

Université de Montréal

Régulation de l'expression du récepteur "Scavenger" dans les cellules THP-1 et les  
monocytes sanguins humains par le complexe AP-1/ets et l'IFN- $\gamma$

par

Elena Priceputu

Département de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.)  
en sciences biomédicales

Septembre 1999

© Elena Priceputu



2011-2012

W  
4  
U58  
2000  
V.046

Université de Montréal

Régulation de l'expression du récepteur "G-protein" dans les cellules THP-1 et les monocytes sanguins humains par le composé AP-1 et JNK

par  
Étienne Péroquet  
Département de sciences pharmaceutiques  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître en Sciences (M.Sc.)  
en sciences pharmaceutiques



Étienne Péroquet  
M.Sc. Pharm.

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Régulation de l'expression du récepteur "Scavenger" dans les cellules THP-1 et les monocytes sanguins humains par le complexe AP-1/ets et l'IFN- $\gamma$

présenté par:

Elena Priceputu

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Trang Hoang	présidente du jury
Jean Davignon	directeur de recherche
Lise Bernier	codirectrice de recherche
Louise Brissette	membre de jury

Mémoire accepté le ..... 2000-03-09 .....

## SOMMAIRE

Les macrophages humains expriment à leur surface cellulaire à la fois le récepteur classique des lipoprotéines de faible densité (LDL) et le récepteur "scavenger" de type A (SR-A) capable de capturer les lipoprotéines modifiées. Contrairement au récepteur des LDL dont l'expression est réduite par l'accumulation de cholestérol, l'expression du SR (SR) dans les monocytes-macrophages n'est pas régulée par des niveaux élevés de cholestérol (Goldstein, 1979). Par ses capacités de lier et d'internaliser les LDL modifiées, le SR-A a un rôle critique dans la transformation des cellules musculaires lisses et des macrophages en cellules spumeuses et l'apparition des lésions d'athérosclérose. Il a été démontré récemment qu'une surexpression du récepteur "scavenger" chez des sujets normolipidémiques peut mener à l'apparition de xanthes (Giry et al., 1996). L'expression du SR-A est régulée par un grand nombre de cytokines. Le M-CSF "macrophage colony-stimulating factor" active la transcription du SR par l'intermédiaire des facteurs de transcriptions AP-1 (protéine activatrice-1) et ets (facteur E26 spécifique à la transformation) qui sont les activateurs les plus importants du SR (Wu et al., 1994). Par contre l'IFN- $\gamma$  (interféron-gamma) est connu comme ayant un effet inhibiteur sur l'expression du SR (Geng et Hansson, 1992). Des expériences menées dans notre laboratoire démontrent qu'une exposition à court-terme des monocytes ou des cellules THP-1 dans une phase précoce de différenciation à l'IFN- $\gamma$  augmente l'ARNm et l'activité du SR. Compte tenu de l'importance du complexe AP-1/ets dans la régulation du gène SR dans cellules THP-1 et de l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du gène SR, nous avons étudié la régulation du gène SR par ces deux facteurs.

Nos travaux montrent que l'expression du récepteur scavenger est contrôlée par le complexe AP-1/ets et par l'IFN- $\gamma$  à la fois dans les cellules THP-1 et dans les monocytes circulants. Dans les cellules THP-1, l'expression des facteurs cJun, JunB et ets2 et leur liaison sur le site AP-1/ets du promoteur du SR sont corrélées avec l'induction du SR. L'expression du SR dans les cellules THP-1 se produit très rapidement, entre 9 et 18 heures après la mise en culture en présence de phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA).

Dans les monocytes sanguins humains mis en culture en présence de sérum autologue (SA) l'induction du SR se produit après 24 heures et augmente graduellement durant 7 jours. L'expression et l'activation des facteurs AP-1 et ets2 sont aussi liées à l'induction du SR. L'interprétation statistique de nos résultats révèle l'existence d'une corrélation positive entre l'expression des facteurs cJun et ets2 et l'expression du SR dans les monocytes et pas de corrélation pour JunB.

L'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR dans les cellules THP-1 et les monocytes humains est dépendant de l'état de maturation cellulaire, et de la durée du traitement. L'IFN- $\gamma$  ajouté au milieu dès la mise en culture a un effet positif sur la transcription du SR à la fois dans les cellules THP-1 et dans les monocytes humains. Son effet stimulateur ne se manifeste pas au niveau de l'expression des facteurs de transcription Jun et ets2 mais agit au niveau de l'activation de ces facteurs. L'activation et la liaison des facteurs AP-1/ets sur leur site du promoteur du SR sont plus rapides en présence d'IFN- $\gamma$ . Nous démontrons pour la première fois l'existence d'un site GAS (site activé par l'IFN- $\gamma$ ) dans le promoteur du SR situé de -133 à -125 pb, en amont du site d'initiation de la transcription, tout près du site AP-1/ets. L'occupation de ce site survient très tôt après la mise en culture des cellules THP-1 et des monocytes humains en présence de l'IFN- $\gamma$ , aussi bien que l'occupation du site AP-1/ets. L'IFN- $\gamma$  agit en synergie avec le PMA ou le SA dans l'induction du SR. Après 24 heures l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur le SR est inhibiteur dans les monocytes humains et diminué dans les cellules THP-1. Nous suggérons comme explication de l'effet positif de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR, la coopération entre les sites GAS et AP-1/ets rapprochés l'un de l'autre dans le promoteur du SR. Un phénomène semblable a été démontré dans le promoteur du gène codant pour l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 (Bugno et al., 1995). L'inhibition de l'expression du SR qu'on observe après 24 heures pourrait être expliquée par une compétition entre les facteurs STAT1 (transducteur de signal et activateur de la transcription 1) activés par l'IFN- $\gamma$ , et les facteurs AP-1/ets, pour une quantité limitée de co-activateurs CBP/p300 (protéine de liaison de CREB/protéine 300) tel que suggérée par le groupe de Horvai, 1997.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DE FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE D'ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>I - INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II - RÉVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>3</b>
<b>1 - DÉFINITION DU RÉCEPTEUR "SCAVENGER" A (SR-A).....</b>	<b>3</b>
1.1 - Description du gène et de la protéine SR-A .....	3
1.2 - Structure du promoteur et expression du gène du SR .....	5
1.3 - Rôle et implication du SR.....	7
1.3.1 - Rôle du SR dans l'athérosclérose .....	8
1.3.2 - L'effet du stress oxydatif dans l'athérosclérose.....	9
1.4 - Rôle du SR dans la maturation des monocytes en macrophages.....	10
1.4.1- Définition générale des monocytes-macrophages .....	10
1.4.2- Contrôle du développement de macrophages.....	11
1.5 - Contrôle de l'expression du gène du SR.....	13
<b>2 - DÉFINITION DU COMPLEXE AP-1( activator protein-1).....</b>	<b>17</b>
2.1 - Caractérisation du complexe AP-1 .....	17
2.2 - Régulation du complexe AP-1 .....	21
2.3 - Rôle du complexe AP-1 .....	23

<b>3 - RÔLE DE L'IFN-<math>\gamma</math> DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DU SR.....</b>	<b>25</b>
3.1 - Description de la voie de l'IFN-gamma.....	25
3.2 - Intéraction de la voie de STAT avec d'autres voies de signalisation.....	27
3.3 - Implication de l'IFN- $\gamma$ dans la régulation de l'expression du gène du SR ...	29
<b>4 - CO-ACTIVATEURS ET ACTIVATEURS DE LA TRANSCRIPTION .....</b>	<b>31</b>
4.1 - Co-activateurs CBP/p300.....	31
4.2 - Activateurs de la transcription Ets .....	33
<b>5 - LES INTÉGRINES EXPRIMÉES PAR LES MONOCYTES.....</b>	<b>35</b>
<b>6 - BUT DE LA PRÉSENTE ÉTUDE.....</b>	<b>40</b>
<b>III - METHODES.....</b>	<b>41</b>
1 - Cultures cellulaires.....	41
2 - Analyse RT-PCR "reverse transcription-polymerase chain reaction" .....	42
3 - Extractions nucléaires .....	43
4 - EMSA "electrophoretic mobility shift assay" .....	44
5 - Phénotype de cellules THP-1.....	45
6 - SDS-PAGE "sodium dodecylsulfate–polyacrilamide gel electrophoresis" et Immunobuvardage .....	46
7 - Graphique et statistique .....	47
<b>IV - RÉSULTATS.....</b>	<b>48</b>
<b>1 - COMPARAISON DE L'EXPRESSION DU GÈNE DU SR DANS LES CELLULES THP-1 ET LES MONOCYTES SANGUINS HUMAINS .....</b>	<b>48</b>
1.1 - Contrôle de l'expression du gène du SR dans les cellules THP-1.....	48
1.2 - Contrôle de l'expression du gène du SR dans les monocytes circulants humains.....	51

<b>2 - L'EFFET DE L'IFN-<math>\gamma</math> SUR LA TRANSCRIPTION DU GÈNE DU SR EN ASSOCIATION AVEC LE PMA DANS LES CELLULES THP-1 ET AVEC LE SA DANS LES MONOCYTES HUMAINS .....</b>	<b>54</b>
2.1 - L'effet de l'IFN- $\gamma$ sur la transcription du gène du SR dans les cellules THP-1 .....	54
2.2 - L'effet de l'IFN- $\gamma$ sur la transcription du gène du SR dans les monocytes circulants humains.....	58
<b>3 - EXPRESSION DES INTÉGRINES DANS LES CELLULES THP-1 .....</b>	<b>62</b>
<b>V - DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>84</b>
<b>VI - RÉFÉRENCES .....</b>	<b>96</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>.xv</b>

**LISTE DE FIGURES**

<b>FIGURE II - 1.</b>	Structure du gène du SR (A) et de la protéine SR (B) .....	5
<b>FIGURE II - 2.</b>	Structure du promoteur du gène du SR.....	6
<b>FIGURE II - 3.</b>	Dimérisation (A) et liaison sur l'ADN (B) des protéines bZIP .....	18
<b>FIGURE II - 4.</b>	La cascade de MAPK "mitogen activated protein kinases".....	23
<b>FIGURE IV - 1.</b>	Expression du récepteur "scavenger" dans les cellules THP-1..	63
<b>FIGURE IV - 2.</b>	Expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 dans les cellules THP-1 .....	64
<b>FIGURE IV - 3.</b>	EMSA démontrant l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du gène du SR dans les cellules THP-1 .....	65
<b>FIGURE IV - 4.</b>	Expression du facteur ets2 et changement du rapport d'expression de cJun/JunB dans les cellules THP-1 .....	66
<b>FIGURE IV - 5.</b>	Expression du récepteur "scavenger" dans les monocytes sanguins humains .....	67
<b>FIGURE IV - 6.</b>	Expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains .....	68
<b>FIGURE IV - 7.</b>	EMSA démontrant l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR dans les monocytes sanguins humains.....	69
<b>FIGURE IV - 8.</b>	Expression des facteurs de transcription cJun/JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains .....	70

<b>FIGURE IV - 9.</b> Corrélation entre l'expression du SR et l'expression des facteurs cJun, JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains.....	71
<b>FIGURE IV - 10.</b> Effet de l'IFN- $\gamma$ sur l'expression du récepteur "scavenger" dans les cellules THP-1 .....	72
<b>FIGURE IV - 11.</b> L'expression du facteur de transcription STAT1 $\alpha$ dans les cellules THP-1.....	73
<b>FIGURE IV - 12.</b> Effet de l'IFN- $\gamma$ sur l'expression des facteurs de transcription Jun/JunB et ets2 dans les cellules THP-1 .....	74
<b>FIGURE IV - 13.</b> EMSA démontrant l'occupation du site GAS (de -133 à -125 pb) du promoteur du gène du SR dans les cellules THP-1 .....	75
<b>FIGURE IV - 14.</b> Effet du PMA et l'IFN- $\gamma$ sur l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR dans les cellules THP-1.....	76
<b>FIGURE IV - 15.</b> Phénotype des cellules THP-1 (A et B) .....	77
<b>FIGURE IV - 15.</b> Phénotype des cellules THP-1 (C) .....	78
<b>FIGURE IV - 16.</b> Effet de l'IFN- $\gamma$ de sur l'expression du récepteur "scavenger" dans les monocytes sanguins humains .....	79
<b>FIGURE IV - 17.</b> Effet de l'IFN- $\gamma$ sur l'expression de facteurs cJun/JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains .....	80
<b>FIGURE IV - 18.</b> EMSA démontrant l'effet de l'IFN- $\gamma$ sur l'occupation du site GAS du promoteur du gène du SR dans les monocytes sanguins humains.....	81

<b>FIGURE IV - 19.</b> EMSA démontrant l'effet de l'IFN- $\gamma$ sur l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du gène du SR dans les monocytes sanguins humains.....	82
<b>FIGURE IV - 20.</b> SDS-PAGE démontrant la présence d'intégrines RGD dans les cellules THP-1 .....	83
<b>FIGURE V - 1.</b> Nouvelle structure fonctionnelle du promoteur du gène du SR .	94
<b>FIGURE V - 2.</b> Voies de signalisation impliquées dans l'expression du SR.....	95

**LISTE DE TABLEAU**

<b>TABLEAU III-1.</b> Oligonucléotides utilisés pour RT-PCR.....	43
<b>TABLEAU III-2.</b> Oligonucléotides utilisés pour EMSA .....	45

## LISTE D'ABRÉVIATION

AP-1,	protéine activatrice-1
ADNc,	ADN complémentaire
ATF2,	Facteur de transcription activateur 2
bZip,	Glissière de leucines
CBP,	Protéine de liaison de CREB
CD 36,	Batterie de gènes de différenciation 36
CRE,	Élément de réponse à l'AMPcyclique
CREB,	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
C/EBP,	Protéine de liaison à l'amplificateur de la boîte CAAT
CKII,	Caséine kinase II
DIF,	Facteur induit par la différenciation
DMEM,	Dulbecco's modified Eagle's médium
DTT,	Dithiothréitol
EDTA,	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA,	Acide éthylène bis (oxyéthylèneniotrilo) tétraacétique
EGF,	Facteur de croissance épidermique
EMSA,	Expérience de retardement sur gel
ERK,	Kinase régulée par les signaux externes
Ets2,	Facteur E26 spécifique à la transformation
Fc $\gamma$ RIIB2,	Récepteur Fc II B2
Fc $\gamma$ RI,	Récepteur Fc
FH,	Hypercholestérolémie familiale
GAPDH,	Glycéraldéhyde -3-phosphate déshydrogénase
GAS,	Site d'activation par l'interféron gamma
hGBP,	Protéine humaine liant le GTP
GM-CSF,	Granulocyte-macrophage colony-stimulating facteur
GR,	Récepteur des glycocorticoïdes
Grb2,	Protéine-2- liée au récepteur du facteur de croissance
Hepes,	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérasineéthanesulfonique
HOX,	Gène de sélection homéotique

hMIIA,	Métallothionéine IIA humaine
ICAM,	Molécule d'adhérence cellulaire intercellulaire
ICAM-1,	Molécule-1 d'adhérence intercellulaire
IFN- $\gamma$ ,	Interféron-gamma
IFNGR1,2	Récepteur 1,2 de l'interféron-gamma
IL-1,	interleukine-1
IP-10,	Protéine-10 induite par l'interféron- gamma
JAK,	Kinase Janus
L27,	Protéine ribosomale L27
Leu-CAM,	Molécule d'adhérence cellulaire des leucocytes
LDL,	Lipoprotéine de faible densité
LDL-ox,	LDL-oxydée
LDL-ac,	LDL- acétylée
LFA-1	Antigène associé à la fonction des leukocytes.
LPS,	lipopolysaccharide
Lyso-PC,	Lysophosphatidylcholine
MAPK,	Protéine kinase activée par mitogène
MARCO,	Récepteur de macrophages avec structure collagénouse
M-CSF,	Macrophage Colony-stimulating factor
MKK,	MAPK kinase
MKKK,	MKK kinase
MyoD,	Produit du gène régulateur de la myogénèse
NF-kB,	Facteur nucléaire kappa-B
NGF,	Facteur de croissance neuronal
PAI-1,	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS,	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR,	Réaction de polymérisation en chaîne
PKC,	Protéine kinase C
PMA,	Phorbol-12-myristate-13-acétate
PPAR ,	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PP,	Phosphatase des protéines
pp125 Fak,	Kinase des adhérences focales pp125
PU-1,	Facteur-1 riche en purine

RAR,	Récepteur de l'acide rétinoïque
RasGAP,	Protéine d'activation de la GTPase Ras
RGD,	Arg-Gly-Asp
RNAsin,	Inhibiteur de ribonucléase
RT-PCR,	Transcription inverse-Réaction de polymérisation en chaîne
SA,	Sérum autologue
SAPK,	Protéine kinase activée par le stress
SH2,	src homology 2
SP1,	Specificity protein 1
SRE,	Élément de la réponse au sérum
SMC,	Cellules musculaires lisses
SREC,	Récepteur "scavenger" exprimé par les cellules endothéliales
SDS,	Sodium dodécyl-sulfate
SDS-PAGE,	Électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS
SIE,	Élément de réponse au STAT
SOS,	Son-of-sevenless
SR,	Récepteur "Scavenger"
SR-A I, II,	Récepteur "Scavenger" de type AI et II
STAT,	Transducteur de signal et activateur de la transcription
T3R,	Récepteur de l'hormone thyroïde.
TBP,	Protéine liant la boîte TATA
TBS,	Tampon Tris - saline
TCF,	Ternary complex factor
TNF- $\alpha$ ,	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TPA,	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
TRE,	Élément de réponse au TPA
VCAM-1,	Molécule d'adhérence cellulaire vasculaire
VLA-4, 5,	Antigènes-4, 5 de l'activation très tardive
UV,	Radiation ultraviolette

**À mes enfants**

**À mon époux**

**À mes grands-parents**

## I - INTRODUCTION

Les macrophages dérivés de monocytes circulants ont une capacité phagocytaire et sécrétoire élevée et jouent un rôle très important dans le processus d'athérogenèse. À cause de leur capacité d'accumuler les lipoprotéines modifiées par l'oxydation, les macrophages se transforment en cellules spumeuses qui sont impliquées dans l'apparition des lésions précoces d'athérosclérose (Ross 1993). La captation et l'internalisation par les macrophages des lipoprotéines modifiées comme les LDL (Lipoprotéine de faible densité)-oxydées et acétylées sont faites par l'intermédiaire des récepteurs scavenge. À cause de ses fonctions importantes dans la transformation des macrophages en cellules spumeuses, le SR de type A, une protéine transmembranaire avec des propriétés d'adhérence, est la cible de plusieurs études.

La démonstration par notre groupe de recherche qu'une surexpression du SR chez des sujets normolipidémiques est liée à une accumulation élevée de lipides modifiés, une maturation précoce des monocytes et l'apparition de xanthomes (Giry et al., 1996) a augmenté notre intérêt pour l'étude du SR. La surexpression du SR pourrait être la cause ou la conséquence de la maturation précoce des macrophages chez les sujets étudiés. Une étude plus approfondie du contrôle de l'expression du SR durant la maturation des monocytes en macrophages nous est apparue très importante pour mieux expliquer l'association de ce récepteur avec la différenciation des macrophages et avec l'apparition éventuelle de l'athérosclérose.

Peu de choses sont connues concernant la régulation de l'expression du SR durant le processus de transformation des monocytes en macrophages. Les résultats parfois contradictoires qui ont été rapportés, concernant l'effet de différents stimuli externes sur la régulation du SR, nous ont amené à étudier le contrôle de l'activation de la transcription du SR par les facteurs AP-1, l'ets2 et par l'IFN- $\gamma$ .

Les facteurs de transcription AP-1 et ets2 coopèrent positivement dans l'activation de la transcription du SR (Wu et al., 1994), tandis que l'IFN- $\gamma$  serait un inhibiteur de l'expression du SR et de l'apparition des cellules spumeuses (Geng et Hansson, 1992). Par contre, des études des chercheurs de notre laboratoire ont démontré que l'IFN- $\gamma$  a un effet stimulateur sur l'expression du SR chez les monocytes et les cellules THP-1 et un effet inhibiteur chez les macrophages. Toutes ces observations nous ont conduits à l'idée d'approfondir l'étude des mécanismes de la régulation de l'expression du SR par le complexe AP-1/ets2 et par l'IFN- $\gamma$ , à la fois dans les monocytes et dans les macrophages.

L'effet additif de stimuli comme les facteurs du sérum et l'IFN- $\gamma$ , qui sont importants pour la régulation du SR dans ces cellules, pourrait conduire à une surexpression du SR et à une maturation précoce des monocytes en macrophages et éventuellement à l'apparition des cellules spumeuses. Le but de ce mémoire est de caractériser les facteurs impliqués dans l'expression du SR, suite à la stimulation simultanée de deux voies de signalisation, l'une, la voie des MAPK (protéine kinase activée par mitogène) qui active les facteurs AP-1/ets2 et l'autre, la voie de l'IFN- $\gamma$ , qui active le facteur STAT1 $\alpha$ . L'étude a été faite en comparant la transcription par RT-PCR (transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne) et l'activation par EMSA (expérience de retardement sur gel) des facteurs impliqués dans la régulation du SR, à différents temps de différenciation des cellules THP-1 et des monocytes sanguins humains.

## II. REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

### 1. DÉFINITION DU RÉCEPTEUR "SCAVENGER" A (SR-A)

Parmi les récepteurs de surface qui sont induits durant la différenciation des monocytes en macrophages, se retrouvent les récepteurs nommés génériquement récepteurs "scavengers" à cause de leur capacité de lier, internaliser et dégrader un grand spectre de molécules polyanioniques (Kodama et al., 1990; Krieger et Herz, 1994; Brown et Golstein, 1983). L'expression du SR n'est pas limitée aux macrophages car les fibroblastes, les cellules musculaires lisses (SMC) et les cellules endothéliales peuvent être induites à exprimer le SR (Pitas, 1990 ; Daugherty et al., 1997).

Ces dernières années, beaucoup de progrès ont été faits dans l'identification et la caractérisation des récepteurs "scavenger" qui lient préférentiellement les lipides modifiés. À ce jour, environ 13 récepteurs de la famille "scavenger" sont connus : SR-A de type I et II (SR-AI/II), le récepteur "scavenger" de type B I, le récepteur "scavenger" de type C I, Fc $\gamma$ RIIB2 (Récepteur Fc II B2), le récepteur "scavenger" exprimé par les cellules endothéliales (SREC), le récepteur "scavenger" des macrophages avec structure collagèneuse (MARCO), le récepteur CD36 (Batterie de gènes de différenciation 36), etc. Ils ont comme caractéristique commune la liaison et la dégradation des molécules toxiques pour la cellule, mais ils diffèrent par leur expression spécifique tissulaire et cellulaire, leur structure ou la spécificité de leur ligand (revue par Steinbrecher, 1999).

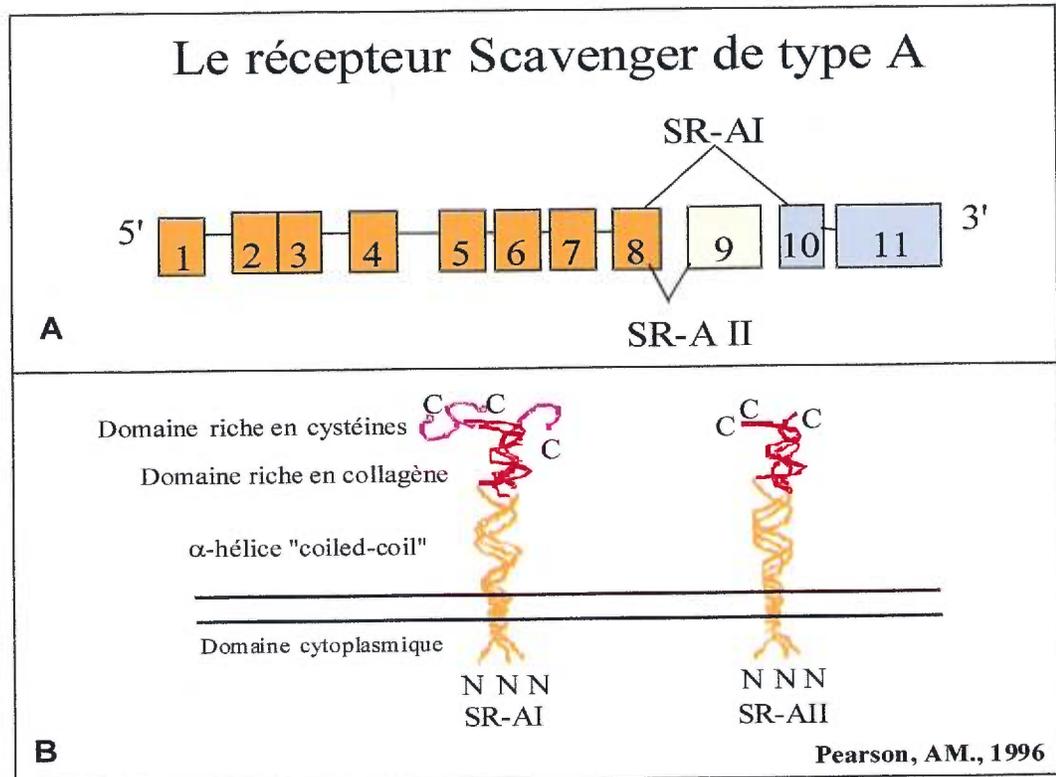
#### 1.1. Description du gène et de la protéine SR-A

Le récepteur SR-A est le prototype des récepteurs "scavenger" dont la structure et fonction ont été élucidées. Le gène du récepteur "scavenger" A, a été cloné initialement chez les bovins (Kodama et al., 1988), et après chez la souris (Freeman et al., 1990), le lapin et chez l'humain (Matsumoto et al., 1990; revue par

Steinbrecher, 1999). Le gène du SR humain est localisé sur le chromosome 8 et comporte deux formes appelées type I et II, qui proviennent du même transcrit primaire par épissage alternatif. Le gène comprend l'ADN de 60 Kpb divisé en 11 exons. Les exons 1-8 sont communs aux deux formes. Le type II contient l'exon 9 substitué par les exons 10 et 11 dans le type I. Le type I codé par un ARNm de 4 kb contient 10 exons codant pour 453 acides aminés dont 110 acides aminés forment la partie C-terminale riche en cystéine. Le type II codé par 3,2 kb d'ARNm, contient 9 exons codant pour 349 acides aminés. Les 17 acides aminés de la partie C-terminale de l'exon 9 ne contiennent pas de cystéine (Emi et al., 1993; Aftring et Freeman, 1995), (figure II-1A).

Le récepteur "scavenger" AI/II est une glycoprotéine transmembranaire trimérique qui comprend six domaines. Le domaine I comprend la partie N-terminale cytoplasmique codée par l'exon 2, le domaine II est la partie transmembranaire (exon 3), le domaine III "spacer" est formé de 6-7 sites de N-glycosylation, le domaine IV est une région  $\alpha$ -hélice "coiled-coil" qui médie la trimérisation (exons 4 et 5), et le domaine V riche en collagène qui comprend le site de liaison du ligand (exons 6 et 8) (Emi et al., 1993). Les domaines IV et V semblent être pliés l'un sur l'autre. À pH 4, ils sont dépliés ce qui suggère une importance pour la dissociation du ligand à l'intérieur des lysosomes (figure II-1B). Le rôle physiologique du domaine VI, riche en cystéine pour le SR-A type I et sans cystéine pour le SR-A type II, n'est pas connu, mais il semble avoir une importance, parce qu'il est conservé parmi tous les membres de la famille des récepteurs "scavenger" (revue par Steinbrecher, 1999).

La structure de la protéine SR présente une homologie des acides aminés de 70% pour les 4 espèces où elle a été identifiée, ce qui suggère une remarquable conservation (Kodama et al., 1988; Ashkenas et al., 1993).

