167.

#### DE LA PENA-DIAZ A, IZAGUIRRE-AVILA R, ANGLES-CANO E.

Lipoprotein Lp(a) and atherothrombotic disease.

Arch Med Res 2000; 31 (4): 353-359.

#### PENG DQ, ZHAO SP, WANG JL.

Lipoprotein(a) and apolipoprotein E&4 as independent risk factors in ischemic stroke. J Cardiovasc Risk 1999; 6 (1) 1-6.

#### POLLARD TD, EARNSHAW WC.

Biologie cellulaire.

Paris: Elsevier Science Inc; 2004

#### PRIVITERA S, PRODY CA, CALLAHAN JW, HINEK A.

The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein.

J Biol Chem 1998; 273 (11): 6319-6326.

#### PROCKOP OJ, KIVIRIKKO KI.

Hydroxyproline and the metabolism of collagen.

In: Gould BS (ed). Treatise on collagen.

New York Academic Press 1968; 215-46.

### Q, R, S

#### RAGAB MS, SELVARAJ P, SGOUTAS DS.

Oxidized lipoprotein(a) induces cell adhesion molecule Mac-1 (CD 11b) and enhances adhesion of the monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells.

Atherosclerosis 1996; 123 (1-2): 103-113.

RAHMAN MN, BECKER L, PETROUNEVITCH V, HILL BC, JIA Z, KOSCHINSKY ML. Comparative analyses of the lysine binding site properties of apolipoprotein(a) kringles IV types 7 and 10.

Biochemistry 2002; 41 (4): 1149-1155.

RAMOS-DESIMONE N, HAHN-DANTONA E, SIPLEY J, NAGASE H, FRENH DL, QUIGLEY JP.

Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion.

J Biol Chem 1999; 274(19): 13066-13076.

#### RIBAULT A, DUROU MR, LETELLIER C, WOJCIK F, POIRIER JY, RUELLAND A.

Determination of lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) molecular weights in diabetic patients.

Diabetes Metab 2000; 26 (2): 107-112.

#### RICARD-BLUM S, RUGGIERO F, VAN DER REST M.

The collagen superfamily.

In: Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly.

Topics in Current Chemistry – volume 247.

Dir. Brinckman J, Notbohm H, Muller P.

Berlin-Eidelberg: Springer-Derlag Ed.; 2005: 35-84.

#### RIGOTTI A., ACTON SL, KRIEGER M.

The class B scavenger receptors SR-BI and D36 are receptors for anionic phospholipids. J Biol Chem 1995; 270: 16221-16224.

### ROMANIC AM, HARRISON SM, BAO W, BURNS-KURTIS CL, PICKERING S, GU J et al.

Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9.

Cardiovasc Res 2002; 54 (3): 549-58.

#### ROSBY O, BERG K.

LPA gene: interaction between the apolipoprotein(a) size ("kringle IV" repeat) polymorphism and a pentanucleotide repeat polymorphism influences Lp(a) lipoprotein level.

J Intern Med 2000; 247 (1): 139-152.

#### ROSENBLOOM J, ABRAMS WR, MEHAM R.

Extracellular matrix 4: the elastic fiber.

FASEB J 1993; 7 (13): 1208-1218.

#### ROSSERT J, BRIDEAU G, TERRAZ C, LEJARD V.

Régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I.

Flammarion, actualités néphrologiques, 2003.

# SAUVAGE M, HINGLAIS N, MANDET C, BADIER C, DESLANDES F, MICHEL JB $\it et$ $\it al.$

Localization of elastin mRNA and TGF- $\beta$ 1 in rat aorta and caudal artery as a function of age. Cell Tissue Res 1998 ; 291 (2) : 305-314.

# SCOLARI F, TARDANICO R, ZANI R, POLA A, VIOLA BF, MOVILLI E, MAIORCA R. Cholesterol crystal embolism: a recognizable cause of renal disease.

Am J Kidney Dis 2000; 36: 1089-1109

# SEED M, HOPPICHLER F, REAVELEY D, MC CARTHY S, THOMPSON GR, BOERWINKLE E et al.

Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia.