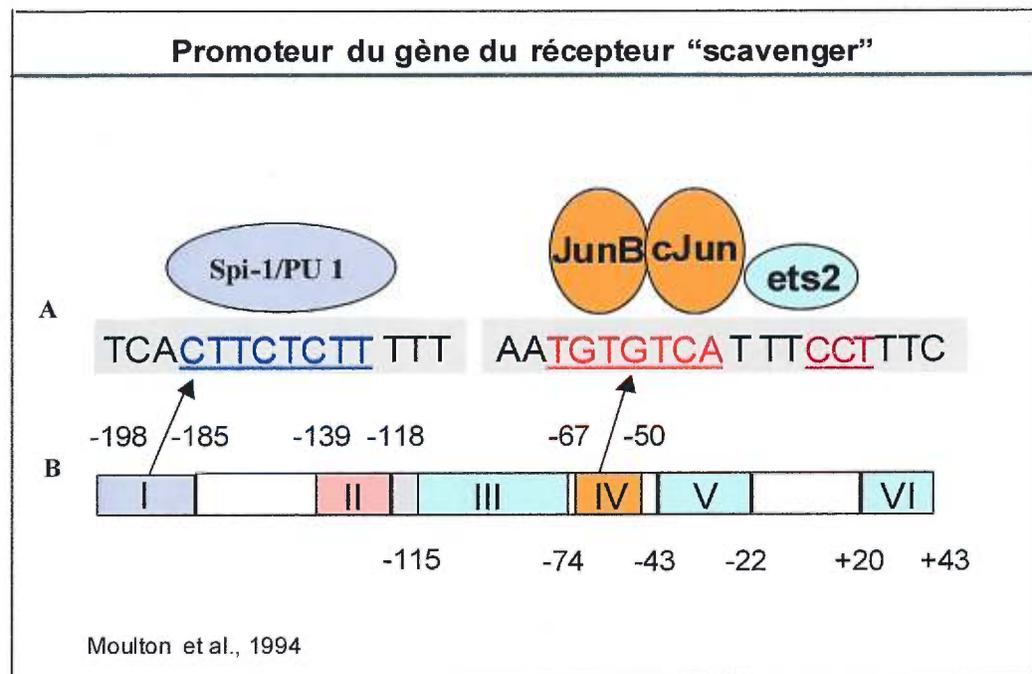


**Figure II.1-** Structure du gène du SR (A) et de la protéine SR (B).

## 1.2. Structure du promoteur du SR et expression du gène du SR

Le promoteur et la région en amont du promoteur du gène du SR ont été isolés chez les bovins et chez l'humain par le groupe de C. Glass en 1994. Ils ont rapporté que le gène du SR ne contient pas de boîte TATA et que l'initiation de la transcription serait facilitée par l'existence de plusieurs sites régulateurs regroupés en amont du site de l'initiation de la transcription. Une région de 245 pb du promoteur joue un rôle important dans la régulation de la transcription du SR et dans l'expression préférentielle dans les monocytes-macrophages. Il a été démontré par des techniques de mutations et de "DNase I footprinting" que le contrôle positif est détenu par deux éléments, l'un situé de  $-185$  à  $-198$  pb du site d'initiation de la transcription (région I), médié par les facteurs de transcription PU-1/Spi-1 et l'autre situé de  $-46$  à  $-70$  pb (région IV), médié par les facteurs de transcription AP-1/ets (Moulton et al., 1994; Wu et la., 1994), (figure II-2).

Les protéines du complexe AP-1/ets incluant c-Jun, JunB et ets2 sont des facteurs de transcription qui coopèrent positivement et sont essentiels pour l'expression du SR dans les monocytes-macrophages durant le processus de maturation (Wu et al., 1994). Dans les cellules musculaires lisses, le rôle de PU-1/Spi-1 est réduit et le complexe cJun/AP-1 coopère avec le facteur C/EBP (Protéine de liaison à l'amplificateur de la boîte CAAT) pour l'activation de la transcription du SR face au stress oxydatif (Mietus-Snyder et al., 1998).



**Figure II.2-** Structure du promoteur du gène du SR.

- A. Séquence des sites de liaisons des facteurs PU-1/Spi-1 et AP-1/ets  
 B. Domaines du promoteur du gène du SR

L'expression du récepteur "scavenger" A de type I et II est généralement restreinte aux monocytes-macrophages, mais les fibroblastes de lapin, et les cellules musculaires lisses aortiques du lapin et de l'humain peuvent être induites à exprimer le SR-A (Pitas, 1990; Bickel and Freeman, 1992). Récemment l'ARNm du SR-AI/II a été identifié dans les cellules endothéliales aortiques de lapin (Daugherty et al., 1997).

L'expression est à un niveau basal dans les monocytes circulants et est fortement augmentée lors de la différenciation en macrophages (Fogelman et al., 1981; Freeman et al., 1991). Des estimations de l'expression in vivo pour les deux isoformes conduisent à des résultats différents. Le type I est exprimé préférentiellement durant la maturation des monocytes humains (Geng et al., 1994), tandis que la lignée cellulaire des macrophages de souris exprime la forme II (Ashkenas et al., 1993). Chez les sujets hyperlipidémiques le niveau du SR-A de type I est proportionnel au niveau des lipoprotéines contenant l'apoB (apoprotéine B) et au niveau de cholestérol alors que le type II n'a pas de variabilité transcriptionnelle (Villanova et al., 1996), ce qui suggère une régulation sélective du SR par le niveau du cholestérol plasmique. Par ailleurs dans les monocytes-macrophages humains, les ARNm pour les deux isoformes du SR sont diminués par l'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide (LPS) mais l'effet est plus prononcé sur la forme II (Dufva et al., 1995).

### **1.3. Rôle et implication du SR**

Le SR a une spécificité prononcée pour la liaison de multiples macromolécules polyanioniques, d'hydrates de carbone, d'endotoxines virales et de lipides modifiés comme ceux contenus dans les LDL-oxydées et les LDL-acétylées (Lougheed et al., 1997; revue par Steinbrecher 1999). Les LDL-modifiées sont les ligands préférés du SR. En 1993, Zhang et al. ont rapporté que l'apoB des LDL natives n'est pas un ligand pour le SR et que seulement la modification de la charge positive du groupe  $\epsilon$ -aminé du résidu lysine confère une capacité de liaison des LDL au SR, et que toute protéine ayant une densité spécifique et une lysine modifiée appropriée pourrait être un ligand pour le SR.

Les macrophages phagocytent les agents pathogènes (Suzuki et al., 1997), et enlèvent les débris cellulaires. En même temps, l'expression du SR à la surface des macrophages permet la captation des lipoprotéines altérées (Krieger et al., 1994), suggérant la participation du SR à la défense cellulaire. Par l'internalisation

des LDL modifiées le SR-AI/II représente une importante voie endocytaire qui cause l'accumulation des lipides dans les monocytes-macrophages et conduit à la formation des cellules spumeuses trouvées dans les lésions athéroscléreuses précoces (Brown et Goldstein, 1983; Steinberg et al., 1989). Récemment, il a été démontré que le récepteur "scavenger" jouerait un rôle dans l'adhérence des monocytes (Fraser et al., 1993), et que la surexpression du SR déterminerait l'augmentation de l'adhérence des monocytes et une maturation précoce en macrophages (Giry et al., 1996).

### **1.3.1. Rôle du SR dans l'athérosclérose**

L'athérosclérose représente un processus qui contribue à la pathogénie de l'infarctus du myocarde, la gangrène et la perte des fonctions aux extrémités. L'athérogenèse consiste en l'accumulation de lipides dans la paroi artérielle conduisant à la formation de stries graisseuses. Cette accumulation est accompagnée d'une infiltration par des macrophages et des lymphocytes en réponse aux dommages des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle. La réponse inflammatoire-fibro-proliférative aux multiples effets délétaires se traduit par l'apparition des lésions athéroscléreuses avancées susceptibles de produire l'occlusion artérielle (Ross, 1993).

Quand les monocytes pénètrent dans l'espace sous-endothélial, ils se transforment en cellules phagocytaires "scavenger" (macrophages), cellules qui sécrètent des cytokines et qui sont capables d'ingérer les lipides modifiés par l'oxydation ou par d'autres modifications enzymatiques athérogènes. Suite à l'accumulation de lipides modifiés comme ceux des LDL oxydées et des LDL acétylées par l'intermédiaire du récepteur "scavenger", les macrophages et les cellules musculaires lisses se transforment en cellules riches en corps lipidiques, nommées cellules spumeuses (Daniel-Lamazière et al. 1997; Steinberg et al. 1989). La formation des cellules spumeuses est un phénomène précoce caractéristique de l'athérosclérose. L'élévation du cholestérol plasmatique ou des LDL joue un rôle de tout premier plan dans l'étiologie de l'athérosclérose mais une

proportion importante de sujets coronariens présentent des taux de cholestérol acceptables (Lamarche et Lewis 1998), ce qui suggère qu'un grand nombre d'autres facteurs de risque participent dans le processus athérogène.

### 1.3.2. L'effet du stress oxydatif dans l'athérosclérose

La transformation la plus fréquemment observée pour les LDL demeure la peroxydation par les radicaux libres des acides gras polyinsaturés présents dans les LDL. Cette transformation entraîne aussi des modifications au niveau de l'apoB100 et une augmentation des charges négatives portées par la LDL. Les LDL natives sont internalisées par le récepteur LDL. Le récepteur LDL ne permet pas une accumulation significative de cholestérol intracellulaire car il est contrôlé par un mécanisme de rétroinhibition qui s'ajuste en fonction du contenu cellulaire en cholestérol (Goldstein, 1979).

Les LDL modifiées sont captées par le récepteur "scavenger" des macrophages et des cellules musculaires lisses. Ce récepteur n'étant pas soumis à un contrôle de rétroinhibition, il permet donc l'accumulation d'une quantité substantielle de cholestérol intracellulaire causant la transformation de ces cellules en cellules spumeuses. Sakai et al. (1998) ont démontré que les LDL-oxidées agissent comme un facteur promoteur de la croissance des macrophages *in vitro*. Un des composants des LDL-oxidées, la lysophosphatidylcholine joue un rôle important dans l'induction de la prolifération des macrophages. Ce phénomène se produit par la captation des LDL-oxidées par le SR-A I/II.

Les LDL oxidées agissent aussi au niveau de l'endothélium qui produit des molécules favorisant l'adhérence des monocytes et leur migration à l'intérieur de l'espace subendothélial. Au niveau des macrophages, les LDL-oxidées vont réduire la motilité et favoriser leur rétention dans la paroi artérielle. Le stress oxydatif stimule aussi la sécrétion de M-CSF, le facteur de croissance qui stimule l'expression du récepteur "scavenger" et augmente la quantité d'ARNm, sa stabilité et l'activité du SR. Ceci entraîne l'accumulation de cholestérol estérifié à

l'intérieur des macrophages et des cellules musculaires lisses et leur transformation en cellules spumeuses (Mietus-Snyder et al., 1997; De Kimpe et al., 1998). Des résultats récents démontrent que d'autres facteurs de risques métaboliques sont impliqués dans l'étiologie de l'athérosclérose et de la coronaropathie. L'hypertriglycéridémie associée à une baisse des lipoprotéines de haute densité (HDL) et à une obésité abdominale ou viscérale et l'insulinorésistance sont des phénotypes hautement athérogènes (Lamarche et Lewis, 1998).

#### **1.4. Rôle du SR dans la maturation des monocytes en macrophages**

##### **1.4.1. Définition générale des monocytes-macrophages**

Les monocytes circulants représentent les précurseurs des populations de macrophages et de cellules dendritiques. Ils jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, le remodelage des tissus dans la guérison des plaies ou dans la réponse aux dommages locaux comme l'athérosclérose, l'inflammation et l'infection (Schmitz et al., 1997).

Durant la myélopoïèse, des signaux extracellulaires, tels les facteurs de croissance, les interleukines et les hormones, régulent l'expression de facteurs de transcription importants pour l'expression des gènes clés, dans le processus de différenciation terminale d'une lignée cellulaire spécifique (Ogawa, 1993; revue par Valledor et al., 1998). Les monocytes sont en général des cellules plus petites que leurs précurseurs, mais elles ont une grande capacité phagocytaire, un système lysosomal développé, avec un grand nombre d'enzymes hydrolytiques et des mitochondries. Les monocytes quittent la moelle osseuse et migrent dans les vaisseaux périphériques où ils perdent leur capacité proliférative (revue par Valledor et al., 1998). Les monocytes circulants se transforment en macrophages. S'ils ont la même origine, leur fonction pourtant est différente, dépendant du tissu où ils résident (Ogawa, 1993 ; Hamilton, 1993).

La maturation des monocytes circulants en macrophages est corrélée à un programme génétique de différenciation qui implique une multitude d'événements cellulaires et l'activation de la transcription d'un grand nombre de gènes de phase aiguë et de phase tardive (Wu et al., 1994). Chacun de ces gènes a une expression spécifique durant certaines étapes de la maturation des monocytes et contribuent de façon particulière au développement normal des macrophages.

#### **1.4.2. Contrôle du développement des macrophages**

Grâce à la manipulation de nombreuses lignées cellulaires et à l'analyse des souris transgéniques, les recherches ont conduit à l'identification de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans divers stages de la différenciation des macrophages. En effet, le programme génétique qui conduit à la différenciation des monocytes est représenté par une multitude de facteurs de transcription qui trans-activent d'autres gènes importants pour l'acquisition du phénotype de macrophage.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la maturation des monocytes qui interviennent dans diverses phases de la différenciation. Parmi ceux-ci, on trouve PU-1 "purine rich-1", un facteur de transcription membre de la famille ets proto-oncogène qui lie la séquence GAGGAA (boîte PU). Il a un rôle critique dans la différenciation des cellules myéloïdes en macrophages ou dans la survie des cellules précurseurs pluripotentes, mais il n'est pas important pour l'engagement de la lignée myéloïde. PU-1 est important dans la trans-activation de certains gènes impliqués dans l'acquisition du phénotype monocyttaire. PU-1 induit aussi l'expression des molécules d'adhérence CD11b ( $\alpha$ M) et CD18 ( $\beta$ 2) qui forment ensemble le récepteur MAC-1 qui médie l'adhérence des monocytes à l'endothélium et aussi la transmission de certains signaux ou l'expression de CD14 - le récepteur des lipopolysacharides (revue par Valledor, 1998). Le facteur de transcription PU-1 et d'autres facteurs de la famille ets ont un rôle important dans l'expression du récepteur "scavenger" (Moulton et al., 1994).

Les trois membres de la famille AP-1, les protéines junB, JunD et cJun sont induites dès le début de la différenciation des monocytes en macrophages dans les cellules M1 (revue par Valledor 1998). L'expression de protéines Jun et Fos et la formation d'un complexe AP-1 fonctionnel durant la maturation des monocytes, semblent être important pour l'induction de la différenciation terminale en macrophages (Szabo et al., 1991, 1994). Une coopération entre les protéines AP-1, ets2 et la forme active de H-ras semble avoir le rôle le plus important dans l'expression du SR et la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages quand ils sont traités au PMA. Le PMA remplace le signal qui normalement agit à la surface cellulaire au niveau du récepteur de la tyrosine kinase (RTK) et déclenche la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC), (Wu et al., 1994).

Les protéines C/EBP représentent des facteurs de transcription qui coopèrent avec PU-1 pour l'expression du récepteur GM-CSF "Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor" et M-CSF "Macrophage-Colony-Stimulating factor" dans les cellules myéloïdes pluripotentes en déterminant l'engagement vers la ligne monocyttaire. Il semble y avoir des fonctions distinctes dans diverses phases de la différenciation des macrophages (revue par Valledor, 1998).

Certains membres de la famille STAT, comme STAT3 et DIF "Differentiation-Induced Factor" contrôlent la différenciation terminale des monocytes. Le domaine SH2 "SRC homology 2" médie la transduction du signal intracellulaire et il est critique pour l'homo et l'hétérodimérisation des protéines et la liaison à la séquence TTCC (G/C) GGAA présente dans l'ADN du site activé par l'IFN- $\gamma$ . L'interféron- $\gamma$  qui exerce un effet antiviral et antiprolifératif dans plusieurs types cellulaires coopère avec d'autres cytokines pour coordonner différentes phases de l'activation des macrophages et semble avoir un effet inhibiteur sur l'expression du SR dans les macrophages (Young et Hardy 1995; Geng et Hansson 1992).

Les co-activateurs nucléaires CBP/p300 seraient aussi impliqués dans la régulation des deux voies de signalisation JAK/STAT "Janus Kinase/STAT", et Ras/AP-1 durant le développement des macrophages (Horvai et al., 1997).

### **1.5. Contrôle de l'expression du gène du SR**

Les cytokines comme l'interféron- $\gamma$ , le "Tumor necrosis factor- $\alpha$ " (TNF- $\alpha$ ), le PMA et les facteurs de croissance M-CSF et GM-CSF sont des régulateurs de l'expression du SR (revue par Steinbrecher, 1999). Le traitement des monocytes au M-CSF conduit à l'augmentation de l'ARNm du SR et des protéines SR (Clinton et al., 1992; Ishibashi et al., 1990). Le M-CSF agit par l'intermédiaire du complexe AP-1 et des facteurs de transcription ets. Le M-CSF active les récepteurs à l'activité tyrosine kinase déclenchant des réponses pléiotropiques incluant l'activation de la voie de PKC (Imamura et al., 1990), qui à son tour phosphoryle et active la kinase Raf-1 (Kolch et al., 1993; revue par Steinbrecher 1999).

L'activation de la voie de signalisation Ras/Raf/MAP kinases, plus précisément l'activation de la kinase du domaine amino terminal de Jun (JNK) et de la kinase de ets, conduit à la phosphorylation des facteurs de transcription cJun et ets respectivement. Cette phosphorylation active ces facteurs de transcription et augmente leur activité transcriptionnelle sur le promoteur du gène du SR (Wu et al., 1994; Smeal et al., 1991; Vojtek et al., 1993).

Le rôle du GM-CSF reste controversé mais le traitement des monocytes au GM-CSF augmente et soutient la réponse transcriptionnelle de certains gènes, comme cJun et cFos, et contribue à la régulation du SR dans les cellules U937 (Adunyah et al., 1991; Guidez et al., 1998). D'autre part, le traitement des monocytes humains par le GM-CSF a un effet supresseur sur l'expression et l'activité du SR. Cet effet pourrait être expliqué par une déstabilisation de l'ARNm du SR ou une dépendance de l'état de différenciation des macrophages qui affecte leurs réponses au GM-CSF (van der Kooij et al., 1996).

Le PMA et le stress oxydatif sont de première importance dans l'expression du SR. Par le traitement des cellules THP-1 et des cellules musculaires lisses au PMA ou au peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ), le niveau d'ARNm et l'activité du SR augmentent. Ce phénomène est dû à l'activation et la translocalisation de la protéine kinase C, une kinase importante dans l'induction des MAPK/JNK/ERK (kinase régulée par les signaux externes) et l'activation des facteurs de transcription responsables de la régulation de l'expression du gène du SR (Kolch et al., 1993; Mietus-Snyder et al., 1997; 1998).

Les ligands pour le "peroxisome proliferator-activated receptor-gamma" (PPAR $\gamma$ ) comme les acides gras et les métabolites de la prostaglandine D2 sont des inhibiteurs de l'expression du SR- $\alpha$ /II dans les macrophages. L'activation de PPAR $\gamma$  a un effet inhibiteur sur l'expression du SR, de l'oxyde nitrique synthase inductible et de la gélatinase B, par l'antagonisme avec les facteurs de transcription AP-1, STAT et avec le facteur nucléaire-kappa B (NF-kB), (Ricote et al., 1998). Au contraire, les LDL-oxidées sont stimulatrices pour la transcription et l'activation à la fois du SR et du PPAR $\gamma$  (revue par Steinbrecher 1998).

La cytokine TNF- $\alpha$  régule l'expression de nombreuses protéines des macrophages parmi lesquelles JNK/SAPK "cJun-NH2-terminal Kinase /Stress-Activated Protein Kinase". Ces kinases appartiennent à la voie de signalisation des MAPK et sont impliquées dans la phosphorylation et l'activation de la protéine cJun qui a un rôle central dans la transcription du SR (Chan et al., 1997).

Cependant, dans les cellules musculaires lisses d'aorte de rat, le TNF- $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  augmentent l'expression de l'ARNm et de la protéine SR ainsi que son activité de dégradation des LDL-acétylées *in vitro* (Li et al., 1995). Par contre, un effet opposé a été observé quand les monocytes sont exposés au LPS qui produit une inhibition de l'expression du SR et cet effet est médié par le TNF- $\alpha$  (van Lenten et al., 1992). Le TNF- $\alpha$  inhibe l'activité de liaison du ligand au SR, l'expression de la protéine SR et son niveau d'ARNm dans les cellules THP-1

traitées au PMA. Le mécanisme d'inhibition est transcriptionnel et post-transcriptionnel en diminuant la stabilité de l'ARNm du SR (Hsu et al., 1996).

Le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la régulation de l'expression du gène du SR est controversé à cause des résultats divergents concernant son effet sur l'expression du SR dans divers types cellulaires et dans diverses étapes de maturation. Dans les lignées de macrophages RAW 264.7 et WEHI-3 qui diffèrent par leur état de maturation, l'IFN- $\gamma$  génère des réponses transcriptionnelles différentes. Les composants de la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  sont présents mais dans les cellules WEHI-3, la protéine STAT1 n'est pas active (Lucas et al., 1998). Dans les cellules musculaires lisses de rat, l'IFN- $\gamma$  augmente à la fois l'ARNm et la protéine SR (Li et al., 1994). Pourtant, dans les monocytes-macrophages humains, il bloque le développement des cellules spumeuses par l'inhibition de l'expression du gène du SR (Geng et Hansson, 1992).

Une famille présentant une surexpression héréditaire du SR-AI/II a été décrite récemment par Giry et al., 1996. Chez deux sujets normolipidémiques qui présentaient des xanthomes, le niveau d'ARNm et la dégradation de LDL-acétylées étaient de 4 à 7 fois plus élevés que chez des sujets témoins. Chez les mêmes sujets, une forte activation des protéines STAT1 $\alpha$  et l'expression de IP-10 (protéine-10 induite par l'interféron- $\gamma$ ) est décelable même en l'absence d'IFN- $\gamma$ . L'expression d'IP-10 en absence d'IFN- $\gamma$  est aussi observée chez un nombre élevé de patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale (Grewal et al., 1998).

Ceci suggère une corrélation possible entre la surexpression et l'activation du SR-AI/II et la surexpression des gènes induits par l'IFN- $\gamma$  dans la formation des cellules spumeuses, des xanthomes et de l'athérogénèse. De plus, l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans l'apparition des lésions d'athérosclérose a été décrite par Gupta et al., 1997, chez les souris "apoE Knock-out". Ces observations soulèvent la question si cette cytokine est un protagoniste ou un antagoniste des lésions athéroscléreuses.

Des études sur la régulation de l'expression du SR dans les cellules THP-1 ont identifié les mécanismes moléculaires du contrôle de l'expression du gène du SR (Wu et al., 1994; Moulton et al., 1994). Le promoteur du récepteur scavenger auquel il manque une boîte TATA contient une région située en amont du site d'initiation de la transcription qui joue un rôle important dans la transcription du gène du SR. Cette région comporte trois éléments distincts qui fonctionnent en coopération pour la transcription optimale du gène du SR. Il s'agit de trois sites consensus AP-1, dont deux contiennent des sites juxtaposés de liaison pour les membres de la famille ets (sites AP-1/ets). L'activation de la transcription du SR en réponse au PMA est dépendante de la synthèse de nouvelles protéines, et elle devient maximale après 12-16 heures de traitement (Wu et al., 1994). Les facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 fonctionnent en aval de la voie de M-CSF et médient l'expression du gène du SR de la même façon qu'après le traitement au PMA (Wu et al., 1994).

Par mutations ponctuelles des sites du promoteur et de l'amplificateur du gène du SR, Wu et al., ont démontré que les sites AP-1 de l'amplificateur fonctionnent en coopération avec les sites AP-1 du promoteur. Grâce à l'utilisation de nombreuses méthodes de biologie moléculaire, l'importance des régions I et IV du promoteur, où se fixent les facteurs Spi-1/PU-1 et cJun/JunB/ets respectivement, a pu être démontrée et ces régions sont essentielles dans l'activation de la transcription du gène du SR. Les facteurs c-Jun, JunB et ets2 qui sont les cibles de la voie de ras, raf et des MAPK/JNK/ERK/kinase d'ets, fonctionnent de façon coopérative et sont critiques pour la transcription du gène du SR en réponse au PMA, dans les cellules THP-1 (Wu et al., 1994 ; Pulverer et al., 1991; Vojtek et al., 1993; Smeal et al., 1991). Les facteurs Spi-1/PU-1 semblent jouer un rôle important dans l'expression spécifique du SR dans les macrophages et les cellules B (Moulton et al., 1994).

## 2. DÉFINITION DU COMPLEXE AP-1 ( PROTÉINE ACTIVATRICE-1)

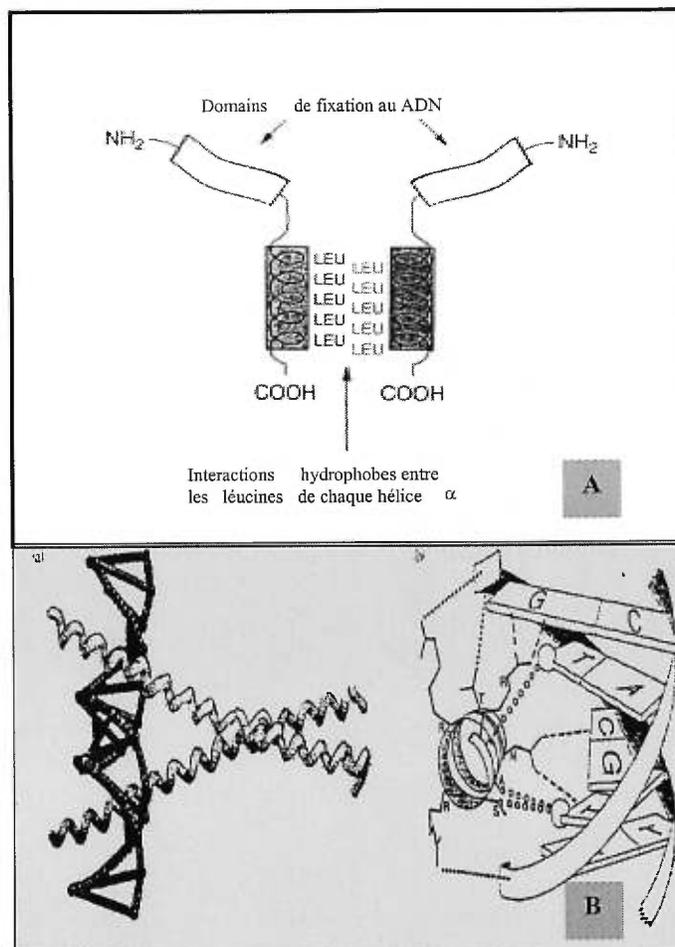
### 2.1. Caractérisation du complexe AP-1

Le facteur de transcription dénommé AP-1 a été initialement décrit dans les extraits cellulaires des cellules HeLa. L'AP-1 reconnaît et lie un site spécifique consensus dans la région régulatrice de plusieurs gènes cellulaires et viraux qui contiennent la séquence TGAC/GTCA (Vogt et Bos, 1990). Le complexe de facteurs de transcription défini génériquement sous le nom d'AP-1 réunit en fait plusieurs protéines qui jouent un rôle dans la régulation des gènes. Parmi les protéines AP-1 on retrouve Jun (cJun, JunB, JunD, vJun), Fos (cFos, vFos, FosB, Fra1, Fra2), et l'ATF (facteur de transcription activateur) (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF) (Angel et Karin, 1991; Karin et al., 1997).

Les protéines de ce complexe sont en général codées par des proto-oncogènes et des gènes de phase aigüe dont l'expression est induite rapidement par le sérum, les esters de phorbol, les rayons ultraviolet (UV) et les facteurs de croissance (Schütte et al., 1989; Szabo et al., 1991). L'existence de familles de gènes est fréquente parmi les protéines nucléaires qui ont la même spécificité de liaison à l'ADN. Plusieurs types cellulaires expriment des protéines de la famille AP-1 qui peuvent dimériser avec elles-mêmes ou avec d'autres partenaires. Elles sont importantes dans la régulation de plusieurs gènes dépendant de l'état de différenciation cellulaire et du type tissulaire.

Le site consensus lié par AP-1 est similaire au site lié par le facteur de transcription des levures GCN4. GCN4 présente aussi une similarité de 44% avec la protéine jun codée par l'oncogène jun qui est impliqué dans la transformation par le "sarcoma virus 17" chez les volailles. Les deux protéines ont une structure similaire appartenant à la famille bZIP (glissière de leucines) (revue par Curran et Franza, 1988).

Les protéines de la famille AP-1 ont une structure commune conservée, qui consiste en une répétition de 7 leucines dans la région C-terminale de chaque  $\alpha$ -hélice du monomère. Ce motif sert à la dimérisation par la formation d'interactions hydrophobes entre les 7 leucines de chaque monomère (figure II-3 A), et il est appelé modèle en fermeture éclair (Landschulz et al., 1988). Des analyses de mutagénèse dans le domaine des leucines de cFos ont prouvé que l'intégrité de chacune des 7 leucines est essentielle pour l'interaction de cFos et cJun (Kouzarides et Ziff, 1988).



**Figure II-3.** Dimérisation (A) et liaison sur l'ADN (B) des protéines bZIP. Adapté de: Kaplan et Delpech, 1993. Biol. Mol. et Méd. 2<sup>e</sup> éd (A) et Wolberger, 1993. Curr. Opin. Struct. Biol. 3, (B).

Les protéines bZIP comportent aussi un domaine de liaison de l'ADN, basique, qui est associé au domaine de dimérisation dans la partie N-terminale. Le domaine de liaison à l'ADN de chaque monomère médie les ponts d'hydrogène entre les acides-aminés et les bases d'un demi-site du motif AP-1 dans un grand sillon d'un côté et de l'autre de l'ADN (figure II-3 B). Les résidus basiques sont placés sur la surface interne de l'hélice et interagissent avec l'ADN pendant que les acides aminés à charge négative (acide glutamique) pointent vers l'extérieur en créant un dipôle. Une molécule d'asparagine est responsable d'une flexion de l'hélice qui augmente la liaison avec l'ADN (Wolberger, 1993). Le domaine d'activation de la transcription vers la région N-terminale de la protéine est très important pour la transcription des gènes cibles et il est soumis à des transformations post-traductionnelles comme la phosphorylation. La phosphorylation de ce domaine augmente la stabilité et l'activité transcriptionnelle de la protéine comme dans le cas de cJun qui est la cible de la voie de JNK.

Les dimères Jun/Jun et Jun/Fos activent la transcription en se liant au site TRE (élément de réponse au TPA) ayant pour séquence TGAC/GTCA, pendant que les dimères Jun/ATF lient le site CRE (Élément de réponse à l'AMP cyclique). Ces sites sont des éléments palindromiques et contiennent le même demi-site AP-1 (revue par Karin et al., 1997). La liaison des protéines AP-1 sur leur site dans le noyau est analogue à l'interaction d'un ligand avec son récepteur spécifique à la surface cellulaire. L'affinité, la spécificité et l'activité du complexe AP-1 dépendent de sa composition, des modifications post-traductionnelles de ses composants, de la séquence des nucléotides flanquants et de la superposition des autres sites de liaison à l'ADN. Ce complexe nucléoprotéique coordonne un grand nombre de réponses aux signaux intra et intercellulaires (Curran et Franza, 1988).

Des recherches chez la souris ont démontré que les gènes Jun sont exprimés à la fois chez l'adulte et durant l'embryogénèse. Les protéines cJun, JunB et JunD sont similaires dans la région C-terminale impliquée dans la dimérisation et la liaison avec l'ADN et différentes dans leur région N-terminale responsable de l'activation de la transcription (Vogt et Bos, 1990; Castellazzi et al.,

1991). Elles sont induites différemment en réponse aux mêmes stimuli (Schütte et al., 1989; Ryder et Nathans, 1988). Chiu et al., (1989), rapportent une différence à la fois entre la capacité de trans-activation de cJun et JunB et dans la capacité de lier l'ADN. La trans-activation par la protéine JunB dépend d'une coopération avec d'autres facteurs et elle peut activer les constructions géniques qui contiennent de multiples sites TRE. Comparée à JunB, la protéine cJun est un activateur fort des promoteurs avec un seul site TRE et son activité ne dépend pas autant d'autres facteurs. Les constructions de chimères cJun/JunB ont prouvé que l'activité réduite de JunB est due à une différence de 4 acides aminés entre le domaine de dimérisation et le domaine basique.

Cette différence structurale réduit la capacité de liaison à l'ADN et d'homodimérisation de JunB qui forme plutôt des hétérodimères JunB/cJun qui sont inefficaces dans la trans-activation des gènes cibles (Deng et Karin, 1993). Cette tendance à former préférentiellement des hétérodimères à activité réduite avec cJun, a pour résultat l'atténuation de l'activité de cJun (Deng et al., 1993). JunB et JunD ne peuvent pas se substituer à cJun et les trois facteurs de transcription jouent des rôles distincts dans la croissance normale des cellules (Castellezzi et al., 1991). Lorsque JunB est exprimé dans les cellules "F9 tetracarcinomas" en présence de cJun, on observe une diminution de l'activité de cJun après stimulation par des mitogènes (Schütte et al., 1989). En revanche les hétérodimères cFos /cJun sont plus actifs dans l'activation du complexe AP-1 et dans la transformation cellulaire que cJun/JunB (Schütte et al., 1989 ; Angel et al., 1987). Schütte et al. (1989) proposent comme modèle de ce phénomène la séquestration de cJun par JunB; exprimés en même temps, ils forment des dimères inactifs. Cela pourrait expliquer le rôle antagoniste de cJun et JunB dans la transformation. La régulation négative de cJun par JunB semble avoir un important rôle physiologique en prévenant la surexpression de cJun dans les cellules traitées par des mitogènes (Chiu et al., 1989).

## 2.2. Régulation du complexe AP-1

Chaque système cellulaire semble avoir un programme génétique particulier régulant sa vie. Par exemple dans les neurones certains membres de la famille AP-1, cJun, cFos et fosB, sont induits, alors que d'autres, fra1 et fra2 sont réprimés durant l'apoptose provoquée par la privation de NGF (facteur de croissance neuronal) (Estus et al.,1994). Dans les cellules HL60 et U937, le traitement au PMA induit la différenciation, après la formation d'un complexe AP-1 fonctionnel et c-Jun reste toujours le plus important facteur corrélé à la liaison de l'ADN. D'autres facteurs comme cFos, fra1, fra2, fosB, exprimés de façon transitoire ne semblent pas être liés à l'activation des gènes dans les cellules HL60 et U 937 (Szabo et al., 1991 ).

La régulation de l'activité de Jun/AP-1 se produit à deux niveaux. Le premier, qui se fait tout de suite après la stimulation par le PMA, implique des modifications post-traductionnelles qui augmentent l'activité de cJun/AP-1. Le deuxième est au niveau transcriptionnel dans le promoteur de Jun où les protéines AP-1 activées augmentent par rétro contrôle positif la quantité d'ARNm de cJun (Angel et al., 1988).

La régulation négative de cJun est faite par la phosphorylation par la caséine kinase II (CK II), une protéine kinase qui a la capacité de phosphoryler plusieurs facteurs nucléaires. La CK II phosphoryle la sérine 249 et la thréonine 231, adjacentes au domaine de liaison de cJun à l'ADN. Cette phosphorylation maintient la protéine dans un état inactif par l'inhibition de sa capacité de lier l'ADN (Lin et al., 1992). La déphosphorylation de ces sites est corrélée avec l'augmentation de l'activité du complexe AP-1. Une conséquence de l'activation de la PKC serait la régulation d'une phosphatase qui déphosphorylerait ces sites et stimulerait l'activité transcriptionnelle de cJun.

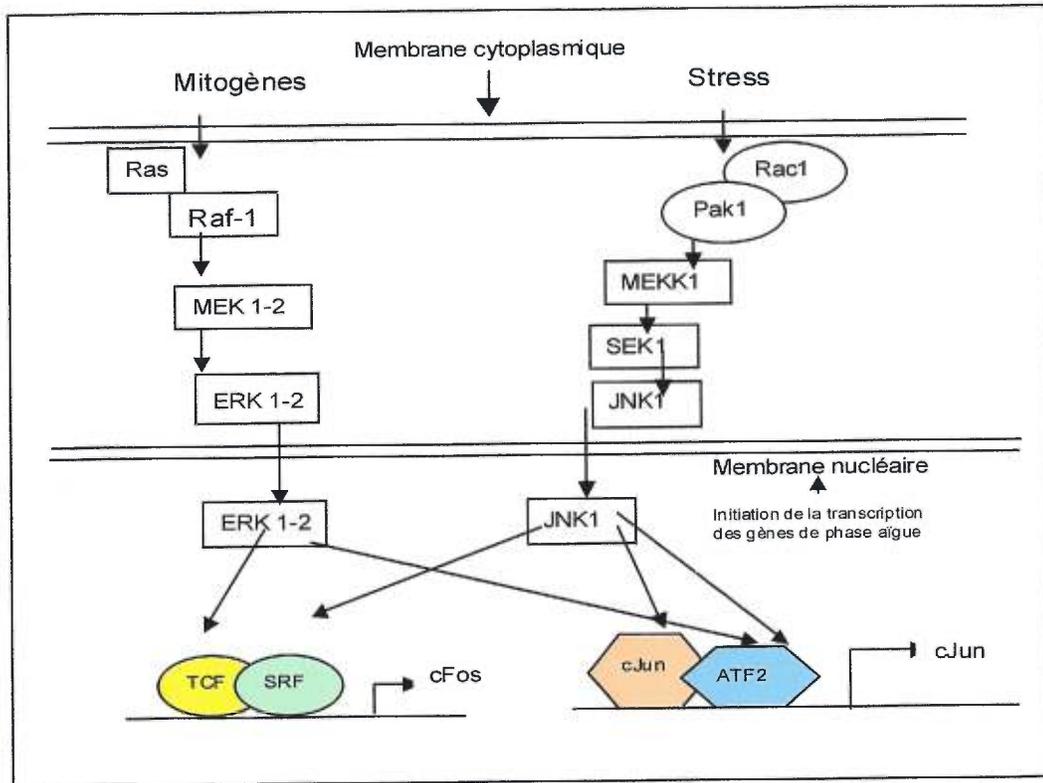
L'activation de cJun suite à l'exposition des cellules aux UV, aux cytokines, aux facteurs de croissance ou au PMA est régulée positivement par la kinase JNK qui phosphoryle spécifiquement les sérines 63 et 71 dans la région amino-

terminale du domaine d'activation de la transcription (Hibi et al., 1993). JNK, quoique spécifique pour cJun, peut aussi phosphoryler ATF2, moins efficacement JunD, et non JunB, dépendamment de la présence d'un site d'accostage et d'un site de spécificité de liaison sur la protéine. Pour que certains facteurs soient phosphorylés, activés et puissent exercer leur fonction transcriptionnelle, l'hétérodimérisation est absolument nécessaire, comme par exemple pour JunB (revue par Karin et al., 1997; Karin et Hunter, 1995).

Lorsque des cellules NIH-3T3 sont cultivées en présence de sérum ou de PMA la voie de ras est activée, ce qui induit l'activité de Raf-1, la kinase effectrice de cette voie. Ras coopère avec Raf-1, dans la transduction du signal vers le noyau conduisant à l'activation de facteurs de transcription. Raf-1 semble stimuler la kinase qui phosphoryle c-Jun dans son domaine d'activation de la transcription.

Par l'activation de c-Jun, Ras et Raf-1 contribuent à l'activation des promoteurs qui contiennent le site AP-1/ets (Bruder et al., 1992). En réponse à des stimuli variés (stress, facteurs de croissance ou de différenciation) la kinase Raf-1 active une cascade complexe d'enzymes de signalisation comme la MKK "MAPK Kinase", et la MKKK "MKK Kinase". Ceci aboutit à l'activation des MAPK qui peuvent se translocaliser dans le noyau où elles contrôlent plusieurs réponses cellulaires positives et négatives (croissance, différenciation, survie, apoptose) (revue par Brugge et McCormick 1999 ; Garrington et Johanson 1999). Les MAP kinases à double spécificité MKK (MEK1, 2 et MKK4, 7) sont des kinases qui phosphorylent ERK-1 et ERK-2 ainsi que JNK1 et JNK2. Ces dernières kinases sont translocalisées dans le noyau où, à leur tour, elles phosphorylent et activent les facteurs de transcription nucléaires cibles (Minden et Karin, 1997).

La figure II-4 représente la cascade d'activation des MAPK et la relation entre ERK et JNK dans l'induction de la transcription des gènes cibles.



**Figure II-4:** La cascade de MAPK. Adapté de: Cano 1995, TIBS 20; Waskiewicz 1995, Curr. Opin. Cell Biol. 7; Davis 1994, TIBS 19.

Outre la cascade de MAPK et des seconds messagers, les modifications structurales du cytosquelette et les facteurs de transcription qui lient l'ADN ont un rôle actif dans le relais du signal de transduction entre le cytosol et le noyau de la cellule (Nollert et al., 1992).

### 2.3. Rôle du complexe AP-1

Les protéines AP-1 sont impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire et elles sont exprimées par un grand nombre de cellules. Elles médient les réponses cellulaires au sérum, aux facteurs de croissance, aux esters de phorbol et à la radiation ultraviolette, ainsi qu'aux proto-oncogènes c-ha-ras et c-mos (Angel et al., 1987; Angel et Karin, 1991; Curran et Franza 1988).

AP-1 est un complexe de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la transcription de plusieurs gènes comme la métallothionéine-IIA (Haslinger et Karin, 1985 ; Scholer et al., 1986), cJun (Lee et al., 1987), le récepteur "scavenger" (Moulton et al., 1994), et le PAI-1 "Plasminogen activator inhibitor-1" (Arts et al., 1999) etc. L'équilibre entre l'expression des divers membres de la famille AP-1 est très important pour la régulation des gènes cibles et sa perturbation conduit à la transformation maligne (Lee et al., 1988 ; Schütte et al., 1989).

Le facteur de transcription cJun peut induire la différenciation des macrophages mais n'est pas suffisant pour la différenciation terminale et l'arrêt de la croissance. Il induit des modifications de phénotype, une activité phagocytaire augmentée, et le ralentissement de la croissance (Szabo et al., 1994). Il a aussi un rôle critique dans la prolifération et l'induction de l'adhérence par le PMA dans les cellules U937 (Momiya et al., 1996). Dans les cellules de souris BALB/c3T3 les facteurs de croissance du sérum induisent aussi une protéine homologue de cJun humain, appelée JunA. Cette protéine est impliquée dans le contrôle du programme génétique de ces cellules de la même façon que JunB (Ryder et Nathans, 1988). cJun serait essentiel dans le développement et l'hépatogenèse chez la souris (Hilberg et al., 1993).

La participation du complexe AP-1 dans l'apoptose est controversée. Même s'il ne fait pas partie de la machinerie de la mort cellulaire, certaines activités du complexe AP-1 sont requises pour l'initiation de la mort programmée dans quelques types cellulaires. Dans les neurones, par exemple, cJun et Fos sont induits durant certaines phases de l'apoptose; il semble donc que cJun soit nécessaire pour l'apoptose (Estus et al., 1994). On ne connaît pas quelle est la composition du complexe AP-1 qui médie l'apoptose, ni celle qui médie la prolifération cellulaire durant le développement (Karin et al., 1997). Des résultats récents suggèrent l'hypothèse que la stimulation de cJun sans l'activation concomitante de Fos, aboutit à la formation d'homodimères Jun/Jun susceptibles d'activer la transcription de certains gènes pro-apoptotiques (Bossy-Wetzel et al., 1997).

cJun est le premier facteur connu qui est absolument nécessaire pour la prolifération des fibroblastes. Les fibroblastes transformés qui surexpriment Ha-Ras et Ki-Ras accumulent de grandes quantités de cJun, JunB, Fra-1 et Fra-2, et manifestent une activité de liaison augmentée sur le site AP-1 où les dimères prédominants sont cJun/Fra-1, suggérant qu'ils sont les médiateurs de la transformation par Ras dans les fibroblastes NIH3T3 (Mechta et al., 1997). Dans les cellules des lignées leucémiques U-937 et HL-60, il y a une forte corrélation entre l'expression de cJun et la formation d'un complexe AP-1 actif durant le processus de différenciation (Szabo et al., 1991). Cela est vrai aussi pour les cellules THP-1 (de la même lignée cellulaire que U-937 et HL-60) où cJun, ets 2 et Ras coopèrent dans la transcription des gènes qui sont impliqués dans la différenciation terminale, comme le SR (Wu et al., 1994).

### **3- RÔLE DE L'IFN- $\gamma$ DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DU SR**

#### **3. 1. Description de la voie de l'IFN- $\gamma$**

La famille des récepteurs de cytokines regroupe des récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques tels que les récepteurs des interleukines 2, 3, 4, 5, 7 et 9 (IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, et IL9), les récepteurs du GM-CSF, du G-CSF, de l'erythropoïétine, et aussi des récepteurs de l'hormone de croissance, de la prolactine et du facteur neurotrophique ciliaire etc... Tous ces récepteurs présentent des analogies structurales. Au contraire, les cytokines ne présentent pas d'homologie de séquence primaire mais leur structure spatiale est très conservée.

Les récepteurs des interférons, comme les récepteurs des cytokines, comprennent un seul domaine transmembranaire et sont dépourvus d'activité enzymatique intrinsèque. Il semble que ces deux types de récepteurs aient une

origine génétique commune et, en effet, ils utilisent des voies de signalisation communes (revue par Dusanter-Fourt et al., 1994).

Les cytokines sont généralement inhibiteurs de l'apoptose, inducteurs de la prolifération cellulaire et, selon le type tissulaire, inhibiteurs ou stimulateurs de la différenciation. Les voies de signalisation de l'interféron et des cytokines impliquent une phosphorylation sur une tyrosine et l'activation des Janus Tyrosine Kinase (JAK) qui sont des transmetteurs du signal et activateurs des facteurs de transcription (Stark et al., 1998). Les JAK s'associent spécifiquement à la région cytoplasmique juxtamembranaire de certains récepteurs et elles sont préassociées aux récepteurs de cytokines avant toute stimulation par le ligand. La dimérisation du récepteur est nécessaire à la phosphorylation des JAK associées (revue par Dusanter-Fourt et al., 1994; Ilhe, 1995).

La signalisation par les interférons  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  nécessite l'activation conjointe de deux JAK différentes, induisant une phosphorylation réciproque sur les résidus tyrosines (transphosphorylation). Ce phénomène crée des sites d'ancrage potentiels pour de nombreuses molécules de signalisation qui contiennent le domaine SH2 "src homology 2" et SH3 dans leur partie C-terminale. Dans leur domaine N-terminal se trouve une région de répétitions "leucine zipper" pouvant être impliquée dans des interactions protéine-protéine (Dusanter-Fourt et al., 1994).

Le domaine SH2 a deux fonctions: la reconnaissance du résidu spécifique de phosphotyrosine du récepteur, et l'arrimage de la protéine dans le complexe récepteur-JAK (Horvath et Darnell, 1997). Parmi les molécules de signalisation qui contiennent le domaine SH2 se trouvent les protéines STAT qui sont des facteurs transcriptionnels présents à l'état latent dans le cytoplasme. Elles sont activées par les interférons ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et par les kinases JAK. Suite à leur phosphorylation, les facteurs STAT se détachent du récepteur et se translocalisent dans le noyau où ils induisent l'expression spécifique des gènes communs et particuliers (revue par Dusanter-Fourt et al., 1994; Stark et al., 1998).

L'IFN- $\gamma$  est exprimé dans presque tous les types cellulaires à l'exception des érythrocytes matures. Dans les cellules non stimulées, les deux sous-unités du récepteur de l'IFN- $\gamma$  (IFNGR1 et IFNGR2), ne sont pas préassociées l'une à l'autre mais elles sont associées à JAK1 et JAK2 respectivement. Le récepteur activé est un homodimère de 2 sous-unités de IFNGR1 qui génère des sites de liaison pour 2 sous-unités de IFNGR2 et cette association conduit à la formation d'un complexe symétrique. Suite à la formation du complexe récepteur/JAK, JAK1 et JAK2 sont activées par auto et transphosphorylation (revue par Stark et al., 1998). L'activation de JAK2 se produit la première et est nécessaire pour la phosphorylation et l'activation de JAK1. Une fois activées, les JAK phosphorylent une tyrosine dans la partie C-terminale de IFNGR1. Cette phosphorylation crée des sites de liaison pour le facteur de transcription STAT1 $\alpha$ . Après avoir été recruté dans le complexe récepteur/JAK/STAT1 $\alpha$  et phosphorylé sur la tyrosine 701, dans la partie C-terminale, STAT1 $\alpha$  se dissocie du récepteur en formant un homodimère avec une autre molécule de STAT1 $\alpha$  active. L'homodimère STAT1 $\alpha$  est translocalisé dans le noyau par un mécanisme dépendant de la GTPase. Dans le noyau, l'homodimère STAT1 $\alpha$  lie un site spécifique GAS (Site d'activation par l'interféron gamma), dans le promoteur des gènes induits par l'IFN- $\gamma$  et active leur transcription.

### **3.2- Interaction de la voie de STAT avec d'autres voies de signalisation**

La voie de signalisation menant à l'activation des MAP kinases et conduisant à l'expression des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun a été bien caractérisée pour les récepteurs à l'activité tyrosine kinase. Cette voie est aussi utilisée par la plupart des récepteurs de cytokines. La voie des MAPK fait intervenir le recrutement et l'activation séquentielle de Shc/Grb2, de SOS (facteur d'échange de Ras), de Ras, de Raf et de MAPKK (revue par Dusanter-Fourt et al., 1994; Stark et al., 1998; Ihle, 1995). L'activation de la voie de JAK est indépendante de l'activation de la voie faisant intervenir Ras. Ainsi, deux voies

d'activation pourraient être impliquées dans la transcription des gènes induits par les cytokines, l'une, l'activation des facteurs STAT par JAK, indépendante de Ras, et l'autre, l'activation des facteurs stimulés par les MAPK, dépendante de Ras. L'activation de STAT est produite suite à la phosphorylation sur la tyrosine par JAK, mais son activité transcriptionnelle est augmentée par la phosphorylation sur la sérine 727 par une enzyme ayant l'activité de MAPK (Stark et al., 1998). Cette kinase semble être ERK qui, suite à son activation par le GM-CSF, régule l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription SRF/TCF et STAT dans le promoteur du gène cFos (Rajotte D et al., 1996).

La capacité des protéines STAT1 d'activer l'expression des gènes régulés par leur phosphorylation peut aussi être régulée par l'interaction de STAT avec d'autres facteurs qui lient l'ADN.

Des interactions entre les facteurs de transcription conduisent à l'augmentation de la transcription des gènes cibles. Par exemple dans le promoteur du gène ICAM "Intercellular Adhesion Molecule" les protéines STAT1 et SP1 "Specificity Protein 1" manifestent une synergie transcriptionnelle quand elles sont liées à leurs sites respectifs situés, proches l'un de l'autre sur l'ADN (revue par Horvath et Darnell 1997; Stark et al., 1998 ). STAT1 interagit aussi avec les co-activateurs CBP/p300 ayant deux régions d'interaction avec ces co-activateurs qui sont nécessaires pour l'activité transcriptionnelle optimale de STAT.

Des études sur le gène cFos ont identifié plusieurs éléments de liaison de facteurs de transcription dans son promoteur, comme : SIE (élément de réponse au STAT), SRE (élément de réponse au sérum), AP-1 et CRE (élément de réponse à l'AMP cyclique), qui coopèrent dans la transcription optimale du gène cFos (revue par Horvath et Darnell, 1997). Dans le promoteur du gène qui code pour l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-1, le site de liaison de STAT et le site de liaison des protéines AP-1, situés très proches l'un de l'autre, sont absolument nécessaires pour la transcription de ce gène en réponse à l'IL6 (interleukine 6) (Bugno et al., 1995).

L'induction de gènes spécifiques à certains types cellulaires par l'IFN- $\gamma$  pourrait être expliquée, au moins partiellement, par l'habilité de facteurs positifs et négatifs à moduler l'activité des protéines STAT. STAT est exprimée de façon ubiquitaire et régule l'expression de nombreux gènes dans différents types cellulaires. STAT agit probablement comme composant d'un complexe transcriptionnel multi-protéinique spécifique à chaque lignée cellulaire. Quoique STAT réponde à la stimulation par les cytokines, elle peut être activée par d'autres facteurs comme les facteurs de croissance et le récepteur de facteurs de croissance peut induire la phosphorylation de STAT1 $\alpha$  sur la tyrosine 701 (revue par Ihle, 1995).

### **3.3- Implication de l'IFN- $\gamma$ dans la régulation de l'expression du gène du SR**

Le processus de maturation associé à la différenciation et le processus d'activation des macrophages, sont sous le contrôle de cytokines comme le CSF "colony stimulating factor" qui induit la maturation, et sous le contrôle de l'IFN- $\gamma$  qui induit l'activation fonctionnelle des macrophages.

Des études sur des cellules RAW264.7 et WEHI-3, deux lignées cellulaires à des stades de différenciation différents, ont démontré que les macrophages utilisent de façon différente les éléments GAS à différents stades de maturation (Lucas et al., 1998). Ces types cellulaires ont des réponses distinctes à l'IFN- $\gamma$  dans l'acquisition des fonctions et dans l'induction des gènes spécifiques.

L'acquisition du phénotype macrophage par les monocytes est corrélée à l'expression de gènes spécifiques de phase aigüe et tardive. Ce phénomène est dépendant du contexte environnant, des interactions cellulaires, des molécules régulatrices et des cytokines (Wu et al., 1994). Parmi les gènes spécifiques qui sont induits et qui sont déterminants durant la maturation des macrophages, se trouve le récepteur "scavenger". La régulation du SR est complexe et son expression augmente durant la différenciation des monocytes en macrophages

(Fogelman et al., 1981). Quand les cellules monocytaires THP-1 sont traitées avec du PMA, elles se différencient en macrophages et l'expression du SR est augmentée (Moulton et al., 1994). Cette augmentation de l'expression du SR est médiée par les facteurs de transcription AP-1/ets. Le traitement des mêmes cellules par l'IFN- $\gamma$ , après leur transformation en macrophages, inhibe l'expression du SR, et ce phénomène se produit par l'inhibition de l'activité du complexe AP-1/ets dans le contexte d'une stimulation simultanée de deux voies de signalisation JAK/STAT et Ras/AP-1 (Horvai et al., 1997).

Les auteurs donnent comme explication de cette inhibition l'existence d'une compétition entre les facteurs AP-1 et STAT pour une quantité limitée de co-activateurs CBP/p300. Cet antagonisme entre AP-1 et STAT1 demande que la protéine STAT soit active et est similaire à celui qui existe entre AP-1 et les récepteurs nucléaires (Kamei et al., 1996). Il semble être important dans le développement d'un phénotype cellulaire spécifique.

Des analyses par buvardage Northern de l'ARNm du SR dans les monocytes humains différenciés en macrophages, traités à l'IFN- $\gamma$  ont aussi révélé une réduction significative de l'expression de l'ARNm du SR, de la liaison et de l'internalisation de LDL-acétylées, aussi bien qu'une inhibition de la transformation des macrophages en cellules spumeuses (Geng et Hansson, 1992). L'adhérence des monocytes au substrat, spécifiquement aux fibronectines (molécule RGD) augmente la réponse des monocytes à l'IFN- $\gamma$ , et amplifie l'activation des leucocytes en réponse à cette voie de signalisation. Ces résultats suggèrent l'existence d'un nouveau mécanisme par lequel les intégrines peuvent moduler la voie de signalisation des cytokines et conduire à l'activation des leucocytes et à l'inflammation (McCarthy et al., 1997).

Au contraire, dans les cellules musculaires lisses de lapin, l'IFN- $\gamma$  augmente l'expression à la fois de l'ARNm et de la protéine SR, conduisant à une dégradation augmentée de LDL-acétylées comparable à la dégradation des LDL-acétylées induite par le PMA dans les macrophages (Li et al., 1995). Ceci suggère

une différence entre les deux types cellulaires dans la transduction du signal et l'expression génique, et pourrait expliquer la grande accumulation de cellules spumeuses dérivées de SMC dans les lésions d'athérosclérose.

## **4. CO-ACTIVATEURS ET ACTIVATEURS DE LA TRANSCRIPTION**

### **4.1. Co-activateurs CBP/p300**

Les protéines CBP et p300 sont deux facteurs de la même famille qui ont originellement été identifiés par leur interaction avec la protéine CREB (Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc) et la protéine virale E1A respectivement (revue par Gelman et al., 1997). Toutefois ces protéines comprennent de multiples régions fonctionnelles capables d'interagir avec d'autres protéines.

Les protéines CBP/p300 s'associent avec les récepteurs nucléaires et avec de nombreux facteurs de transcription comme CREB, STAT, AP-1, MyoD (produit du gène régulateur de la myogénèse), et YY1, aussi bien qu'avec d'autres co-activateurs, pour donner lieu à un complexe plus stable et ayant une activité transcriptionnelle accrue. Cette augmentation de l'activation transcriptionnelle est possible à cause de la capacité des protéines CBP/p300 d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle, plus précisément avec la TBP (protéine de liaison de la boîte TATA) et d'autres molécules qui lui sont associées (revue par Glass et al., 1997; Gelman et al., 1997; Goldman et al., 1997).