N Engl J Med 1990; 322 (21): 1494-1499.

## SHA J, MAC CULLOUGH B, HART E, NASSIR F, DAVIDSON NO, HOOVER-PLOW J.

Apo(a) promotes thrombosis in a vascular injury model by a mechanism independent of plasminogen.

J Thromb Haemost 2005; 3(10): 2281-2289.

#### SHAPIRO SD, KOBAYASHI DK, WELGUS HG.

Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages: regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1.

J Biol Chem 1992; 267: 13890-13894.

### SOLFRIZZI V, CAPURSO C, CLACICCO AM, D'INTRONO A, FONTANA C, CAPURSO SA et al

Efficacy and tolerability of combined treatment with L-carnitine and simvastatin in lowering lipoprotein(a) serum levels in patients with type 2 diabetes mellitus.

Atherosclerosis 2006; 188 (21): 455-461.

#### SOMERVILLE RPT, OBLANDER SA, APTE SS.

Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.

Genome Biol 2003; 4: 216-227.

### SOTIRIOU N, ORLOVA VV, AL-FAKHRI N, IHANUS E, ECONOMOPOULOU M, ISERMANN B, et al.

Lipoprotein(a) in atherosclerotic plaques recruits inflammatory cells through interaction with Mac-1 integrin.

FASEB J 2006; 20(3): 559-561.

### SOULAT T, LOYAU S, BAUDOIN V, DURLACH V, GILLERY P, GARNOTEL R et al.

Evidence that modifications of Lp(a) in vivo inhibit plasmin formation on fibrin. A study with individual plasma presenting natural variations of Lp(a).

Thromb Haemost 1999; 82 (1): 121-127.

#### STEINBERG D.

Oxydative modification of LDL and atherogenesis.

Circulation 1997; 95 (4): 1062-1071.

#### STEPANOVA VV, TKACHUK VA.

Urokinase as a multidomain protein and polyfunctionnal cell regulator.

Biochem 2002; 67: 109-118.

#### STERNLICHT MD, WERB Z.

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.

Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17: 463-516

#### STRICKLAND DK, KOUNNAS MZ, ARGRAVES WS.

LDL receptor-related protein (LRP): a multiligand receptor for lipoprotein(a) and proteinase catabolism.

FASEB J 1995; 19 (10): 890-898.

#### SYROVETS T, THILLET J, CHAPMAN MJ, SIMMET T.

Lipoprotein(a) is a potent chemoattractant for human peripheral monocytes.

Blood 1997; 90 (5): 2027-2036.

### **T**, **U**, **V**

TARNOW L, ROSSING P, NIELSEN FS, HANSEN BV, DYERBERG J, PARVING HH. Increased plasma apolipoprotein(a) levels in IDDM patients with diabetic nephropathy. Diabetes Care 1996; 19 (12): 1382-1387.

### TAUPIN JM, DURLACH V, HASSAIM M, GILLERY P, JOLLY D, BOIRIE Y, GRULET H, LEUTENEGGER M.

Lipoprotéine (a) et diabète : relations à propos de 224 observations.

Diabete Metab 1993; 19 (2): 250-256.

#### TEDGUI A, MALLAT Z.

Atherosclerotic plaque formation.

Rev Prat 1999; 49 (19): 2081-2086.

TESTA R, MARCOVINA SM.

The rate of plasmin formation after in vitro clotting is inversely related to lipoprotein(a) plasma levels.

Int J Clin Lab Res 1999; 29: 128-132.

### TORZEWSKI M, SURIYAPHOL P, PAPROTKA K, SPATH L, OHSENHIRT V, SCHMITT A, et al.

Enzymatic modification of low Density Lipoprotein in the arterial wall, a new role for plasmin and matrix metalloproteinases in atherogenesis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 2130-2136.

#### TULINSKY A, PARK CH, MAO B, LLINAS M.

Lysine/fibrin binding sites of kringles modeled after the structure of kringle 1 of prothrombin.