Les protéines CBP/p300 servent à la connexion et à l'intégration des multiples signaux arrivant à la fois de la membrane cellulaire et du cœur de la cellule ce qui suggère qu'elles soient des intégrateurs de plusieurs voies de signalisation qui contrôlent la différenciation et la croissance cellulaire (Kamei et al., 1996; Gelman et al., 1997). La quantité de ces cofacteurs est limitée dans la cellule et leur interaction avec plusieurs autres facteurs génère une compétition, un antagonisme ou des interactions synergiques entre ces facteurs (Glass et al., 1997; Gelman et al., 1997). Des modifications conformationnelles dues à des

phosphorylations semblent orienter l'interaction de CBP/p300 avec l'un plutôt qu'avec l'autre facteur de transcription, et celles-ci se font dans un contexte cellulaire bien précis.

La protéine CBP est impliquée dans l'activation de CREB, Jun/Fos, des récepteurs nucléaires RAR (récepteur de l'acide rétinoïque), T3R (récepteur de l'hormone thyroïdienne T3) et GR (récepteur des glucocorticoïdes). Ces récepteurs nucléaires sont inhibiteurs de l'activité du complexe AP-1, sans toutefois inhiber sa liaison sur l'ADN. La quantité limitée de facteurs CBP, crée une sorte de compétition entre l'alternative d'activation des récepteurs nucléaires par le ligand et d'activation des protéines AP-1 par la phosphorylation. L'antagonisme ou la coopération entre les facteurs de transcription dépend de la composition du complexe formé pour attirer ou inhiber le recrutement de CBP dans le complexe (Kamei et al., 1996; Horvai et al., 1997; Glass et al., 1997).

Des études récentes faites sur CBP/p300 et leur participation à l'intégration des voies de signalisation JAK/STAT et AP-1/ets démontrent que la stimulation simultanée de ces deux voies de signalisation produit une compétition entre le facteur STAT et les facteurs AP-1 pour une quantité limitée de CBP/p300 (Horvai et al., 1997). L'initiation de la transcription par les facteurs STAT et AP-1 dépend de l'abondance des facteurs CBP/p300 et de l'affinité relative des facteurs pour ces co-activateurs. En effet, l'activité antivirale de l'IFN- $\gamma$  et sa propriété d'inhiber la croissance, dérive de la compétition de STAT avec d'autres facteurs de transcription pour l'interaction avec CBP et p300. Ce niveau de régulation des diverses voies de signalisation, par compétition pour co-activateurs, pourrait se produire dans le cas d'inhibition du complexe AP-1 /ets par l'IFN- $\gamma$ , puisque cette inhibition ne se produit pas dans les cellules qui n'expriment pas STAT1 $\alpha$  (Horvai et al., 1997).

De très récents résultats ont mis en évidence une interaction entre les facteurs ets1, ets2, et les co-activateurs CBP/p300 durant l'activation transcriptionnelle du gène de la stromélysine humaine (Jayaraman et al., 1999).

Deux domaines du CBP, un dans la partie N-terminale et l'autre dans la partie C-terminale sont responsables de l'activation de ets2 en se liant sur le domaine trans-activateur et sur le domaine de liaison de l'ADN. L'interaction des activateurs ets1 et ets2 avec les co-activateurs CBP/p300 se produit *in vivo* et *in vitro* pour la transcription du promoteur du gène de la stromélysine qui contient des sites palindromiques de liaison de ets et CBP/p300. Les interactions entre certains facteurs de transcription et CBP, peuvent générer une synergie entre les facteurs dans certains promoteurs ou encore des interactions compétitives dans d'autres promoteurs (Kamei et al., 1996).

Des mutations dans le gène CBP affectent le développement et peuvent engendrer une prédisposition au cancer (Goldman et al., 1997). Une altération du niveau de CBP/p300 pourrait influencer le choix par la cellule entre la voie de la différenciation ou celle de la prolifération en réponse aux divers signaux (Glass et al., 1997).

#### **4.2. Activateurs de la transcription Ets**

Ets est une protéine de transformation produite par le gène ets et découverte pour la première fois dans le virus E26 des volailles. Les protéines ets peuvent être groupées en sous-familles en fonction de leur similarités dans le domaine ets et sa position, et comprend environ 30 protéines dont font partie ets1, ets2, Elk, Elf1, Erg, PU-1, Fli1, etc (revue par Wasylyk et al., 1993). Ces protéines lient la séquence C/A GGA A/T dans le milieu de 10 paires de bases variable. Ce motif donne la spécificité de liaison de l'ADN pour les protéines ets. Les activateurs de la transcription ets, lient le motif ets sur l'ADN comme monomères en s'associant avec d'autres facteurs.

Ets2 est un oncogène qui code pour une protéine nucléaire de 56-kDa dont l'activité est mitogénique et transformatrice (Seth, 1989). La transcription du gène ets2 est contrôlée par plusieurs sites d'initiation dirigés par un promoteur qui manque les boîtes TATA et CAAT. Les protéines ets peuvent être activées par

des insertions provirales chez la souris et par translocalisation chromosomique chez l'humain (revue par Wasylyk et al., 1993).

Même si les protéines ets2 et ets1 présentent une grande homologie d'acides aminés dans la partie C-terminale, leur expression est différente (Watson et al., 1988). Ets1 a une expression restreinte à certaines types cellulaires pendant que ets2 peut être détecté en quantités variables dans plusieurs types cellulaires et dans plusieurs tissus. L'expression de ets2 est induite dans le foie en régénération avant la synthèse de l'ADN, dans les astrocytes et durant le développement des lymphocytes-T, suggérant son implication dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Mavrothalassitis et al., 1990). Suite à la stimulation avec le LPS, avec les activateurs de PKC, et un facteur de croissance hématopoïétique, ets2 est induit rapidement dans les macrophages dérivés de la moëlle osseuse de volaille et les macrophages péritonéaux de souris aussi bien que dans les monocytes humains (Boulukos et al., 1990).

Leur rôle principal est dans l'activation de la transcription de certains gènes, mais seulement en association avec d'autres facteurs de transcription, en formant des complexes multimériques et multifonctionnels qui sont stables en présence de l'ADN. Par exemple, dans l'amplificateur du virus polyoma, ets fonctionne en coopération avec les facteurs cFos et Jun pour l'activation des réponses oncogéniques. Ets participe aussi à la réplication de l'ADN (revue par Wasylyk et al., 1993). Des études récentes ont démontré une implication de ets2 dans l'inhibition de l'apoptose dans les macrophages BAC1.2F5, par la régulation de la transcription du facteur antiapoptotique Bcl-xL (Sevilla et al., 1999). Dans les monocytes et les macrophages humains l'induction rapide du ets2 suite à la stimulation par les activateurs de PKC suggère un rôle dans la transmission du signal vers le noyau et son implication dans la survie ou le développement des compétences de ces cellules.

Ets2 est exprimé dans les monocytes-macrophages primaires et aussi dans une variété de lignées cellulaires myélomonocytaires, comme les cellules THP-1 (Aperlo et al., 1996). L'expression constitutive d'ets2 dans les cellules myéloïdes

immatures M1D+ conduit à l'acquisition du phénotype macrophage et est corrélée avec une surexpression de JunB et cJun. Il semble qu'ets2 contribue à la surexpression de JunB dans ces cellules par l'interaction de la protéine ets2 avec le site ets du promoteur de JunB. La protéine ets2 interagit et coopère avec les facteurs de transcription jun dans la régulation du gène du SR. Elle est la cible de la voie de signalisation de ras et forme des complexes multimériques, activateurs de l'expression du SR, qui conduisent à la différenciation terminale des cellules THP-1 (Wu et al., 1994). Les facteurs ets interagissent aussi avec les co-activateurs CBP/p300 pour l'activation transcriptionnelle de certains gènes humains comme la stromélysine (Jayaraman et al., 1999). Ces différentes situations qui impliquent les facteurs ets sont un indice de leur capacité de former des complexes activateurs de la transcription, d'où leur rôle dans une multitude de processus physiologiques comme l'expression génique, la survie, la différenciation ou la prolifération cellulaire.

## 5. LES INTÉGRINES EXPRIMÉES PAR LES MONOCYTES

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques, qui intègrent les cellules dans leur milieu et médient leur adhérence au tissu conjonctif environnant. Elles sont impliquées dans l'induction sélective des gènes après l'adhérence des monocytes à la matrice externe, et participent au lancement des signaux pour la réponse inflammatoire (Yurochko et al., 1992). Chaque hétérodimère est constitué d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . La chaîne  $\alpha$  peut se combiner à plusieurs familles de chaînes  $\beta$ , et chaque hétérodimère peut lier des ligands différents. À ce jour, on connaît 16 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui par hétérodimérisation forment 20 récepteurs différents. La sous-unité  $\alpha$  est responsable de la spécificité de liaison avec son ligand (revue par Clark and Brugge, 1995; Daniel-Lamazière et al., 1997). Des études d'agrégation des intégrines ont démontré que l'engagement de la sous-unité  $\beta$  induit l'expression de certains ARNm en présence ou absence d'un deuxième stimulus (Yurochko et al., 1992).

Les relations avec la matrice extracellulaire sont complexes et concernent à la fois la membrane basale et les protéines de la matrice extracellulaire. Une caractéristique de certaines intégrines est de reconnaître le motif tripeptidique RGD (arginine-glycine-acide aspartique) contenu dans la séquence du ligand. L'acide aspartique de RGD lie le domaine de cations bivalents de la sous-unité  $\alpha$ .

On distingue les intégrines impliquées dans les contacts cellule/cellule de celles impliquées dans les interactions avec les protéines de la membrane basale. Par exemple, l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  peut se lier indifféremment au VCAM-1 (molécule d'adhérence cellulaire vasculaire-1) pour l'interaction cellule-cellule ou à la fibronectine pour l'interaction cellule-matrice extracellulaire (Daniel-Lamazière et al., 1997). Les contacts cellules-protéines extracellulaires sont caractérisés par la formation d'agrégats appelés points de contact focaux. Les intégrines participent à la cohésion du tissu par l'intégration des cellules à la membrane basale en assurant la continuité entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Durant le développement embryonnaire et la différenciation, les intégrines participent à la migration des cellules vers leurs sites tissulaires et à leur adhérence (revue par Juliano et Haskill, 1993).

L'expression des intégrines est un facteur déterminant dans le phénotype cellulaire, la spécificité d'interaction avec les éléments de la matrice extracellulaire et la capacité invasive et métastatique des cellules. La surexpression de certains récepteurs, en particulier  $\alpha 5\beta 1$ , augmente la différenciation et diminue la tumorigénicité et la migration cellulaire (Stewart et al., 1995). L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  exprimée par les monocytes et les macrophages lie la fibronectine et augmente la capacité phagocytaire des macrophages, probablement par la stimulation du récepteur du complément C. Le traitement des monocytes sanguins avec l'IFN- $\gamma$  et LPS réduit l'expression des sous-unités du récepteur  $\alpha 5\beta 1$  et cet effet dépend de l'état de maturation des cellules. Les agents qui induisent la différenciation des monocytes comme le GM-CSF, le M-CSF et le PMA n'altèrent pas l'expression du récepteur  $\alpha 5\beta 1$  dans une phase précoce de différenciation (Kohn and Klingemann,

1991). Les monocytes humains utilisent l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  pour migrer sur les cellules endothéliales stimulées par l'IL-1, le TNF et le LPS *in vitro* et utilisent les deux voies de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , et de  $\alpha M\beta 2$  pour la migration *in vivo* (Stewart et al., 1995).

Au-delà de leur fonction d'ancrage des molécules d'adhérence à la cellule, les intégrines jouent un rôle déterminant dans la transduction du signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et *vice versa*. Le domaine cytoplasmique court des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  n'a aucune activité enzymatique mais il fonctionne en association avec les protéines du cytosquelette et avec les protéines de signalisation. Les intégrines transmettent le signal par l'intermédiaire des molécules du cytosquelette, en changeant la forme et l'architecture cellulaire (Clark et Brugge, 1995).

Durant le processus de formation des contacts adhésifs, les intégrines s'associent entre elles et avec d'autres molécules et forment des agrégats qui causent la phosphorylation sur la tyrosine de certaines protéines du complexe formé qui semblent être des kinases de la famille de src (revue par Juliano et Haskill, 1993). Les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 3$  peuvent induire l'activation de la kinase spécifique aux contacts focaux, dénommée pp125 fak (kinase des adhérences focales pp125) qui contrôle l'induction sélective des gènes dépendant du ligand de la matrice extracellulaire et du récepteur des intégrines activées. L'adhérence au plastique stimule l'expression d'un grand nombre de gènes de phase aiguë comme cJun, cFos, I $\kappa$ B, MAD-6/A20 et IL-1 $\beta$ , des gènes qui médient la réponse inflammatoire et la défense cellulaire. Cette activation n'est pas aussi forte que l'activation sélective de gènes *in vivo*. Après l'adhérence au plastique l'ajout d'un autre stimulus, comme le PMA par exemple, est très important pour l'induction génique (revue par Juliano et Haskill, 1993).

L'engagement des intégrines produit une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire, et la stimulation des intégrines active la PKC. Le calcium qui est un régulateur du signal intracellulaire et la PKC sont importants

pour l'activation du pp125 fak. L'association de Grb2 et SOS1 avec pp125 fak suggère que les intégrines peuvent réguler Ras et activer la voie de MAPK. RasGAP (protéine d'activation de la GTPase Ras) et la GTPase Rho, semblent intégrer les signaux partis du niveau des intégrines, des récepteurs de facteurs de croissance et des récepteurs de cytokines (Clark et Brugge 1995). L'engagement de VLA-5 (antigènes-5 de l'activation très tardive) dans les lymphocytes, active les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B similaire à l'activation produite par l'adhérence au plastique, ce qui suggère l'existence de deux signaux, au moins, qui régulent l'expression génique dans les monocytes en réponse à l'adhérence à la matrice extracellulaire (revue par Juliano and Haskill 1993).

Les intégrines  $\beta$ 1, dénommées VLA sont exprimées dans plusieurs types cellulaires et lient des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et le collagène, et jouent un rôle dans la migration et l'adhérence. L'intégrine VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1) est le seul membre de cette famille qui reconnaisse les molécules transmembranaires VCAM-1 et elle est impliquée dans l'interaction des lymphocytes avec l'endothélium.

Les intégrines  $\beta$ 2, dénommées leu-CAM (molécules d'adhérence cellulaire des leucocytes) ont une expression restreinte aux leucocytes (lymphocytes T et B, monocytes, granulocytes) et comprennent trois membres comme suit: 1) LFA-1 (antigène associé à la fonction des leucocytes) composé des sous-unités CD11a/CD18, 2) Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2) nommé aussi CR3, composé des sous-unités CD11b/CD18 et exprimé par les monocytes et les granulocytes et 3) p150, 95 (CD11c/CD18) exprimé dans les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques. (van Kooyk et Figdor, 1993; Stewart et al., 1995).

L'expression des intégrines membres de la famille Leu-CAM et de leur ligand ICAM-1 (molécule-1 d'adhérence intercellulaire) dans les monocytes sanguins est changée durant la maturation en macrophages *in vivo* et *in vitro*. La cinétique d'expression des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines Leu-CAM dans les monocytes-macrophages démontre un niveau plus élevé de CD11c et CD11b que

de CD11a. L'expression du CD54 (ICAM-1) est augmentée dans les premières 24 heures. Des changements dans l'expression des molécules d'adhérence dans les monocytes sanguins durant la maturation ou suite à l'activation, reflètent leur rôle différent dans ces cellules.

Les intégrines, en s'associant avec d'autres molécules dans la membrane, peuvent médier la transduction de signaux variés. Par exemple  $\beta 2$  s'associe latéralement avec le récepteur activateur du plasminogène (revue par Stewart et al., 1995) ou d'autres intégrines  $\beta$  s'associent avec les récepteurs "scavengers" A, CD36, Fc $\gamma$ Rs (Récepteurs Fc) et le récepteur de LPS, pour former des complexes avec des fonctions de signalisation (Schmitz et al., 1997). Ceci suggère l'implication des intégrines en synergie avec d'autres récepteurs dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la motilité, de la sécrétion, de l'expression génique et dans l'intégration des cellules dans leur milieu environnant (Clark et Brugge, 1995).

## 6. BUT DE LA PRÉSENTE ÉTUDE

La régulation de l'expression du SR est d'un grand intérêt, vu le rôle important de ce récepteur dans l'internalisation et l'accumulation des esters de cholestérol par les macrophages et leur transformation en cellules spumeuses durant le processus d'athérogenèse.

Notre but est d'étudier l'impact sur l'expression du SR de la stimulation simultanée de deux voies de signalisation ; JAK/STAT par l'IFN- $\gamma$ , et Ras/AP-1 par PMA (THP-1) ou le sérum autologue (monocytes sanguins). Notre approche est de faire l'analyse par RT-PCR et par EMSA du rôle exercé par les facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 sur le contrôle de l'expression du SR, dans les monocytes circulants humains chez des sujets normolipidémiques. Nous comparerons ces résultats avec les résultats obtenus sur les cellules THP-1, dont la régulation de la transcription du SR a été bien décrite par Wu et al., 1994, et Moulton et al., 1994.

Des études antérieures ont mis en évidence un effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR dans les cellules THP-1 et les macrophages humains (Geng et Hansson, 1992; Horvai et al., 1997). Comme les effets de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression de certains gènes dépendent dans bien des cas de l'état de maturation des cellules, nous avons regardé l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR et sur les facteurs de transcription responsables de son activation dans les monocytes humains et les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 dans une phase précoce de développement, avant qu'elles ne soient engagées dans la voie de différenciation.

## IV- MÉTHODES

### 1- Culture cellulaire

Les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Les cellules THP-1 sont maintenues dans une atmosphère humide à 37° C, avec 5% CO<sub>2</sub>, dans le milieu de culture RPMI 1640 (Gibco BRL, Burlington, ONT) enrichi avec 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et 10% de sérum fœtal de veau. Les cellules en suspension ont été mises en culture à la densité de 10<sup>7</sup> cellules dans des plaques de 100 x 20 mm, et ont été incubées avec 100 ng/ml de phorbol myristate acétate (PMA, Gibco BRL) afin de promouvoir leur différenciation. Pour la stimulation simultanée, 175 U/ml (25 ng/ml) d'IFN-γ (IFN-γ recombinant humain, Gibco BRL), ont été ajouté en même temps ou 6 heures après la stimulation des cellules THP-1 avec 100 ng/ml de PMA.

Les cellules mononucléaires primaires ont été isolées du plasma de donateurs bénévoles normolipidémiques, par la technique de centrifugation sous gradient avec Ficoll Paque (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec). Les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS à pH 7,4 et resuspendues dans le DMEM "Dulbecco's modified Eagle's medium" (Gibco BRL) enrichi avec des antibiotiques comme décrit ci-haut. Les cellules en suspension ont été mises en culture à une densité approximative de 2 x 10<sup>6</sup> monocytes dans des plaques à six puits de 35 x 10 mm ou dans des boîtes de 100 x 20 mm (Falcon) et ont été incubées pour 1 heure à 37°C, afin de séparer les monocytes des autres leucocytes, par le processus d'adhérence au plastique. Les cellules adhérentes ont été lavées 3 fois avec DMEM et ont été mises en culture dans du DMEM enrichi avec 30% de sérum autologue. L'IFN-γ a été ajouté dès la mise en culture en présence du SA ou après 6 heures. Le milieu de culture a été changé 1 jour et 4 jours après la mise en culture, à la fois pour les cellules THP-1 et les monocytes sanguins humains.

## 2- Analyse RT-PCR

L'ARN total a été isolé avec le Trizol (Gibco-BRL) selon les instructions du manufacturier et quantifié par spectrophotométrie. L'ARN total (600-1200 ng) a été transformé en ADNc (ADN complémentaire) par la réaction de transcription inverse, en utilisant 200 unités de M-MLV-Reverse Transcriptase (Gibco-BRL) dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,3 contenant 75 mM KCl, 10 nM DTT (Dithiothréitol), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de mélange d'hexanucléotides (62,5 A<sub>266</sub> U/ml, Boehringer Mannheim) et 33 U de RNAsin (Promega) dans un volume final de 20 µl à la température de 45<sup>0</sup> C pour 60 minutes. Pour l'amplification nous avons utilisé 2 µl de la réaction d'ADNc, 200 ng d'oligonucléotides de cJun et ets2, 100 ng d'oligonucléotides de JunB, de STAT1 $\alpha$  et de SR et 50 ng d'oligonucléotides de GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogenase et de L27 (Protéine ribosomale L27)).

L'amplification des fragments a été faite en présence d'un témoin interne, qui a été le GAPDH pour STAT1 $\alpha$ , cJun et le SR, et L27 pour JunB, et ets2. Les oligos spécifiques sens et antisens qui ont été utilisés pour l'amplification des fragments et la longueur des fragments obtenus sont décrits dans le tableau III-1. L'ADNc et les oligos spécifiques ont été incubés avec 5 U de Taq-polymérase (Pharmacia) dans un volume final de 25 µl (dénaturation: 95 <sup>0</sup>C pour 30 sec; hybridation: 60<sup>0</sup>C pour 45 sec pour SR, STAT1 $\alpha$ , cJun, JunB, 57<sup>0</sup>C pour cJun/JunB, et 56<sup>0</sup>C pour ets2, élongation: 72<sup>0</sup>C pour 90 sec). Le nombre de cycles optimal pour chaque amplification a été déterminé comme étant 27 cycles pour JunB et cJun, 26 cycles pour ets2 et 30 cycles pour SR et STAT1 $\alpha$ . Tous les PCR ont été exécutés en duplicata.

Pour le SR, la quantité relative du fragment amplifié a été mesurée par fluorescence dans un gel de polyacrylamide dans le Séquenceur Automatique modèle 373 A (Applied Biosystems). Les fragments amplifiés des facteurs de transcription cJun, JunB, ets2 et STAT1 $\alpha$  ont été mesurés par densitométrie dans un gel d'agarose 2%, en présence de bromure d'éthidium.

L'analyse quantitative des bandes visualisées a été faite par densitométrie par le programme AlphaEase v.3.2, (Alpha Innotech). Les niveaux d'expression de tous les facteurs analysés et du SR total sont exprimés relativement à l'expression du témoin interne.

**Tableau III-1.** Oligonucléotides utilisées pour RT-PCR

cDNA	5'-Oligo	3'-Oligo	fragment (bp)	localisation
SR	TCGCTCAATGACAGCTTT GC*	CCATGTTGCTCATGTGT TCC	290	75-364
Stat1 $\alpha$	TCACATTCACATGGGTG GAGCG	CTCAGGAGACATGGGG AGCAGG	319	2031-2350
cJun	CACGTTAACAGTGGGTG CCAAC	AGACCGAACCCAGTCC AACTTG	201	2203-2382
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGA GTC	CAGAGGGGGCAGAGAT GATG*	376	-2-372
ets2	CAAGAACATCATCCACAA GACG	ATTAGCTGTGCCGTTG CTGCC	330	1569-1880
JunB	CTGGAGGACAAGGTGAA GACGC	CCTACCCTGCGCCCAG TCCTT	316	1139-1455
L27	ACAATCACCTAATGCCCA CAAGG	GCATCTAAAACCGCAG TTTCTGG	186	

Toutes les séquences sont écrites en direction 5'-3'. Les oligonucléotides fluorescents (Hex) sont indiqués par un astérisque.

### 3- Extractions nucléaires

L'extraction des protéines nucléaires a été faite d'après la méthode de Muller et al., 1989. Un nombre total de  $10^7$  de cellules THP-1, et  $4 \times 10^6$  de cellules mononucléaires ont été lavées 1 fois avec PBS, grattées, collectées dans le PBS-1mM EDTA (Acide éthylènediaminetétraacétique) et centrifugées pour 30 secondes à  $1\,500 \times g$ . Le dépôt a été resuspendu dans 200  $\mu$ l du tampon A froid contenant 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA (Acide éthylène bis (oxyéthylèneiotrilo)tétraacétique), 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF,

10 µg/ml pepstatine, 10 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml chemostatine et 10 µg/ml antipaine).

Les cellules ont été laissées dans la glace pour 15 minutes avant d'être lysées en vortexant 10 secondes à la vitesse maximale, en présence de 0,2 % NP-40. L'homogénat obtenu a été ensuite centrifugé pour 40 secondes dans une minifuge à 4<sup>0</sup> C à 1 500 x g. L'extrait nucléaire a été resuspendu dans 30 µl de tampon C froid contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatine, 10 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml chemostatine et 10 µg/ml antipaine). Les échantillons ont été agités vigoureusement durant 1 heure à 4<sup>0</sup>C, centrifugés à la vitesse maximale dans une minifuge à 4<sup>0</sup> C, et le surnageant a été gardé à -70<sup>0</sup>C en aliquotes. Le dosage des protéines nucléaires a été fait par les techniques spécifiques Bradford (Bio-Rad Protein Assay) et Lowry.

#### **4- EMSA ( Electrophoretic Mobility Shift Assay ).**

Pour mesurer la liaison des facteurs de transcription sur le site AP-1/ets et GAS du promoteur du SR, nous avons utilisé 4 µg ou 7 µg des protéines d'extraits nucléaires des cellules qui ont été incubées dans différentes conditions. Nous avons utilisé des oligonucléotides double brin spécifiques au promoteur du SR dont la séquence et localisation sont décrites dans le tableau III-2.

Les extraits nucléaires ont été incubés avec 5 ng (AP-1) ou 5 pmoles (GAS) d'oligonucléotides double brin contenant environ 2 x10<sup>5</sup> cpm de <sup>32</sup>P-γ ATP (Amersham, 800Ci/mme). L'incubation a été faite à la température de la pièce pour 30 minutes, dans un tampon de liaison contenant 12 mM Hepes (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérasineéthanesulfonique) à pH 8,0, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4 mM de Tris, 0,6 mM d'EDTA, 60 mM de KCl, 0,6 mM de DTT, 12% de glycérol (v/v) et 1 µg de poly dIdC (Pharmacia). Le complexe formé a été révélé par migration sur gel d'acrylamide à 6% à 4<sup>0</sup>C, à 200V pour 3-4 heures dans du 0,5 x TBE.

La spécificité de la réaction a été confirmée par compétition avec un excès (100X) d'oligonucléotides spécifiques et non-spécifiques. Nous avons utilisé comme témoin positif pour le site AP-1/ets un site consensus AP-1 et pour GAS un site consensus IP-10. Après l'électrophorèse, le gel a été séché sous vide et exposé sur un film X-Omat XK-1.

**Tableau III-2.** Oligonucléotides utilisées pour EMSA

ADNc	Localisation	Sens	Antisense
AP-1/ets	-67 à -50	GAAAGGAAATGACACATTC	GAATGTGTCATTTCCCTTC
GAS-125	-133 à -125	TTAGATTTTGCAAACGTG	CAGGTTTGCAAATCTAAAT
GAS-805	-813 à -805	CTCCTGGGTTCAAGCAATTC	GAATTGCTTGAACCCAGGAG
hGBP	-125 à -101	TCAGTTTCATATTACTCTAAAT CCA	TGGATTTAGAGTAATATGAAA CTGA
IP-10	-248 à -211	TTTTTTTCAAGAAACAGTTCAT GTTTTGGAAAGTGAA	TTCACTTTCCAAAACATGAAC TGTTTCTTGAAAAAAA
AP-1- consensus		GATCCGATGAGTCAGCCA	TGGCTGACTCATCGGATC

Toutes les séquences sont écrites en direction 5'-3'.

## 5- Phénotype de cellules THP-1 et microscopie

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de 100 ng/ml PMA dans des plaques de Pétri P60 à une densité de  $3 \times 10^5$  cellules/plaque en duplicata pour chaque temps de différenciation. L'IFN- $\gamma$  (175U) a été ajouté 6 heures après la mise en plaque. Aux temps indiqués dans les résultats, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et fixées dans la formaldéhyde à 10% pour 1 heure à la température de la pièce. Les cellules ont ensuite été lavées 5 minutes avec de l'eau distillée et 5 minutes (2 fois) avec du propylène glycol à 85%. La coloration spécifique des lipides avec le "Oil red O" a été faite pour 7 minutes suivie d'un lavage avec le propylène glycol pour 3 minutes. Après un autre lavage à l'eau distillée pour 15 minutes les noyaux ont été colorés avec de l'hématoxyline Harris durant 5 minutes. Finalement après un dernier lavage de 15 minutes, les plaques ont été séchées et préparées pour l'analyse microscopique.

Nous avons ajouté à la lamelle 2 gouttes de glycérol à 90% dans un tampon à 10% TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,9% NaCl) et on a procédé à l'examen microscopique par le système d'imagerie "Zeiss Axiophot-Northern Eclipse". Le nombre de cellules différenciées en présence de PMA seul et en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  a été établi à différents temps par décompte cellulaire d'environ 80 cellules par expérience. L'expérience a été répétée 3 fois et les résultats représentent le pourcentage de cellules différenciées en moyenne, pour chaque condition.

## **6- SDS-PAGE et Immunobuvardage pour les intégrines** (fait en collaboration avec le groupe du laboratoire de biologie cellulaire et de l'hypertension - IRCM).

Les cellules THP-1 ont été traitées par le PMA seul, le PMA et l'IFN- $\gamma$ , ou l'IFN- $\gamma$  seul. Les cellules ont été incubées dans une atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>, à 37° C, dans le milieu de culture RPMI 1640 (Gibco BRL Burlington, ONT), enrichi avec 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et 10% de sérum fœtal de veau. Les cellules en suspension ont été mises en culture à la densité de  $2 \times 10^6$  cellules dans des plaques à six puits de 35 x 10 mm, et ont été traitées par 100 ng/ml de PMA seul, 100 ng de PMA plus 175 U d'IFN- $\gamma$  ou 175 U d'IFN- $\gamma$  seul. Nous avons procédé à l'extraction des protéines cellulaires des cellules en suspension sans PMA comme témoin négatif, et des cellules stimulées, à 24 heures après la mise en culture. Les cellules ont été lavées avec le tampon HEPES 0,05 M, pH 7,4, une fois et la lyse cellulaire a été faite avec un tampon de lyse contenant 0,05 M d'Hepes pH 7,4, 1% de Nonidet P- 40, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, et 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. L'identification des intégrines a été faite par SDS-PAGE, par une technique spécifique qui met en évidence les complexes formés entre les désintégrines qui possèdent un motif RGD et les intégrines qui reconnaissent ce motif. La technique a été mise au point et exécuté par le Dr G. Thibault (manuscrit décrivant la technique soumis pour publication, Thibault 1999). Après une centrifugation de 3 min à 15 000 rpm, les protéines ont été mesurées par la méthode Bradford (Bio-Rad). Quinze  $\mu$ g de protéines ont été incubées à la

température de la pièce pour 90 minutes avec  $1,25 \times 10^{-8}$  M d'échistatine marquée à  $^{125}\text{I}$  (250 000 cpm) dans un tampon 0,05 M Hepes à pH 7,4, contenant 5 mM  $\text{MnCl}_2$ , dans un volume final de 20  $\mu\text{l}$ . Après incubation et dilution dans une solution contenant 0,188 M de Tris-HCl à pH 6,8, 30 % de glycérol, 6 % de SDS et 0,15 % de bleu de bromophénol, les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (Leamlli), dans un gel de polyacrylamide à 6 %. Les protéines ont été colorées avec 0,05% de Coomassie R-250 dans une solution 5:1:5 méthanol : acide acétique : eau. Le gel a été séché, et soumis à l'autoradiographie pour 2-3 heures sur un film X-Omat AR-5.

Dans le cas d'immunobuvardage, après SDS-PAGE les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Canada Ltd, Oakville, ON), dans le tampon Tris-glycine, contenant 20 % de méthanol. La membrane a été exposée sur un film X-Omat AR-5 et utilisée pour immunobuvardage. L'incubation de la membrane avec les anticorps anti- $\alpha 5$  et anti- $\beta 1$  a été effectuée pour 90 minutes après avoir été saturée 60 minutes dans un tampon 0,05 M  $\text{NaPO}_4$ , à pH 7,4, contenant 0,154 M de NaCl, 0,05 % de Tween 20, 0,1 % de polyvinyl pyrrolidone 40 et additionné de 1 % en polyvinyl pyrrolidone 40. La liaison des anticorps primaires a été visualisée par des IgG anti-souris couplés à la peroxydase et a été révélée par chimiluminescence (Amersham).

## **7- Graphiques et statistiques**

Les données obtenues suite à l'analyse quantitative de l'ARNm par RT-PCR et de l'analyse du phénotype ont été interprétées et présentées graphiquement dans les programmes informatiques EXCEL 97, SIGMA PLOT v2, SIGMA STAT v2, POWER POINT 97, AdobePhotoshop v4 et AlphaEase v3.2. Les analyses statistiques appliqués sont notées dans les légendes des résultats.

## **IV- RÉSULTATS**

### **1- COMPARAISON DE L'EXPRESSION DU GÈNE DU SR DANS LES CELLULES THP-1 ET LES MONOCYTES SANGUINS HUMAINS**

#### **1.1- Contrôle de l'expression du gène du SR dans les cellules THP-1**

Avant de pouvoir évaluer la régulation de la transcription du SR dans les monocytes circulants humains, nous avons commencé nos études sur les cellules THP-1. Ces cellules représentent un modèle cellulaire monocyttaire fréquemment utilisé dans des études de différenciation des macrophages. Le passage de l'état de monocyte à celui de macrophage est induit par le PMA. Elles sont aussi un bon modèle pour l'étude de l'expression du SR, parce que sa transcription est rapidement induite après le traitement des cellules avec le PMA (Moulton et al., 1994; Wu et al., 1999).

Nous avons d'abord vérifié l'expression du SR dans les cellules THP-1, dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire lorsque les cellules sont mises en culture en présence de PMA (100ng/ml) pour des durées plus ou moins longues. L'analyse de la quantité relative du fragment d'ADN amplifié par RT-PCR démontre que le pic d'ARNm pour le SR se situe à 18 heures après la mise en culture des cellules en présence de PMA, et il reste constant après 24 heures (figure IV-1). Comme il a été démontré que les facteurs de transcription critiques pour la transcription du SR dans les cellules THP-1 sont les protéines du complexe AP-1 et ets2, (Wu et al., 1994), nous avons étudié la cinétique d'expression des facteurs cJun, JunB et ets2, suite à la stimulation de ces cellules avec le PMA.

Nous avons voulu déterminer s'il existait une corrélation entre l'expression de ces facteurs et l'expression du SR, durant la différenciation des cellules THP-1. Comme l'expression du SR atteint un maximum avant 24 heures (figure IV-1), nous avons étudié, dans une première étape, la cinétique d'expression de cJun, JunB et ets2 dans les premières 24 heures après stimulation avec le PMA.

Nos résultats révèlent que dans les cellules THP-1 l'expression maximale de l'ARNm de cJun, JunB et ets2 se produit dès la première heure après la mise en culture et le traitement avec PMA (figure IV-2). L'expression de l'ARNm de cJun semble être biphasique, un premier pic se produisant 1 heure après la mise en culture et l'autre, plus petit, se produisant entre 6 et 10 heures après la mise en culture. Pour l'ARNm de JunB, le maximum d'expression est à 0,50 heure et diminue ensuite lentement. Le pic d'ARNm pour ets2 se produit 1 heure après la mise en culture des cellules puis diminue et son expression semble être constante jusqu'à 24 heures.

Des résultats similaires sur l'induction des facteurs cJun et JunB ont été rapportés dans les lignées cellulaires monocytaires U937 et HL-60 (Szabo et al., 1991). Dans les cellules U937, l'expression de cJun a deux pics ; l'un à 1 heure et l'autre à 24 heures après la mise en culture en présence de PMA. Le pic d'expression de JunB est décelé 1 heure après la mise en culture et diminue lentement par la suite. Cjun semble augmenter pendant que JunB diminue vers 24 heures de différenciation dans les cellules U937. Par contre dans les cellules HL-60, JunB à la même cinétique d'expression que celle que nous avons observée dans les cellules THP-1, alors que cJun présente un pic étendu sur un intervalle de plusieurs heures, entre 10 heures et 120 heures, après la mise en culture en présence de PMA. L'expression de ces facteurs serait donc spécifique pour chaque type de cellule. Nos résultats montrent que l'expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 dans les cellules THP-1 est induite très rapidement après la stimulation avec le PMA, avec un maximum situé à environ 1 heure et bien avant l'initiation de la transcription du SR située à 12 heures après la mise en culture. Ces résultats suggèrent l'existence d'une corrélation entre les cinétiques d'expression du SR et celle des facteurs que nous étudions et elle est compatible avec leur rôle en tant que facteurs responsables de l'activation de la transcription du SR.

Le pic d'expression de l'ARNm ne donne aucune indication de l'activation des facteurs de transcription, puisque celle-ci se produit suite à une série de

modifications post-transcriptionnelles. Une bonne mesure de leur activation est de déterminer leur liaison sur le site AP-1/ets du promoteur du SR.

Pour ce faire, nous avons effectué une cinétique de différenciation des cellules THP-1, suivie de l'extraction des protéines nucléaires dans des conditions de culture identiques à celles utilisées dans la cinétique d'expression des facteurs Jun et ets. Dans nos conditions expérimentales, l'activité de liaison des protéines AP-1 et ets2 sur leur site du promoteur du SR est détectable par EMSA, environ 9 heures après la mise en culture des cellules THP-1 stimulées par le PMA. Un maximum de liaison est observé 16 heures après la mise en culture et l'occupation du site reste constante pour toute la durée de nos expériences, soit 7 jours (figure IV-3). Les résultats obtenus sont conformes aux résultats rapportés par le groupe de Wu en 1994, concernant la régulation de la transcription du SR par les facteurs AP-1 (cJun, JunB) et ets2 dans les cellules THP-1, traitées avec le PMA.

L'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR par les protéines nucléaires (après environ 9 heures) se produit peu avant l'apparition du pic de l'ARNm du SR à 18 heures, ce qui suggère une concordance entre l'occupation du site AP-1/ets et la transcription du SR et ceci vient renforcer l'importance des protéines AP-1/ets dans la régulation de la réponse transcriptionnelle du SR. Nos résultats démontrent l'existence d'une corrélation positive entre la transcription rapide des facteurs AP-1 et ets2, leur traduction et leur activation et l'induction de la transcription du SR dans les cellules THP-1.

Deux groupes de chercheurs (Schütte et al., 1989; Deng et al., 1993) ont mis en évidence l'effet répressif et inhibiteur de JunB sur cJun, par la formation d'hétérodimères inactifs ou possédant une capacité réduite d'activation de la transcription. Un changement du rapport cJun/JunB en faveur de cJun pourrait favoriser la formation de complexes plus actifs et pourrait nous donner une information sur la possibilité d'activation de cJun, le composant central de tous les complexes AP-1. Même s'il y a des variations d'expression de ces deux facteurs une co-amplification dans le même tube, nous permet d'évaluer le vrai rapport

entre cJun et JunB à chaque temps de la cinétique d'expression. Cela nous donne une idée de leur importance dans la formation de dimères actifs.

Nous avons donc regardé si, dans nos cellules, il se produit un changement du rapport cJun/JunB et si ce changement est en concordance avec l'activation des protéines Cjun et JunB de même qu'avec l'induction du SR. Nous avons fait une co-amplification par RT-PCR (dans le même tube) des fragments de ces deux facteurs à partir de l'ARNm extraits de cellules THP-1 à différents temps d'incubation. Chaque fragment peut ainsi servir de témoin interne pour l'autre. Les résultats obtenus démontrent qu'il y a un changement du rapport cJun/JunB, en faveur de cJun environ 4 heures après la mise en culture. Ce changement est statistiquement significatif, et se produit avant l'activation des protéines Jun et leur liaison sur l'ADN (figure IV-4). Ce changement pourrait donc être lié à l'activation des facteurs Jun et à l'induction du SR. Les mêmes conditions d'expression du facteur ets2 durant 7 jours démontre que le facteur ets2 garde un niveau constant d'expression avec des oscillations nonsignificatives (figure IV-4 ). Ces résultats fournissent un argument de plus pour l'implication des facteurs AP-1 et ets2 dans la réponse transcriptionnelle du SR dans les cellules THP-1 stimulées par le PMA.

## **1.2- Contrôle de l'expression du gène du SR dans les monocytes circulants humains**

La régulation de la différenciation et de la transcription du SR dans les monocytes sanguins humains n'a pas été étudiée de façon aussi approfondie que dans les cellules THP-1. Il est donc intéressant et pertinent d'explorer la régulation de l'expression du SR durant la maturation des monocytes sanguins et de la comparer avec celle des cellules de la lignée monocyttaire THP-1. Cette étude pourrait nous donner plus d'informations sur les facteurs responsables de l'activation du SR durant la transformation des monocytes sanguins en macrophages et aussi sur l'apparition des cellules spumeuses dans l'athérosclérose.

Nous avons présumé que les facteurs de transcription qui sont impliqués dans la transcription du SR dans les cellules THP-1, sont aussi impliqués dans la maturation des monocytes humains en macrophages.

Conséquemment les monocytes isolés du plasma de donneurs bénévoles normolipidémiques ont été mis en culture en présence de sérum autologue (SA), et nous avons étudié la cinétique d'expression du SR et des facteurs cJun, JunB et ets2 de la même façon que pour les cellules THP-1.

Nos résultats indiquent que l'expression du SR durant leur maturation est déplacée dans le temps comparé aux cellules THP-1. L'expression du SR est présente dès la mise en plaque (niveau basal) et augmente progressivement après 24 heures en culture durant toute la période d'observation de nos expériences, soit 4 jours (figure IV-5). Il est important de noter que, contrairement aux cellules THP-1 qui n'expriment pas de SR en absence de PMA, l'expression du SR dans les monocytes humains est détectable dès la mise en plaque. L'expression du SR est très variable et les différences interindividuelles peuvent être aussi grandes que 10 à 20 fois le niveau basal. Le niveau d'expression atteint à maturation varie aussi et dépend du niveau basal. L'induction du SR, se produit de toute évidence toujours, après quelques jours en culture en présence de SA, et augmente de façon graduelle pour tous les individus. Cette induction est différente de l'induction du SR dans les cellules THP-1 traitées avec le PMA qui se fait très tôt, dans les premières 24 heures de culture et reste constante durant 7 jours.

La cinétique d'expression des facteurs cJun, JunB et ets2, dans les premières 24 heures varie d'un individu à l'autre. Pour cJun et ets2, il est difficile d'établir l'existence d'un pic ; il semble plutôt y avoir une expression uniforme dans les premières 24 heures. JunB a une expression élevée dès la mise en culture qui diminue lentement dans les 24 heures qui suivent (figure IV- 6). Dans les premières 24 heures il n'existe donc pas vraiment de pic d'expression des facteurs de transcription AP-1 dans les monocytes sanguins. Ceci semble raisonnable puisqu'il n'y a pas d'activation de la transcription du SR durant ce temps. L'analyse des résultats obtenus par EMSA avec des extraits nucléaires de monocytes

circulants humains, démontre aussi qu'il n'y a pas de liaison sur le site AP-1 du promoteur du SR, et par conséquent pas d'activation des facteurs de transcription dans les premières 24 heures de culture (figure IV-7).

L'expression des facteurs cJun, JunB et ets2 et la liaison de ces mêmes facteurs sur le site AP-1 du promoteur du SR suivent une cinétique similaire. Nos gels de retard démontrent que l'activation des facteurs à l'étude, dans les monocytes humains est décelable entre 96 heures et 168 heures en culture en présence du SA. Cette activation présente des variations interindividuelles et peut se produire à 4 ou à 7 jours après la mise en culture. Dans tous les cas étudiés la liaison est indécélable avant 4 jours (figure IV-7). Le témoin positif représente le site AP-1/ets occupé par les protéines AP-1/ets dans les cellules THP-1, 16 heures après la mise en culture.

Étant donné ces résultats, nous avons étudié la cinétique d'expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets sur une période plus longue, soit pendant 7 jours. Le rapport cJun/JunB augmente entre 24 heures et 7 jours (figure IV-8 A ). Il existe donc une différence entre les cellules THP-1 qui ont un changement du rapport cJun/JunB situé à 4 heures après la mise en culture en PMA (figure II-4) et les monocytes humains où ce rapport est à son minimum à 4 - 5 heures et augmente après 48 heures de culture en présence de SA. Pour donner plus de force à notre analyse nous avons répété l'expérience sur les monocytes de 20 sujets normolipidémiques. Chez les 20 sujets où nous avons regardé l'expression de cJun/JunB et ets2, à 1 jour, 4 jours et 7 jours après la mise en culture, nous avons observé des variations individuelles d'induction de ces facteurs. Ces variations d'expression sont quantitatives mais aussi temporelles ; elles surviennent de 4 à 7 jours après la mise en culture pour cJun/JunB (figure IV-8 A) et de 1 à 4 jours pour ets2 (figure IV-8 B).

La figure IV-8 illustre deux exemples des variations interindividuelles dans l'expression des facteurs Jun et ets2. Même si on trouve des variations interindividuelles, l'interprétation statistique de nos expériences met en évidence l'existence d'une corrélation très étroite, à 24 heures de culture, entre l'expression

de cJun et celle du SR ( $r=0,948$ ,  $p=0,004$ ) de même qu'entre l'expression de ets2 et SR ( $r=0,700$ ,  $p=0,01$ ) (figure IV-9 A et C).

Ces résultats indiquent que les facteurs de transcription cJun et ets2 sont impliqués positivement dans la transcription du SR dans les monocytes humains. Au contraire, entre l'expression de junB et celle du SR il n'y a pas de corrélation ( $r=0,30$ ,  $p=0,3$ ) (figure IV-9 B).

Nos résultats démontrent que les facteurs impliqués dans l'activation du SR appartiennent à la famille AP-1 et ets puisqu'ils se lient au site AP-1/ets spécifique du promoteur du SR. Leur liaison se produit à des temps qui correspondent à l'augmentation de l'expression du SR dans nos conditions expérimentales.

## **2- L'EFFET DE L'IFN- $\gamma$ SUR LA TRANSCRIPTION DU GÈNE DU SR EN ASSOCIATION AVEC LE PMA DANS LES CELLULES THP-1 ET AVEC LE SA DANS LES MONOCYTES HUMAINS**

### **2.1. L'effet de l'IFN- $\gamma$ sur la transcription du gène du SR dans les cellules THP-1**

Comme nos études visent aussi à comparer les réponses transcriptionnelles à la stimulation simultanée de deux voies de signalisation (AP-1/Ras et STAT/JAK), nous avons étudié la réponse des cellules THP-1 à la stimulation par l'IFN- $\gamma$  et le PMA. Des études antérieures concernant l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR dans les cellules THP-1 et les macrophages humains indiquent que l'IFN- $\gamma$  inhibe la transcription du SR et l'activité du complexe AP-1/ets (Geng et Hansson, 1992). Cependant, des expériences réalisées dans notre laboratoire ont récemment démontré que l'effet de l'IFN- $\gamma$  est dépendant de l'état de maturation des cellules; l'effet est différent selon qu'il est ajouté à des monocytes ou à des macrophages. De plus, l'effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  est de courte durée (Grewal et al., manuscrit en préparation).

Nous avons donc regardé l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression des facteurs de transcription cJun, JunB, ets2 et STAT1 $\alpha$  impliqués dans la transcription du SR dans les cellules THP-1. Nous avons regardé l'effet de l'IFN- $\gamma$  dans deux conditions ; d'abord dans une phase précoce de différenciation, soit dans les premières 24 heures, après la mise en culture et ensuite dans une phase avancée de différenciation, soit jusqu'à 7 jours après la mise en culture.

Chez les cellules traitées dès la mise en culture avec le PMA et l'IFN- $\gamma$ , on observe une stimulation statistiquement significative de la transcription du SR, dans les premières 24 heures (figure IV-10).

STAT1 $\alpha$  est le facteur de transcription activé par l'IFN- $\gamma$ . Son activation conduit à la transcription des gènes régulés par l'IFN- $\gamma$ . Par RT-PCR, nous avons déterminé la quantité relative du fragment amplifié, et nous avons observé une induction élevée de l'ARNm de ce facteur après la stimulation des cellules THP-1 avec PMA et IFN- $\gamma$  par rapport à la stimulation avec le PMA seul, où il y a un niveau très faible et constant de STAT1 $\alpha$  (figure IV-11 ). Nous n'avons pas mesuré l'activation de la protéine STAT1 $\alpha$  par la phosphorylation.

Étant donné l'effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR dans les premières 24 heures après la mise en culture, nous avons regardé l'expression des facteurs cJun, JunB, et ets2 dans les mêmes conditions de stimulation. L'expression des facteurs de transcription cJun et JunB n'est pas influencée par le traitement des cellules THP-1 avec IFN- $\gamma$  (figure II-12 A). L'expression du facteur ets2 semble augmenter en présence de l'IFN- $\gamma$ , mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative (figure IV-12 B).

Ces résultats indiquent que l'IFN- $\gamma$  n'exerce pas un effet positif sur les niveaux de l'ARNm des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2. Nous avons donc émis l'hypothèse que la stimulation de la transcription du SR observée en présence d'IFN- $\gamma$  ne s'exerçait pas par l'intermédiaire des facteurs AP-1, mais

qu'elle était plutôt due à un effet positif direct sur la transcription du gène du SR. L'effet de l'IFN- $\gamma$  sur la transcription s'exerce par la liaison du facteur STAT1 $\alpha$  sur un site GAS (gamma interferon activated site) du promoteur des gènes cibles. Dans cette optique, nous avons recherché dans la séquence connue du promoteur du SR la présence d'un site consensus GAS. Nous en avons identifié deux : le premier situé de - 133 à -125 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription, dans le domaine II du promoteur et un autre situé de - 805 à - 813 pb dans l'amplificateur du SR.

Nous avons vérifié l'occupation de ces sites par EMSA, suite à une cinétique de différenciation des cellules THP-1 mises en culture en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  qui a été ajouté 6 heures plus tard. Nos résultats démontrent que le site GAS de l'amplificateur n'est pas actif, mais le site GAS du promoteur du SR est occupé très tôt, 9 h après la mise en culture avec un maximum de liaison à 12 heures (figure IV-13). L'occupation du site GAS du promoteur du SR diminue progressivement après 24 heures. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que l'IFN- $\gamma$  exerce un effet direct, positif sur la transcription du SR et que cet effet est de courte durée.

Ayant déjà démontré que l'IFN- $\gamma$  n'augmente pas la transcription des facteurs AP-1, il reste à déterminer si l'occupation d'un site actif GAS exerce un effet positif sur la liaison des protéines AP-1 et ets2 sur le site AP-1/ets du promoteur du SR. Le site GAS du promoteur du SR est situé à quelques dizaines de paires de bases en amont du site AP-1. L'occupation du site GAS, probablement par STAT1 $\alpha$ , pourrait influencer la liaison des facteurs AP-1 à leur site. La présence d'un site AP-1 et un site GAS l'un à côté de l'autre dans le promoteur de l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-1 par exemple, résulte en une coopération pour la transcription du gène (Bugno et al., 1995).

En suivant la même cinétique de différenciation des cellules THP-1 en présence de PMA et IFN- $\gamma$ , nous avons vérifié par EMSA la liaison des facteurs AP-1 et ets2 sur le site AP-1 du promoteur du SR. Nous avons observé, que dans

les premières 24 heures après la mise en culture, l'IFN- $\gamma$  semble avoir un effet positif sur l'occupation du site AP-1, probablement dû à l'occupation du site GAS. Nos observations nous permettent de tirer la conclusion qu'il n'y a pas d'effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  sur l'activité du complexe AP-1 dans le promoteur du SR, dans les 24 heures après la mise en culture (figure IV-14). Par contre, si l'IFN- $\gamma$  agit plus longtemps sur les cellules en culture, par exemple durant 7 jours, on observe un effet inhibiteur sur l'occupation du site AP-1/ets.

L'existence d'un site GAS actif dans le promoteur du SR et son occupation suggèrent que l'IFN- $\gamma$  est impliqué dans la régulation de l'expression du SR, et que son action sur le niveau de l'ARNm du SR, est dépendante de l'état de maturation des cellules. Des expériences de notre groupe de recherche ont démontré que l'addition d'IFN- $\gamma$  plus tard que 24 heures après la mise en culture des cellules THP-1 en présence de PMA avait un effet inhibiteur sur le SR.

Quel effet exerce l'IFN- $\gamma$  sur l'expression des facteurs AP-1/ets quand il est ajouté 24 heures après la mise en culture ? Comme on peut voir dans la figure IV-1, l'expression du SR est déjà à son maximum 24 heures après la mise en culture en présence de PMA. L'IFN- $\gamma$  ajouté dans une phase avancée d'expression du SR et de différenciation des cellules THP-1, n'a aucun effet sur l'expression des facteurs AP-1 et ets2 mais il a un effet inhibiteur sur leur liaison sur le site AP-1/ets, similaire à l'effet observé après une longue incubation des cellules avec l'IFN- $\gamma$ , comme on voit dans les figures IV-12 et IV-14. Nos résultats viennent renforcer l'idée que l'effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  s'exerce dans les macrophages et non pas dans les monocytes circulants non différenciés.

L'activation simultanée de deux voies de signalisation Ras/AP-1 et JAK/STAT par le traitement des cellules THP-1 non différenciées avec le PMA et l'IFN- $\gamma$  pourrait avoir un effet synergique sur l'expression du SR et pourrait conduire à la maturation et la transformation précoce des cellules THP-1 en macrophages.

Dans l'hypothèse que l'IFN- $\gamma$  en synergie avec le PMA pourraient provoquer une maturation plus rapide des cellules, nous avons utilisé la technique de coloration avec «Oil red O», spécifique aux lipides pour étudier le phénotype des cellules THP-1 durant leur maturation. Les critères d'appréciation de la maturation des cellules ont été établis tenant compte du changement de la taille et de la forme des cellules, de la forme du noyau, de la présence des prolongations cytoplasmiques et de la quantité des lipides internalisés dans les cellules THP-1 durant 7 jours. Nos résultats sont illustrés dans la figure IV-15 A et B.

En présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  on peut observer une légère augmentation de 10% du nombre des cellules matures, dans les premières 24 heures après la mise en culture, comparée aux cellules cultivées en présence de PMA seul (figure IV-15 C).

On observe plus rapidement l'apparition de cellules avec des noyaux irréguliers, un corps cellulaire plus gros avec des extensions cytoplasmiques, la présence de plusieurs vacuoles et l'augmentation de la quantité de lipides ingérés (figure IV-15 A et B). Ceci, et la présence de groupes de cellules agglomérées, suggère un début plus précoce de l'acquisition d'une morphologie typique des macrophages chez les cellules mises en culture en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$ . Même si la différence n'est pas statistiquement significative, l'effet positif de l'IFN- $\gamma$  sur la différenciation des cellules pourrait être le résultat de l'expression plus précoce et augmentée du SR que l'on a pu observer dans la figure IV-10.

## **2.2- L'effet de l'IFN- $\gamma$ sur la transcription du gène du SR dans les monocytes circulants humains**

Un autre volet de notre recherche visait à évaluer l'influence de l'IFN- $\gamma$  sur la transcription du SR et sur les facteurs de transcription STAT, cJun, JunB et ets2, dans les monocytes circulants humains. Les monocytes sanguins ont été isolés du plasma de donneurs bénévoles, normolipidémiques. Après 1 heure d'adhérence,

les monocytes humains ont été placés en présence de sérum autologue (SA) avec ou sans IFN- $\gamma$ . Nous avons suivi une cinétique de différenciation jusqu'à 4 jours.

Des observations antérieures sur l'expression du SR dans les monocytes sanguins humains ont montré que l'expression du SR demeure à un niveau faible durant les premières 24 heures en culture et que son induction se produit après 2 ou 4 jours en moyenne (figure IV-5). Il existe cependant une grande variation interindividuelle et pour le niveau basal d'expression et pour le temps d'induction.

La figure IV-16 illustre l'expression du SR dans les monocytes humains cultivés en présence d'IFN- $\gamma$  comparé à l'expression du SR dans les mêmes monocytes cultivés dans SA seul. L'expression du SR est augmentée après 6 heures en culture, en réponse à l'IFN- $\gamma$ , comparativement à son expression après 6 heures en SA seul. L'induction du SR continue à augmenter dans les 24 heures suivantes dans les monocytes traités avec SA et l'IFN- $\gamma$ .

Cet effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  sur le SR, se manifeste chez les monocytes mais non chez les macrophages. Nos résultats démontrent en effet qu'après 4 jours en présence d'IFN- $\gamma$ , il y a une inhibition du SR. Cette inhibition se produit quand les monocytes humains sont dans une phase déjà avancée de différenciation en macrophages.

L'effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR est similaire à celui observé sur les cellules THP-1, où, comme on avait noté dans le chapitre précédent (figure IV-10), l'expression du SR est augmentée dans les premières 24 heures en culture en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$ . Ces observations révèlent un effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR autant dans les monocytes sanguins humains que dans les cellules THP-1. Le déplacement de la courbe d'induction du SR vers la gauche observé après traitement simultané des monocytes avec le SA et l'IFN- $\gamma$  signifie probablement que l'IFN- $\gamma$  contribue à la maturation précoce de ces cellules.