Proteins 1988; 3(2): 85-96.

#### TZOTZAS T, KRASSAS GE, KONSTANTIDINIS T, BOUGOULIA M.

Changes in lipoprotein (a) levels in overt and subclinical hypothyroidism before and during treatment.

Thyroid 2000; 10 (9): 803-808.

#### VALI Z, PATTHY L.,

Location of the intermediate and high affinity ω-aminocarboxylic acid-binding sites in human plasminogen.

J Biol Chem 1982; 257 (4): 2104-2110.

VAN DEER HOEK YY, WITTEKOEK ME, BEISIEGEL U, KASTELEIN JJ, KOSCHINSKY ML.

The apolipoprotein(a) kringle IV repeats which differ from the major repeat kringle are present in variably-sized isoforms.

Hum Mol Genet 1993; 2(4): 361-366.

#### VAN ZONNEVELD AJ, VEERMAN H, PANNEKOEK H.

On the interaction of the finger and kringle 2-domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by \varepsilon-aminocaproic acid.

J Biol Chem 1986; 261 (30): 14214-14218.

#### VAN ZONNEVELD AJ, VEERMAN H, PANNEKOEK H.

Autonomous funtions of strutural domains on tissue-type plasminogen activator.

Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4670-4674.

#### VRHOVSKI B, WEISS AS.

Biochemistry of tropoelastin.

Eur J Biochem 1998; 258 (1): 1-18.

### **W**, **X**, **Y**, **Z**

WAHN F, DANIEL V, KRONENBERG F, OPELZG, MICHALK DV, QUERFELD U. Impact of apolipoprotein(a) phenotypes on long-term renal transplant survival. J Am Soc Nephrol 2001; 12 (5): 1052-1058.

#### WAKABAYASHI I, MASUDA H.

Lipoprotein (a) as a determinant of arterial stiffness in elderly patients with type 2 diabetes mellitus.

Clin Chim Acta 2006; 373 (1-2): 127-131.

WANNER C, RADER D, BARTENS W, KRAMER J, BREWER HB, SCHOLLMEYER P et al.

Elevated plasma lipoprotein(a) in patients with the nephrotic syndrome.

Ann Intern Med 1993; 119 (4) 263-269.

WEITZ JI, BYRNE J, CLAGETT GP, FARKOUH ME, PORTER JM, SACKETT DL *et al.* Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: a critical review

Circulation 1996; 94 (11): 3026-3049.

#### WHO (World Health Organisation)

Multinational study of vascular disease in diabetes: prevalence of small vessel and large vessel disease in diabetic patients from 14 centres.

Diabetologia 1985; 28 Suppl: 615-640.

#### WILLENBROCK F, MURPHY G.

Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases.

Am J Respir rit Care Med 1994; 150: 165-170.

#### WILLIAMS KJ, TABAS I.

The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15 (5): 551-561.

#### WITZTUM JL, STEINBERG D.

Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.

J Clin Invest 1991; 80 (6); 1785-1792.

#### WOOD GC, KEECH MK.

The formation of fibrils from collagen solutions. 1. The effect of experimental conditions:

Kinetic and electron microscopy studies.

Biochem J 1960; 75: 588-598.

#### XIA J, MAY LF, KOSCHINSKY ML.

Characterization of the basis of lipoprotein(a) lysine binding heterogeneity.

J Lipid Res 2000; 41 (10): 1578-1584.

### XUE S, GREEN MA, LOGRASSO PV, BOETTCHER BR, MADISON EL, CURTISS LK et al.

Comparison of the effects of apo(a) kringle IV-10 and plasminogen kringles on the interactions of lipoprotein(a) with regulatory molecules.

Thromb Haemost 1999; 81 (3): 428-435.

#### ZORIO E, FALCO C, ARNAU MA, ESPANA F, OSA A, RAMON LA et al.

Lipoprotein (a) in young individuals as a marker of the presence of ischemic heart disease and the severity of coronary lesions.

Haematologica 2006; 91 (4): 562-565.