Comme nous l'avions fait pour les cellules THP-1, nous avons analysé l'effet sur l'induction des facteurs cJun, JunB, et ets2, du traitement des monocytes sanguins humains avec l'IFN- $\gamma$ , aussi bien que l'effet sur l'activation et la liaison de ces facteurs sur le site AP-1/ets du promoteur du SR.

Nous avons utilisé les monocytes des 5 même sujets qui ont servi à l'analyse de l'expression du SR. L'ARNm et les protéines nucléaires ont été extraites durant une cinétique de différenciation des monocytes en présence de SA et d'IFN- $\gamma$ . L'expression des facteurs de transcription AP-1/ets demeure constante, présentant de faibles variations interindividuelles (figure IV-17). Comme pour les cellules THP-1, l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression des facteurs AP-1 et ets2 ne s'exerce pas au niveau de l'ARNm. Nos résultats ne nous permettent pas de dire s'il y a une activation ou une inhibition à ce niveau.

Le facteur de transcription STAT est induit dans les monocytes humains dès la mise en culture en présence de SA et l'IFN- $\gamma$  comparé à son expression en présence de SA seul, similaire à l'induction observée chez les cellules THP-1 (figure IV-11).

L'analyse par EMSA de l'occupation du site GAS, dans les monocytes circulants stimulés avec le SA et l'IFN- $\gamma$ , démontre que l'occupation du site se produit très tôt, puisque à 6 heures après la mise en culture, on décèle déjà l'occupation. Celle-ci doit se produire encore plus tôt, mais nous n'avons pas mesuré son occupation avant 6 heures de culture. L'occupation du site GAS est maintenue jusqu'à 48 heures. Après 96 heures en culture l'occupation du site GAS du promoteur du SR n'est plus décelable dans nos conditions expérimentales (figure IV-18). La cinétique d'occupation du site GAS est en accord avec nos observations que la stimulation de l'expression du SR par l'IFN- $\gamma$  ne se produit que chez les monocytes et qu'après la différenciation en macrophages il n'y a plus d'activation.

L'analyse par EMSA de la liaison des facteurs AP-1/ets sur le site du promoteur du SR démontre un effet positif très important de l'IFN- $\gamma$  sur l'activation de ces facteurs. La liaison des facteurs AP-1/ets est beaucoup plus rapide sur le site AP-1/ets ; elle se produit dès les premières 6 heures en culture (figure IV-19), comparée à 96 heures en absence d'IFN- $\gamma$  (figure IV-7). Nos résultats démontrent que l'addition simultanée de SA et d'IFN- $\gamma$  à des monocytes circulants augmente l'expression du SR et ce phénomène peut être expliqué par une augmentation de la liaison du site AP-1. De plus, ces résultats suggèrent l'existence d'interactions entre les voies de signalisation amorcées par l'adhérence des monocytes en présence de sérum autologue et celles amorcées par l'IFN- $\gamma$ .

En résumé nos résultats démontrent que la stimulation simultanée des monocytes sanguins humains par SA et l'IFN- $\gamma$  a un effet positif sur l'activation de la transcription du SR probablement dû à une augmentation de liaison des facteurs AP-1/ets sur le site du promoteur du SR, et à l'occupation du site GAS. Nos résultats révèlent que la stimulation simultanée de la voie de Ras/AP-1 par SA et de la voie de l'IFN- $\gamma$ , quant elle se fait à une étape précoce de différenciation des monocytes humains produit un effet de coopération entre les facteurs de transcription impliqués dans l'activation du SR. Cette synergie entre les deux voies de signalisation implique les facteurs de transcription STAT et AP-1, et a comme effet l'augmentation de la transcription du SR.

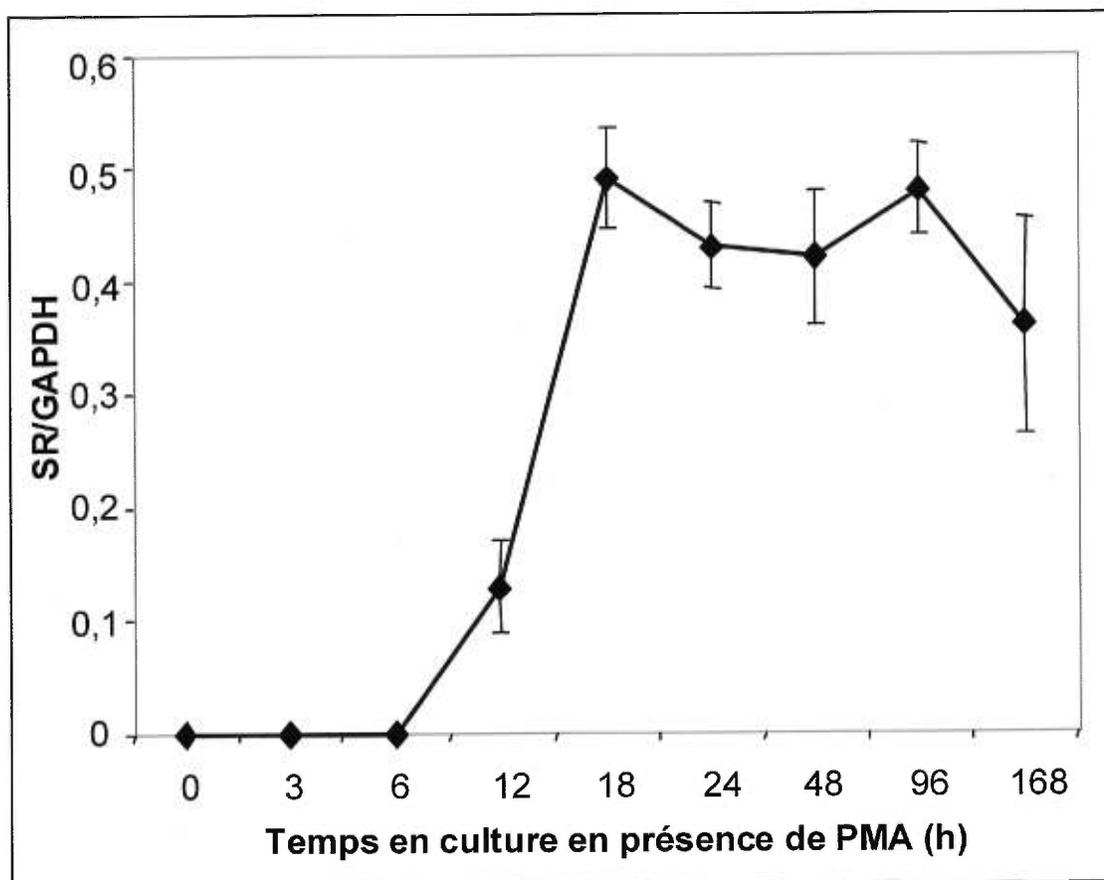
L'effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  sur la transcription du SR dépend de l'état de maturation des monocytes, et de sa durée d'action en culture. Une courte application au début du processus de différenciation a un effet positif alors qu'une application prolongée est inhibitrice. L'effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  en dose prolongée est lié à la différenciation des cellules puisque plus longtemps les cellules sont en culture plus elles se différencient.

### 3- EXPRESSION DES INTÉGRINES DANS LES CELLULES THP-1.

L'adhérence est reconnue comme étant un facteur très important pour la transmission du signal de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur et *vice versa*. L'engagement des intégrines est un phénomène qui détermine à la fois l'adhérence des cellules, l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C. Le calcium et PKC sont importants pour l'activation de pp125 fak, une kinase spécifique aux intégrines. Cette kinase s'associe avec Grb2 et SOS1, qui sont des facteurs importants dans l'activation de la voie de MAPK/JNK/ERK pour activer les facteurs de transcription Jun, Fos et autres facteurs de phase aiguë (revue par Clark et Brugge 1995).

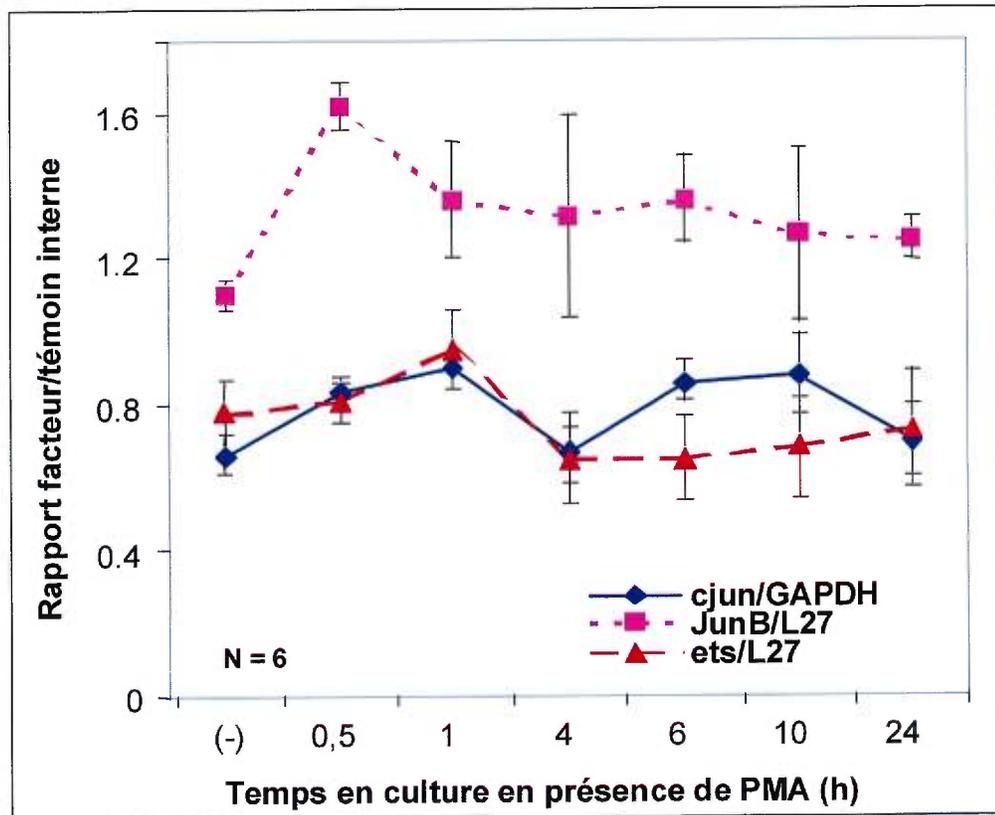
Les intégrines contribuent à l'expression de gènes importants pour la différenciation des monocytes. Pour déterminer quelles sont les intégrines induites dans les cellules THP-1 suite à la stimulation avec le PMA nous avons utilisé une technique spécifique aux intégrines qui reconnaissent le motif RGD. Cette technique est basée sur l'interaction de désintégrines comme l'échistatine marqué à  $^{125}\text{I}$ , avec les intégrines RGD.

Nous avons observé que le traitement avec le PMA détermine d'une part l'induction d'une intégrine qui est faiblement exprimé en l'absence de PMA et d'autre part cause l'apparition d'une nouvelle intégrine qui n'est pas exprimée en l'absence de PMA. L'intégrine qui est induite en grande quantité a été identifiée par immunobuvardage. Il s'agit d' $\alpha 5\beta 1$  (figure IV-20). L'autre intégrine n'a pas encore été identifiée mais il pourrait bien s'agir de  $\alpha 4\beta 1$  qui est une autre intégrine RGD exprimée par les monocytes. Des travaux sont en cours dans le laboratoire pour identifier cette intégrine et élucider comment les intégrines affectent l'induction des gènes comme les facteurs Jun et le récepteur "scavenger" Le traitement des cellules THP-1 avec l'IFN- $\gamma$  en absence de PMA n'a aucun effet sur l'induction de ces intégrines.



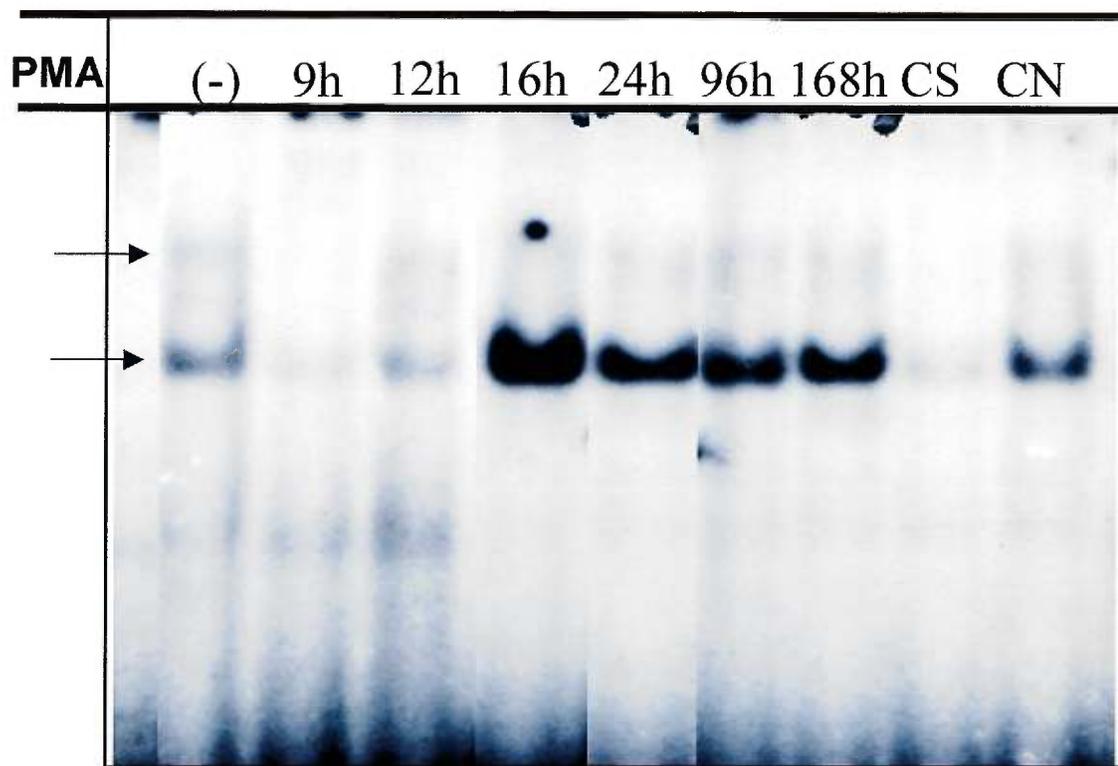
**FIGURE IV-1. Expression du récepteur "scavenger" dans les cellules THP-1.**

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de PMA (100 ng/ml). L'ARN a été extrait aux temps indiqués et l'expression du SR mesurée par RT-PCR. La quantification des fragments amplifiés a été faite par fluorescence au Séquenceur Automatique. Chaque point représente le ratio SR/GAPDH. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne de 3 expériences faites en duplicata. Image reproduite avec l'accord des auteurs (Grewal et al., manuscrit en préparation).



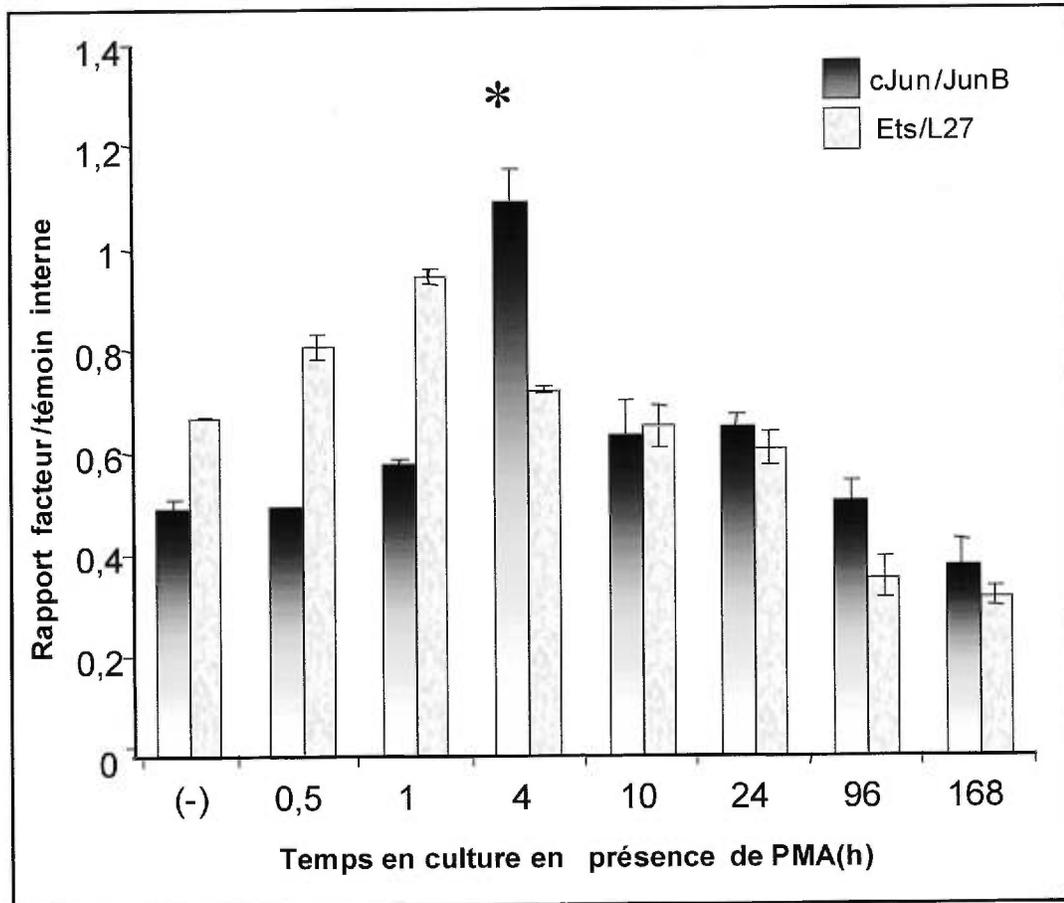
**FIGURE IV-2. Expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 dans les cellules THP-1.**

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de PMA (100 ng/ml) et l'ARN total a été extrait aux heures indiquées. L'amplification du fragment de chaque facteur a été faite par RT-PCR en présence d'un témoin interne, GAPDH pour cJun et L27 pour JunB et ets2. L'analyse quantitative des fragments amplifiés a été faite par densitométrie. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne de 6 RT-PCR. (-) représente l'expression des facteurs indiqués, avant le traitement avec le PMA.  $p=0,002$  (1h) et  $0,03$  (10h) pour cJun,  $p=0,02$  (1h) pour JunB,  $p=0,002$  (1h) pour ets2.



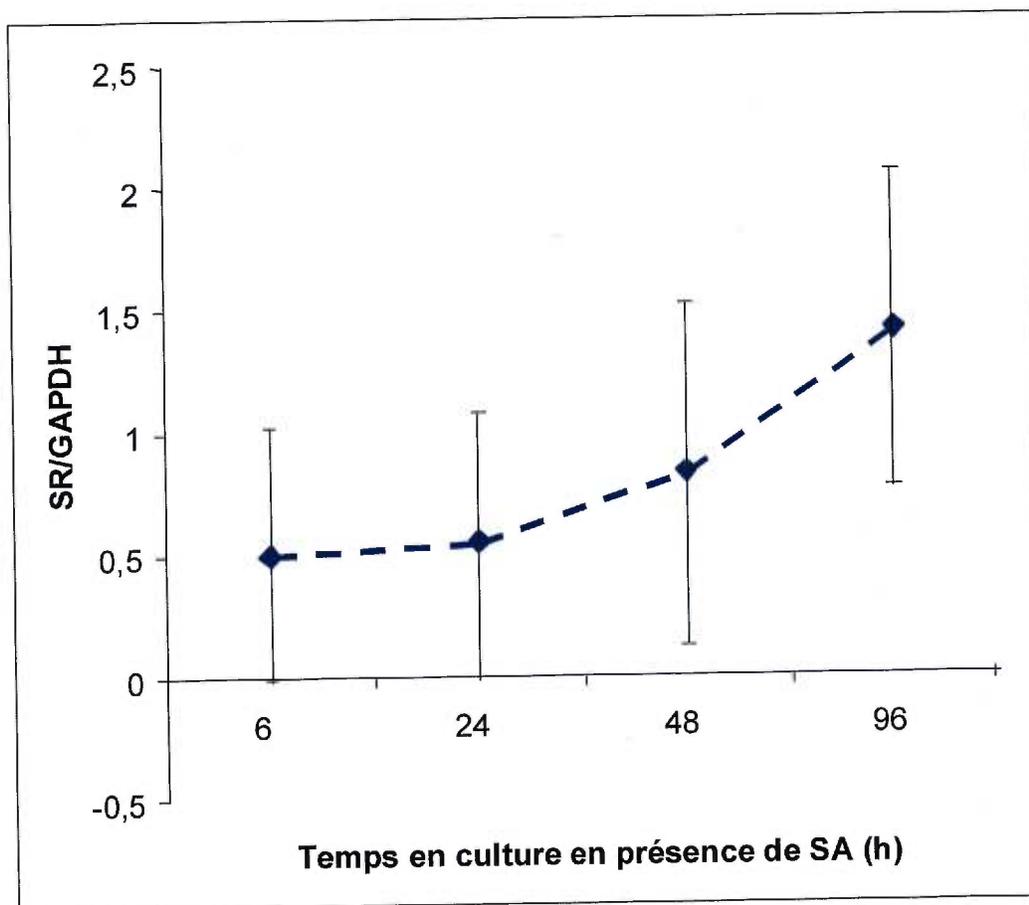
**FIGURE IV-3. EMSA démontrant l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR dans les cellules THP-1.**

Quatre  $\mu\text{g}$  d'extrait de protéines nucléaires de cellules THP-1 mises en culture en présence de PMA (100ng/ml), pour les temps indiqués, ont été incubés avec 50 ng d'oligonucléotides double brin marqués avec  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP. L'incubation a été faite à la température de la pièce pendant 30 min. Le complexe formé a été révélé par migration sur un gel de polyacrylamide 6% et exposé sur un film X-Omat XK-1. La spécificité de la liaison sur le site AP-1 a été confirmée par compétition avec un excès (100x) d'oligonucléotides spécifiques AP1/ets (CS) et non-spécifiques hGBP (CN).



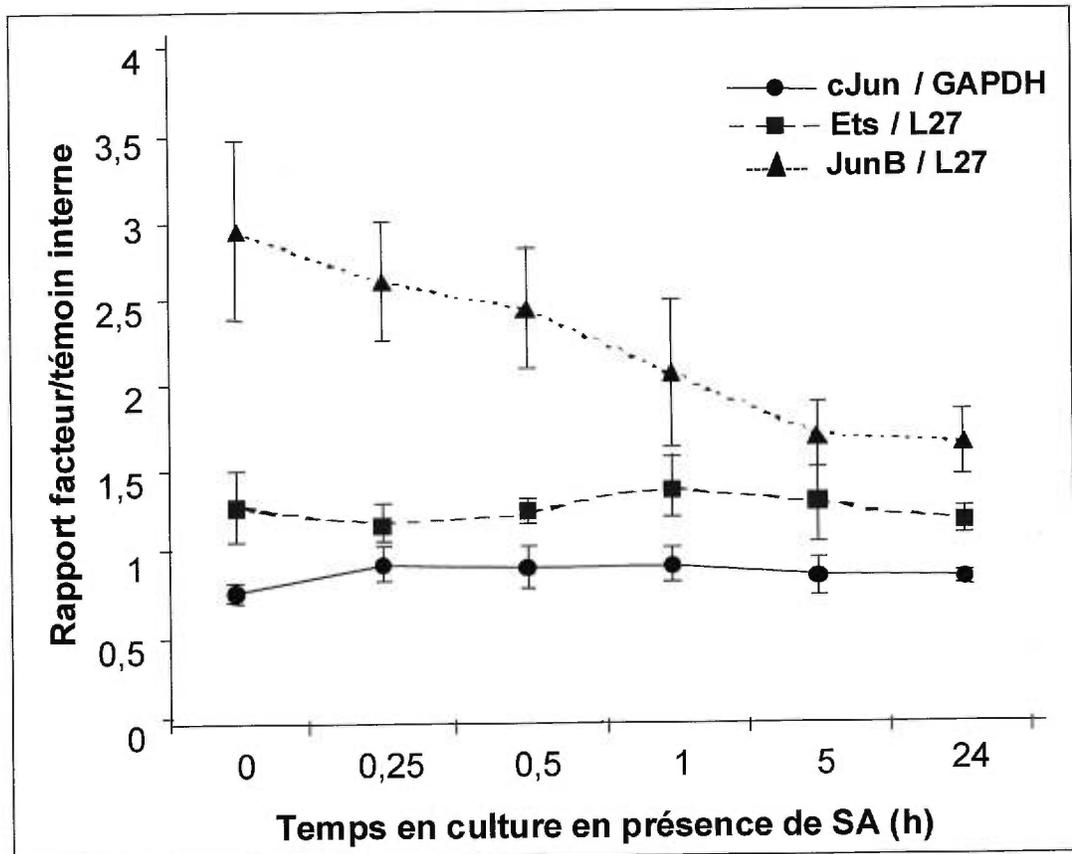
**FIGURE IV-4. Expression du facteur ets2 et changement du rapport d'expression de cJun/JunB dans les cellules THP-1.**

L'amplification des facteurs Jun a été faite par RT-PCR dans le même tube, chaque fragment servant comme témoin interne à l'autre. L'amplification du ets2 a été faite en présence du témoin interne L 27. Les fragments amplifiés ont été analysés par densitométrie. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne du rapport cJun/JunB et ets2/L27, pour 3 RT-PCR. (-) = sans PMA. Statistique = test de t. \*  $p=0,01$ .



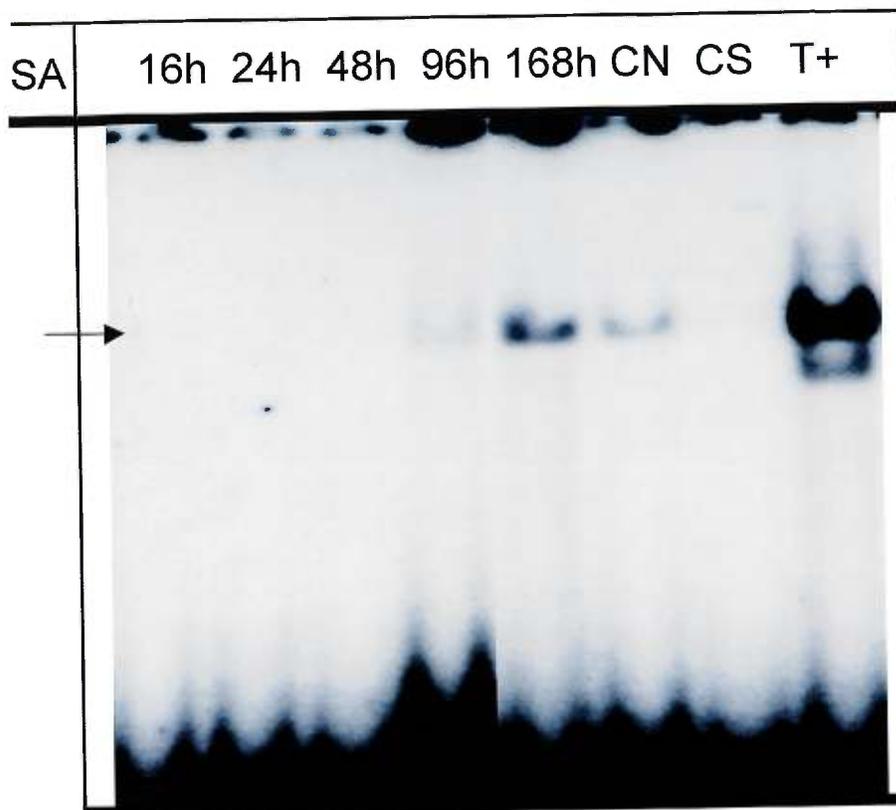
**Figure IV-5. Expression du récepteur "scavenger" dans les monocytes sanguins humains.**

Les monocytes sanguins ont été mis en culture en présence de sérum autologue et l'expression du SR relative à GAPDH a été mesurée par RT-PCR aux temps indiqués. Chaque point représente la moyenne du ratio SR/GAPDH mesurée en duplicata pour 5 individus. Les barres d'erreur représentent l'erreur type à la moyenne.



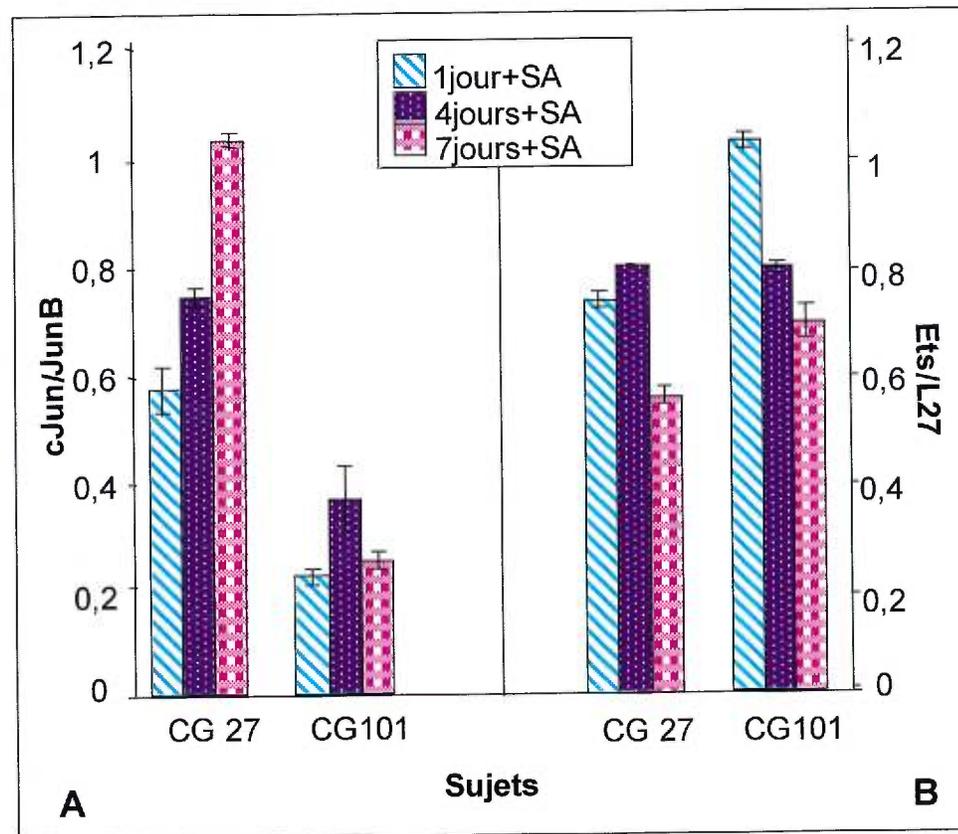
**FIGURE IV-6. Expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains.**

Les monocytes sanguins humains ont été mis en culture en présence de SA et l'ARN total a été extrait aux heures indiquées. L'amplification du fragment de chaque gène a été faite par RT-PCR, en présence de GAPDH comme témoin interne pour cJun, et de L27 pour JunB et ets2. L'analyse quantitative des fragments a été faite par densitométrie. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne de 4 sujets (2 PCR pour chaque sujet).



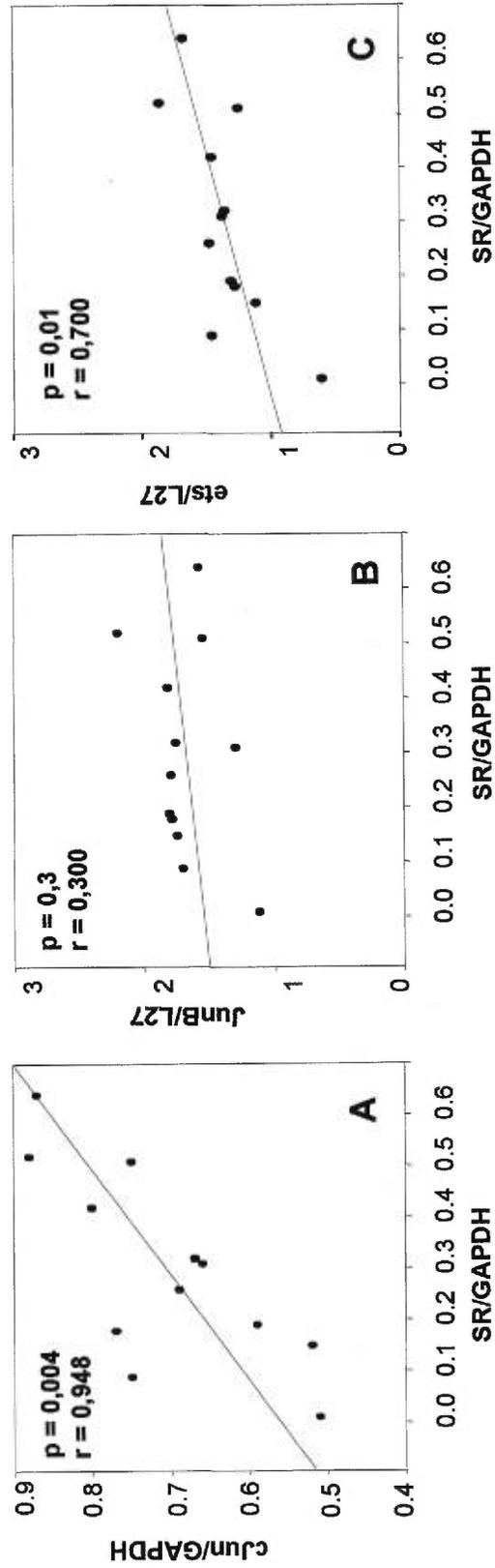
**FIGURE IV-7. EMSA démontrant l'occupation du site AP-1/ETS du promoteur du SR dans les monocytes sanguins humains**

Quatre  $\mu\text{g}$  d'extrait de protéines nucléaires de monocytes humains mis en culture en présence de SA pour les temps indiqués, ont été incubés avec 50 ng d'oligonucléotides double brin marqués avec  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP. L'incubation a été faite à la température de la pièce pendant 30 min. Le complexe formé a été révélé par migration sur un gel de polyacrylamide 6% et exposé sur un film X-Omat XK-1. La spécificité de la liaison sur le site AP-1 a été confirmée par compétition avec un excès (100x) d'oligonucléotides spécifiques AP1/ets (CS) et non-spécifiques hGBP (CN). Le témoin positif (T+) représente les protéines nucléaires de cellules THP-1, liés au site AP-1/ets.



**FIGURE IV-8. Expression des facteurs de transcription cJun/JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains.**

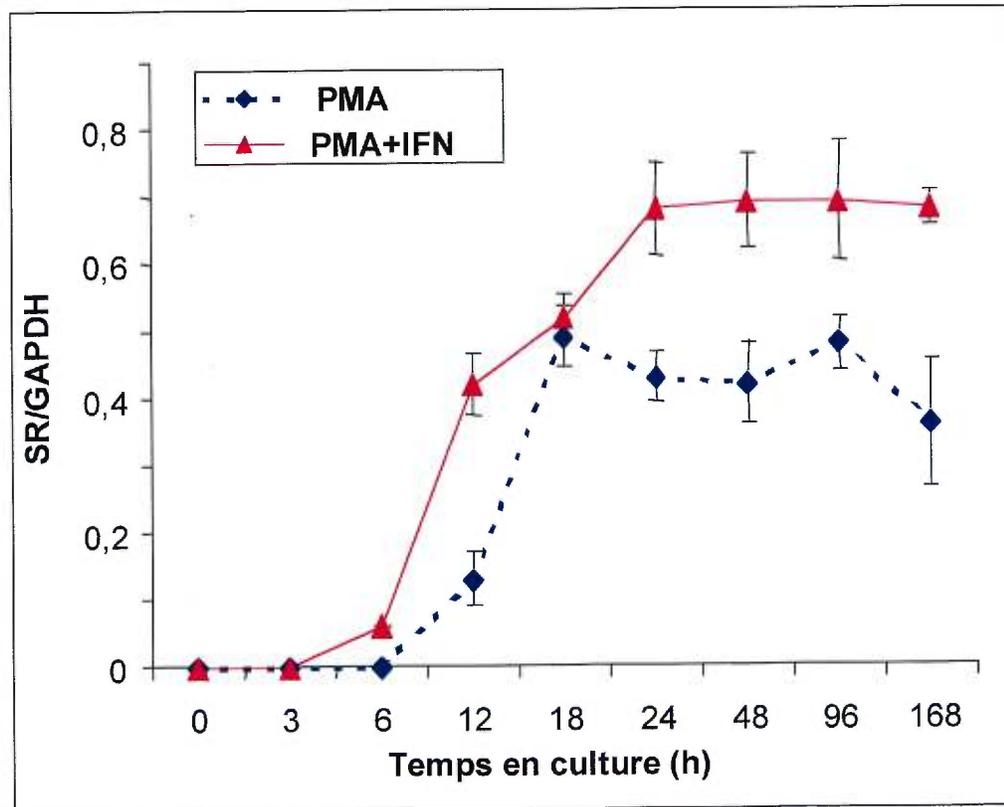
Nous avons mesuré l'expression de cJun/JunB (A) et de ets2/L27 (B) dans les monocytes sanguins humains par RT-PCR, aux temps indiqués. Nous présentons dans le graphique deux exemples (CG27 et CG 101) illustrant les variations quantitatives et temporelles d'expression des facteurs cJun/JunB et ets2. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne de 3 PCR par sujet. L'expérience a été faite sur 20 sujets.



**Figure IV-9. Corrélation entre l'expression du SR et l'expression des facteurs c-Jun JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains.**

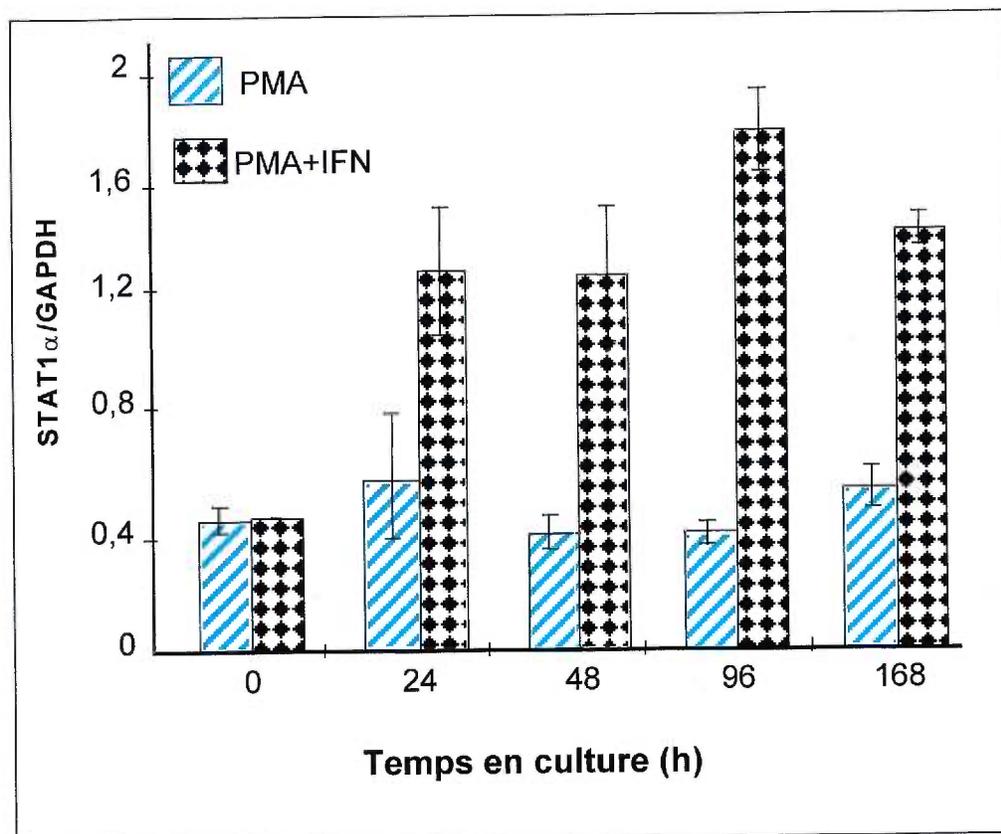
Chaque point représente la valeur moyenne de la quantité relative de l'ARNm de cJun (A), JunB (B) et ets2 (C), dans les monocytes sanguins humains, à 24 heures en culture en présence de SA, mise en corrélation avec la quantité relative de l'ARNm du SR. N=12.

- A) Association entre l'expression de c-Jun et l'expression du SR — Régression linéaire simple
- B) Association entre l'expression de JunB et l'expression du SR — Régression linéaire simple
- C) Association entre l'expression de ets2 et l'expression du SR — Régression linéaire simple



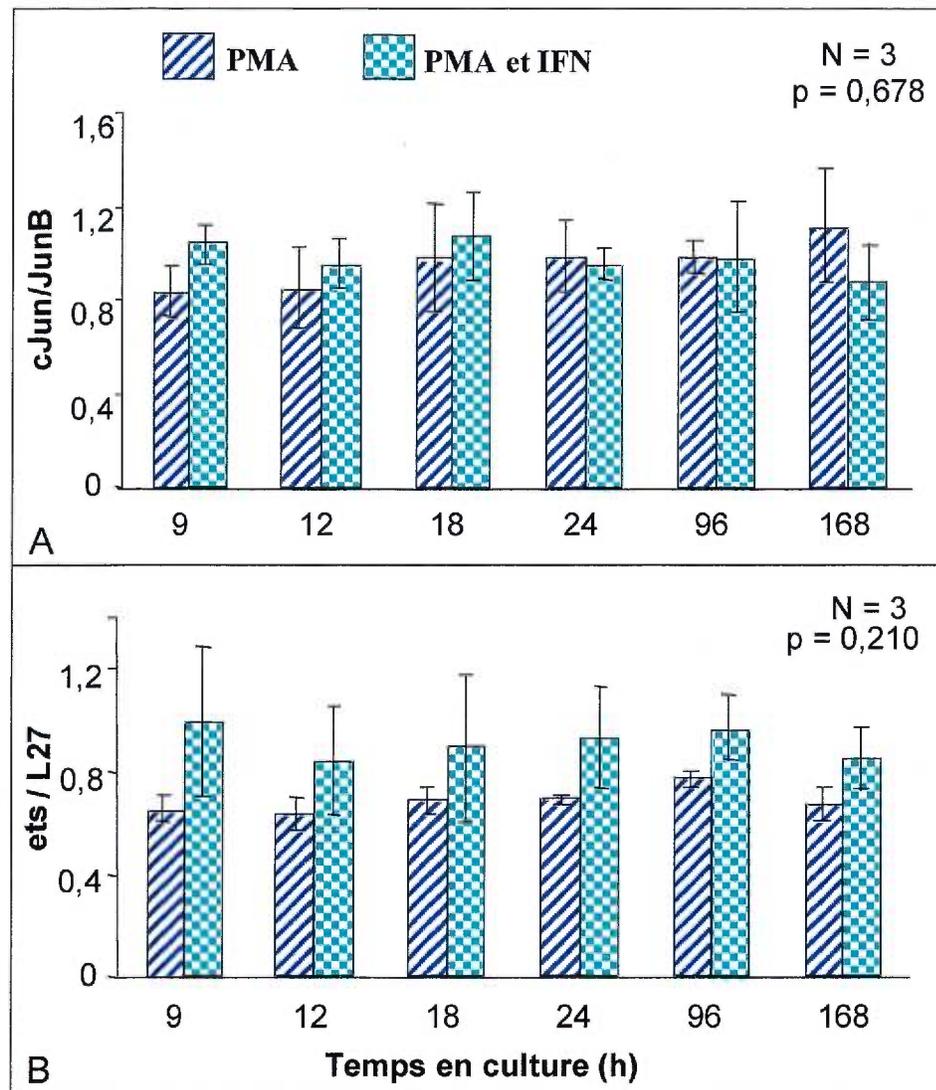
**FIGURE IV-10. Effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du récepteur "scavenger" dans les cellules THP-1.**

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de PMA seul (100 ng/ml) et en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml- ajouté dès la mise en culture). L'ARN total pour les deux conditions a été extrait aux heures indiquées et l'expression du SR mesurée par RT-PCR en présence de GAPDH comme témoin interne. Chaque point représente la moyenne de 3 expériences faites en duplicata et les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne.



**FIGURE IV-11. Expression du facteur de transcription STAT1 $\alpha$  dans les cellules THP-1**

Les cellules ont été mises en culture en présence de PMA et l'ARN total a été extrait aux temps indiqués. L'amplification du STAT1 $\alpha$  a été faite par RT-PCR en présence de GAPDH comme témoin interne. L'analyse quantitative des fragments a été faite par densitométrie et représente la moyenne du rapport facteur/témoin. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour 4 RT-PCR. Le graphique a été reproduit avec l'accord des auteurs (Grewal et al., manuscrit en préparation).



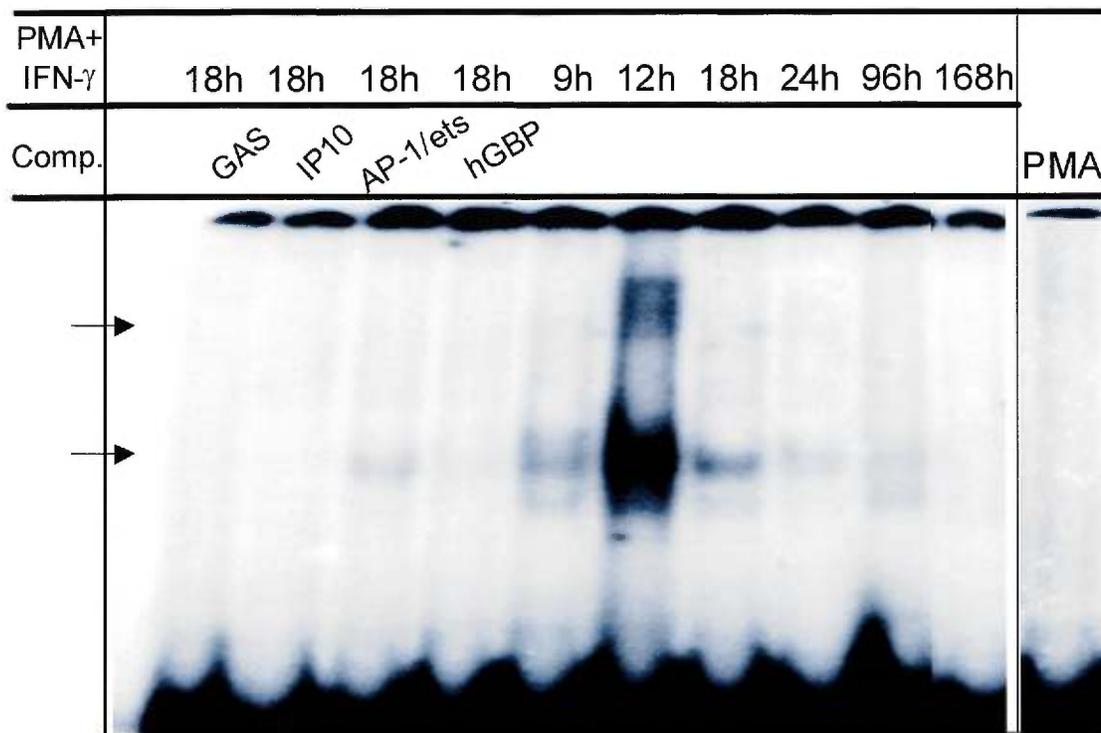
**FIGURE IV-12. Effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression des facteurs de transcription cJun/JunB et ets2 dans les cellules THP-1.**

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de PMA seul (100 ng/ml) et en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml, ajouté 6 heures après le PMA). L'ARN total a été extrait aux heures indiquées et les fragments des facteurs cJun/JunB et ets2/L27 amplifiés par RT-PCR ont été analysés par densitométrie. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne de 3 PCR en duplicata.

**A.** Effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression de cJun/JunB dans les cellules THP-1

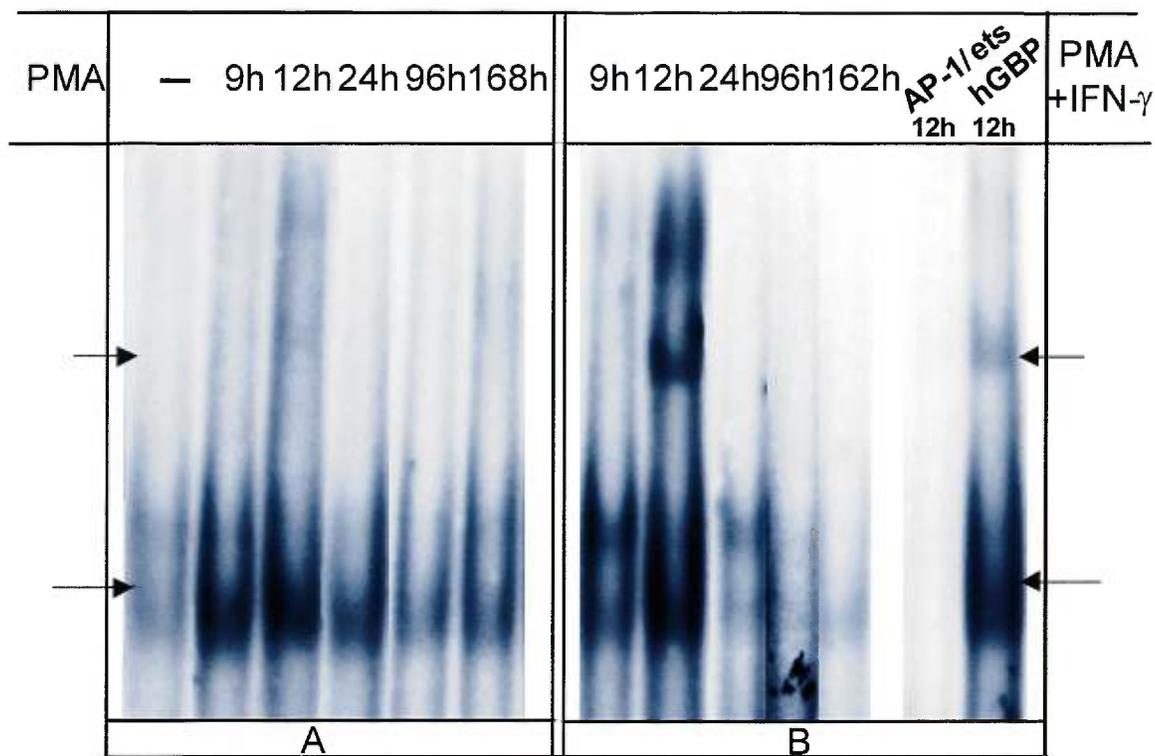
**B.** Effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du facteur ets2 dans les cellules THP-1

Statistique = ANOVA



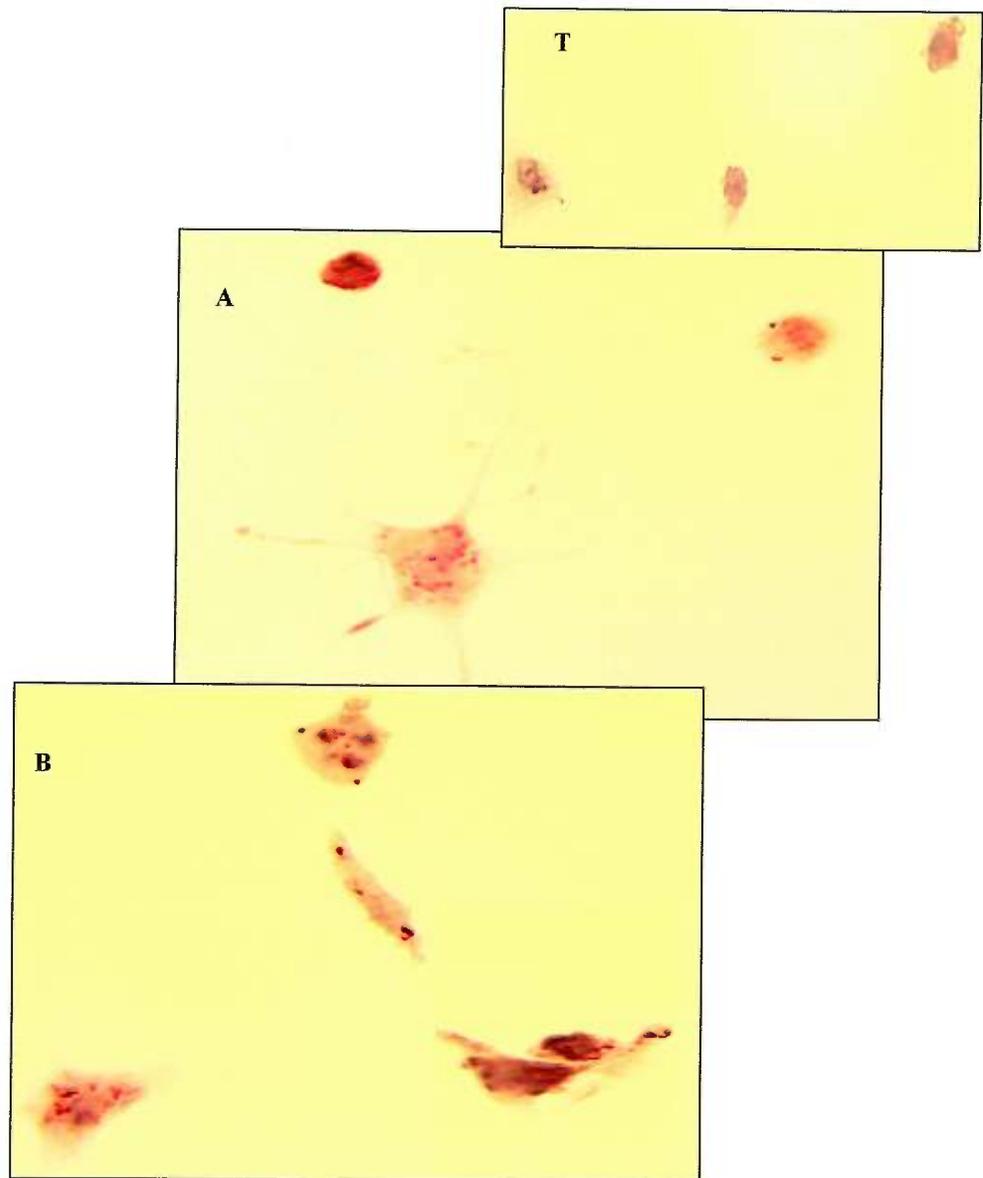
**Figure IV-13. EMSA démontrant l'occupation du site GAS (-133 à -125 pb) du promoteur du SR dans les cellules THP-1.**

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de PMA (100ng/ml) et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml, ajouté 6h plus tard). Sept  $\mu$ g de protéines nucléaires, extraites aux temps indiqués, ont été incubées avec 5 pmoles d'oligonucléotides double brin marqués avec  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP. L'incubation a été faite à la température de la pièce, 30 minutes. Le complexe formé a été révélé par migration dans un gel de polyacrylamide 6% et exposé sur un film X-Omat XK-1. La spécificité de la liaison sur le site GAS a été confirmée par compétition (comp.) avec un excès (100x) d'oligonucléotides spécifiques GAS, IP-10, hGBP et non-spécifiques AP-1/ets. PMA représente l'occupation du site GAS en présence de PMA seul.



**FIGURE IV-14. Effet du PMA et de l'IFN- $\gamma$  sur l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR dans les cellules THP-1.**

Sept  $\mu\text{g}$  de protéines nucléaires, extraites aux temps indiqués, provenant de cellules THP-1 mises en culture en présence de PMA (100 ng/ml), seul (**A**), et en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml, **B**), ont été incubé avec 5 pmoles d'oligonucléotides double brin marqués avec  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP. L'incubation a été faite à la température de la pièce, 30 minutes. Le complexe formé a été révélé par migration dans un gel de polyacrylamide 6% et exposé sur un film X-Omat XK-1. La spécificité de la liaison sur le site AP-1/ets a été confirmée par compétition avec un excès (100x) d'oligonucléotides spécifiques (AP-1/ets) et non-spécifiques (hGBP). (-) = sans PMA.



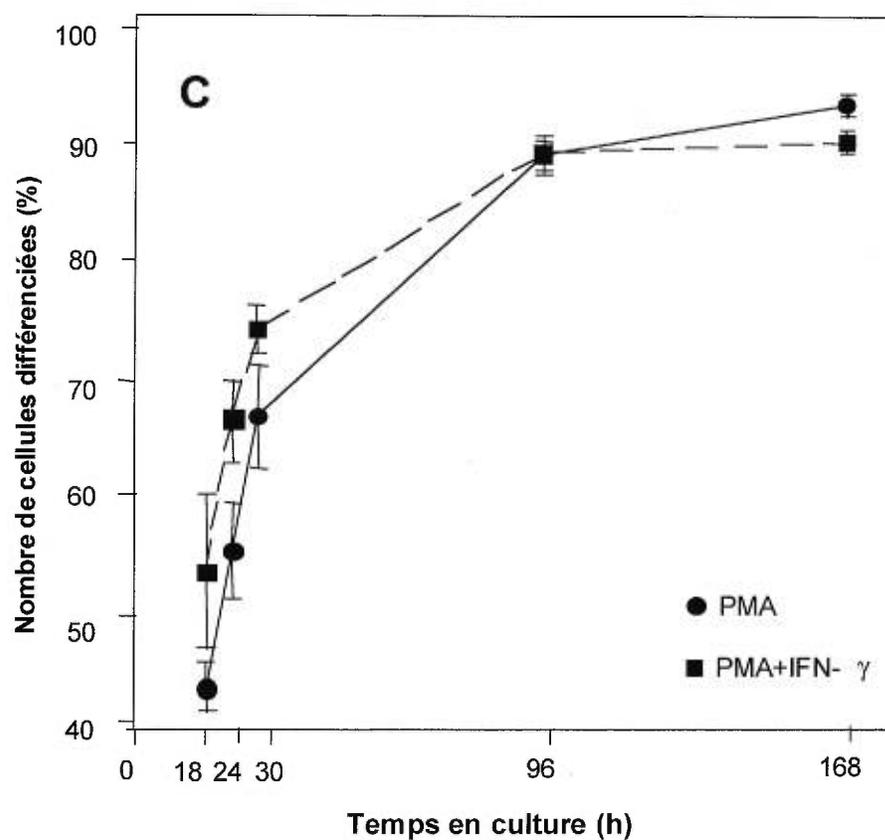
**Figure IV-15: Phénotype des cellules THP-1**

Trois cent mille cellules/plaque ont été mises en culture en présence de PMA (100ng/ml, **A**), et en présence de PMA et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml, **B**). Le phénotype a été analysé aux temps indiqués sur le graphique (**C**-p. 78), par la technique de coloration à Oil red O/hématoxylin. L'analyse microscopique a été faite par le système d'imagerie Zeiss Axiophot-Northern Eclipse. Les cellules avec un corps cellulaire plus grand, aplatis, avec des prolongations, des vacuoles, le noyau irrégulier et l'ingestion des lipides (visibles en rouge) augmentée ont été comptées comme déjà différenciées.

**T)** Morphologie des cellules THP-1 non-différenciées (témoin).

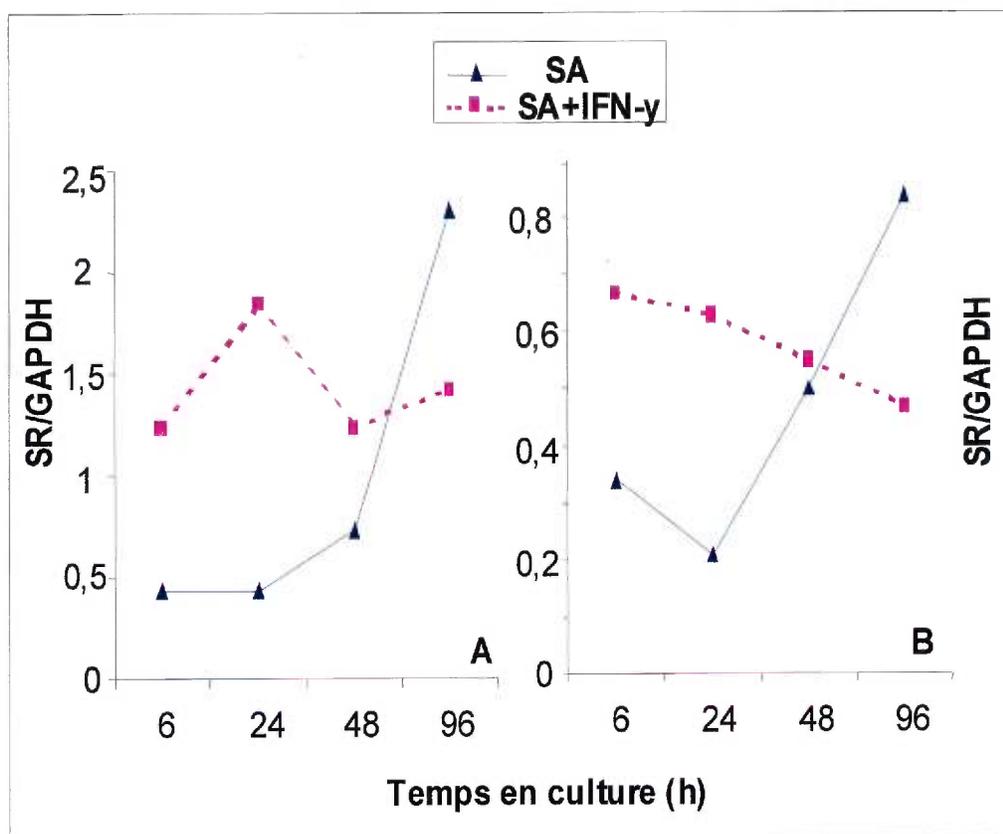
**A)** Morphologie des cellules THP-1 après 18 h en présence de PMA.

**B)** Morphologie des cellules THP-1 après 18 h en présence de PMA+IFN- $\gamma$ .



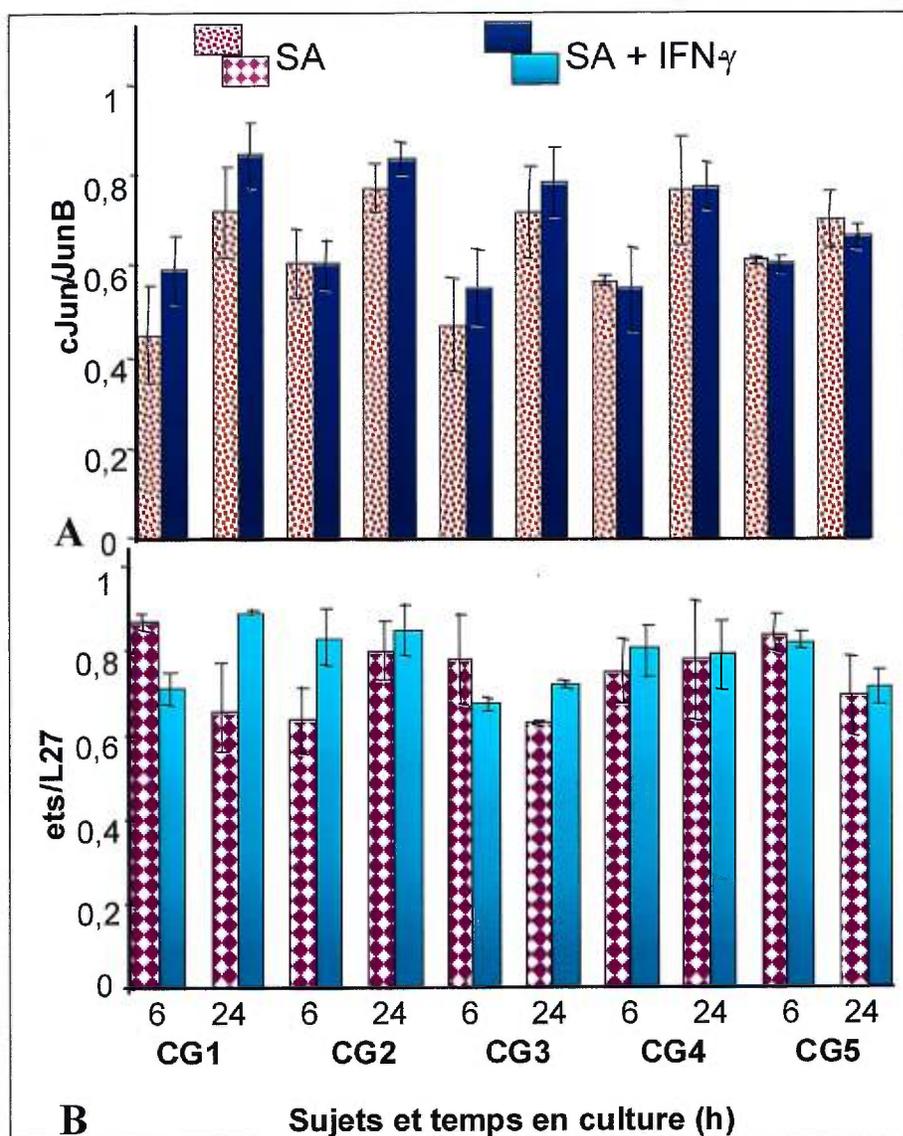
**FIGURE IV-15 C. Phénotype des cellules THP-1**

**C)** Cinétique de différenciation des cellules THP-1. Chaque point représente le pourcentage de cellules différenciées. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne. **N=3**.



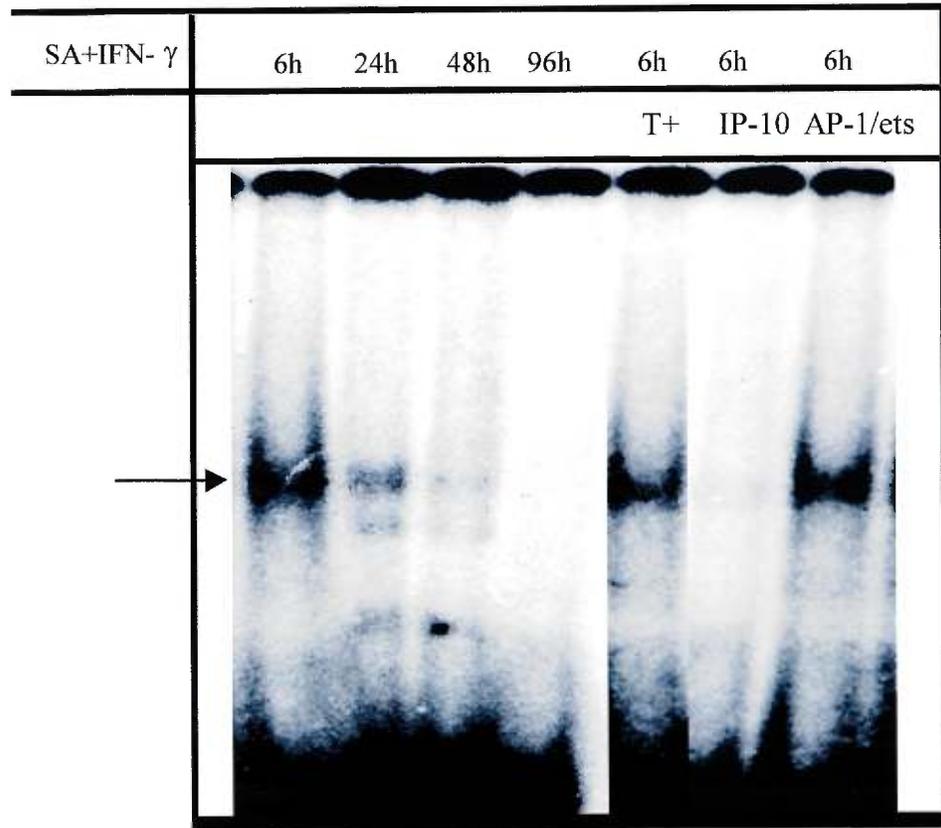
**Figure IV-16. Effet de l'IFN $\gamma$  sur l'expression du récepteur "scavenger" dans les monocytes sanguins humains.**

Les monocytes sanguins ont été mis en culture en présence de sérum autologue seul ou en présence de SA et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml, ajouté 6 h après). L'expression du SR relative à GAPGH a été mesurée par RT-PCR aux temps indiqués. Chaque point représente la moyenne de 2 PCR. La quantification des fragments amplifiés a été faite par fluorescence au Séquenceur Automatique. Le graphique illustre deux exemples de variation d'expression du SR dans les conditions indiquées, dans les monocytes sanguins (A et B). L'expérience a été faite sur 5 sujets.



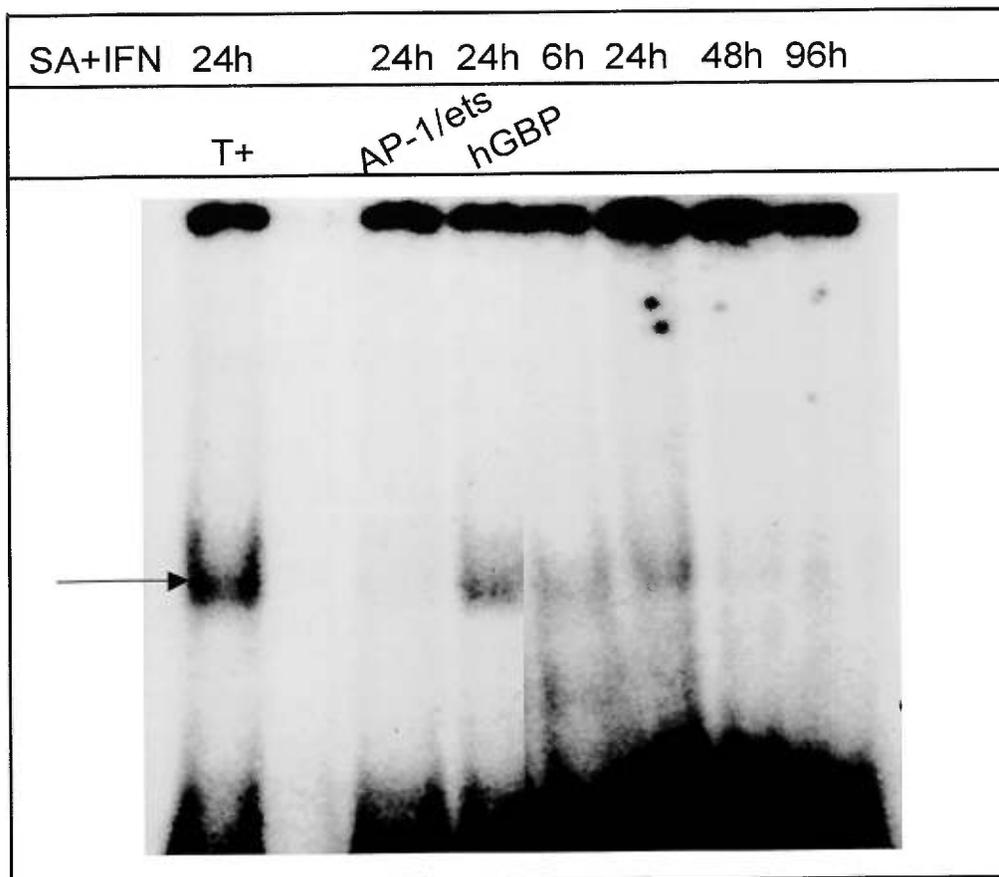
**FIGURE IV-17. Effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression des facteurs cJun/JunB et ets2 dans les monocytes sanguins humains.**

Les monocytes sanguins humains ont été mis en culture en présence de SA et de SA+IFN- $\gamma$  (25 ng/ml, ajouté dès la mise en culture). Les fragments de cJun et JunB ont été coamplifiés par RT-PCR dans le même tube, chacun servant comme témoin interne pour l'autre. Le facteur ets2 a été amplifié en présence de L27 comme témoin interne. L'analyse quantitative des fragments amplifiés a été faite par densitométrie. L'histogramme représente l'expression des facteurs cJun/JunB (A) et ets2/L27 (B), pour 5 sujets (CG) au temps indiqués. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne pour 3 PCR en duplicata pour chaque sujet.



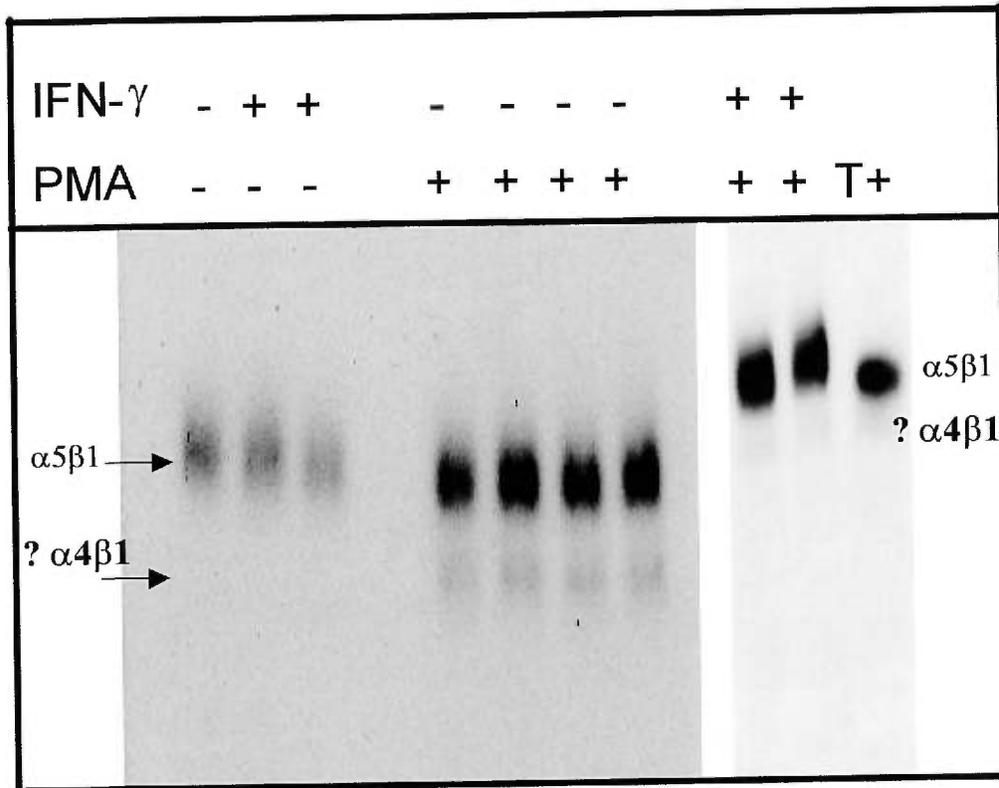
**FIGURE IV-18. EMSA démontrant l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'occupation du site GAS du promoteur du SR dans les monocytes sanguins humains.**

Sept  $\mu\text{g}$  d'extrait de protéines nucléaires provenant de monocytes sanguins humains mis en culture en présence de SA et d'IFN- $\gamma$  ont été incubés avec 5 pmoles d'oligonucléotides double brin (GAS), marqués avec  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP. L'incubation a été faite à la température de la pièce pendant 30 minutes. Le complexe formé a été révélé par migration sur un gel de polyacrylamide 6% et exposé sur un film X-Omat XK-1. La spécificité de la liaison sur le site GAS a été confirmée par compétition avec un excès (100x) d'oligonucléotides spécifiques consensus (IP-10) et non-spécifiques (AP-1/ets). Comme témoin positif (T+) nous avons utilisé un site consensus GAS (IP-10), marqué avec  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP.



**FIGURE IV-19. EMSA démontrant l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR dans les monocytes sanguins humains**

Sept  $\mu\text{g}$  d'extrait de protéines nucléaires provenant de monocytes sanguins humains mis en culture en présence de SA et d'IFN- $\gamma$  (25 ng/ml) ont été incubés avec 5 pmoles d'oligonucléotides double brin AP-1/ets, marqués avec  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP. L'incubation a été faite à la température de la pièce pendant 30 min. Le complexe formé a été révélé par migration sur un gel de polyacrylamide 6% et exposé sur un film X-Omat XK-1. La spécificité de la liaison sur le site AP-1/ets a été confirmée par compétition avec un excès (100x) d'oligonucléotides spécifiques (AP1/ets) et non-spécifiques (hGBP). Comme témoin positif (T+) nous avons utilisé un site consensus AP-1.



**FIGURE IV-20. SDS-PAGE démontrant la présence d'intégrines RGD dans les cellules THP-1.**

Les cellules THP-1 ont été mises en culture en présence de PMA (100 ng/ml) et IFN- $\gamma$  (25 ng/ml), séparément et en même temps. Quenze  $\mu$ g de protéines a été incubée avec l'échistatine ( $1.25 \times 10^{-8}$ M) marquée à  $^{125}$ I et séparées par SDS-PAGE. Le gel a été soumis à l'autoradiographie 3 heures sur un film X-Omat AR5. L'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  a été identifiée par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques anti  $\alpha 5$  et anti  $\beta 1$ . Le témoin positif (T+) représente des intégrines exprimées par des fibroblastes humains.

## V- DISCUSSION ET CONCLUSION

La connaissance des facteurs impliqués dans la régulation du SR permet de mieux comprendre l'activation du SR durant la maturation des monocytes en macrophages et leur transformation en cellules spumeuses, durant l'athérogenèse. On peut donc aisément comprendre l'intérêt d'étudier les aspects les plus fondamentaux de la régulation du gène du SR qui joue un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose. Des résultats nombreux et parfois contradictoires sur l'effet de différents stimuli externes dans la régulation du SR ont été rapportés, particulièrement en ce qui concerne l'IFN- $\gamma$ . Il y a des publications sur l'induction de l'expression du SR par les esters de phorbol et le stress oxydatif dans les monocytes THP-1 et les cellules musculaire lisses (Mietus -Snider M., et al., 1997, 1998; Hara H., et al., 1987; Wu H., et al., 1994). Il y a aussi des travaux qui portent sur l'effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  sur l'activation du SR dans les monocytes-macrophages (Geng et Hansson, 1992; Horvai et al., 1997) et sur l'effet stimulateur de l'IFN- $\gamma$  sur le SR dans les cellules musculaires lisses (Li et al., 1995).

Afin de mieux comprendre quels sont les facteurs impliqués dans la régulation et l'activation du SR, nous nous sommes proposés d'étudier l'effet de la stimulation simultanée de deux voies de signalisation ; Ras/AP-1 stimulée par PMA et SA et JAK/STAT stimulée par l'IFN- $\gamma$ .

L'étude du mécanisme de la transcription du SR dans les cellules THP-1 nous a permis de confirmer que les facteurs de transcription critiques pour la transcription du SR dans les cellules THP-1 sont les protéines du complexe AP-1 et ets2, conformément aux résultats obtenus par le groupe de Wu, en 1994. La cinétique d'expression du SR suite à la stimulation des cellules THP-1 avec les esters de phorbol démontre que le pic d'ARNm se situe avant 24 heures après la mise en culture, et qu'il reste constant par la suite.

L'expression maximale de l'ARNm de cJun, JunB et ets2 se produit 1 heure après la mise en culture et le traitement avec le PMA. La cinétique d'expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 est compatible avec le rôle que joue ces protéines dans l'expression du SR. Nos résultats démontrent aussi une similitude d'expression de cJun et JunB dans les cellules THP-1 avec l'expression de ces mêmes facteurs dans les cellules U937 une autre lignée monocyttaire (Szabo et al., 1991). Dans les cellules HL-60, JunB présente une expression semblable à celle que nous avons observée dans les cellules THP-1, alors que pour cJun l'expression persiste entre 10 heures et 120 heures, après la mise en culture en présence de PMA. L'expression des facteurs de transcription cJun et JunB semble donc être spécifique au type de cellules étudiées (Szabo, et al., 1991).

Nos résultats d'EMSA sur l'activation des facteurs de transcription démontrent que dans nos conditions expérimentales l'activité de liaison des protéines cJun, JunB et ets2 sur le site AP-1/ets du promoteur du SR est décelable entre 9 et 16 heures après la mise en culture des cellules THP-1 en présence de PMA. Le maximum de liaison est observé 16 heures après la stimulation. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par le groupe de Wu, 1994. On peut donc conclure qu'il y a une corrélation positive entre la transcription rapide des facteurs AP-1 et ets2, leur traduction et leur activation, et l'induction maximale de la transcription du SR.

cjun est le composant central de tous les complexes AP-1 (Karin et al., 1997), ce qui suggère qu'il a une fonction décisive dans la transcription des gènes cibles. JunB au contraire, a un effet répressif et inhibiteur sur cJun, à cause de sa prédilection à former avec cJun des hétérodimères inactifs ou ayant une capacité réduite d'activation de la transcription (Schütte et al., 1989; Deng et Karin, 1993). Une concentration plus grande de JunB favorise la formation de ces hétérodimères inactifs, alors qu'une plus grande concentration de cJun favorise un effet stimulateur. Nous avons donc regardé si, dans nos conditions expérimentales il y avait un changement du rapport cJun/JunB.

Nous démontrons qu'il y a un changement du rapport cJun/JunB en faveur de cJun, 4 heures après la mise en culture des cellules THP-1 en PMA. Ce changement précède l'activation des protéines cJun et JunB de même que l'induction du SR. Nous confirmons le rôle déterminant de cJun dans l'induction du SR dans les cellules THP-1 traitées avec le PMA tel que démontré par Franklin et al., 1992, dans les cellules de la lignée cellulaire U937. Dans les cellules U937, le PMA augmente la capacité trans-activatrice de cJun par la stimulation de la phosphorylation des sérines 63 et 73 du domaine activateur de la transcription, situé dans la partie N-terminale, effet qui ne se produit pas sur JunB.

Plusieurs études sur l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR dans les cellules THP-1 et les macrophages humains ont mis en évidence l'effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  sur la transcription du SR et l'activité du complexe AP-1/ets (Geng et Hansson, 1992). Il est important de noter que ces études ont été faites sur des cellules pleinement différenciées. Contrairement aux études précédentes, nous avons regardé l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur des cellules à différents stades de maturation. Nous avons étudié la cinétique de différenciation des cellules THP-1 en présence de PMA et de monocytes sanguins humains en présence de sérum autologue durant 7 jours. Nos résultats dénotent un effet bi-phasique de l'IFN- $\gamma$  sur l'activation de la transcription du SR. Chez les monocytes sanguins, on observe une très forte stimulation dans les premières 24 heures suivie d'une inhibition à partir de 48 heures en culture en présence de l'IFN- $\gamma$ . Chez les cellules THP-1, au contraire, l'effet de l'IFN- $\gamma$  est maintenu à un plateau constant après 24 heures, jusqu'à 168 heures après la mise en culture dans le PMA et l'IFN- $\gamma$ . L'existence d'un plateau d'expression du SR chez les cellules THP-1 cultivées en présence de PMA peut suggérer que ces cellules, après 7 jours, n'aient pas encore atteint l'étape finale de maturation en macrophages.

L'IFN- $\gamma$  semble ne pas agir au niveau de la transcription des facteurs cJun, JunB et ets2 puisque nous n'avons pas observé de changement dans la cinétique d'expression de ces facteurs en présence d'IFN- $\gamma$ . Il est donc possible que cet effet soit un effet direct de l'IFN- $\gamma$  sur le promoteur du SR.

Les sites régulateurs qui ont été défini à ce jour comme critiques pour la transcription du SR, sont situés dans le domaine I (Spi-1/PU-1) et dans le domaine IV (AP-1/ets) du promoteur (Wu et al., 1994; Moulton et al.,1994). Nous démontrons qu'en plus des sites décrits par les auteurs mentionnés plus haut, il existe dans le promoteur du SR un site GAS situé de -133 à -125 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Ce site est occupé très tôt (9 heures) après la mise en culture des cellules THP-1 en présence du PMA et de l'IFN- $\gamma$ . **Nous sommes les premiers à avoir démontré l'existence d'un site GAS dans le promoteur du SR.** Un autre site GAS situé dans l'amplificateur du gène du SR (-805 à -813 pb) n'est pas occupé dans nos conditions expérimentales.

Le facteur de transcription responsable de l'activation des gènes régulés par l'IFN- $\gamma$  est STAT1 $\alpha$  (Stark et al.,1998; Dusanter-Fourt et al., 1994). Comme prévu, l'expression du facteur de transcription STAT1 $\alpha$  est induite par la stimulation des cellules THP-1 avec l'IFN- $\gamma$  et le PMA, alors que le niveau basal est très faible en présence de PMA seul.

L'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'occupation du site AP-1/ets du promoteur du SR des cellules THP-1 est positif dans les premières 12 heures et inhibiteur après 96 heures en culture comparé à l'occupation du même site en présence du PMA seul. De plus, nous avons observé que si l'IFN- $\gamma$  est ajouté au milieu 24 heures après la mise en culture des cellules THP-1 en présence de PMA, son effet est inhibiteur sur l'occupation du site AP-1/ets et le site GAS n'est plus occupé, similaire à l'effet observé quand l'IFN- $\gamma$  agit à longue-terme.

Nos résultats confirment l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans la régulation du SR qui contient dans son promoteur un site GAS, et que les effets de l'IFN- $\gamma$  dépendent de l'état de maturation des cellules THP-1. **Suite à nos résultats nous proposons dans la figure V-1 une nouvelle structure fonctionnelle pour le promoteur du récepteur "scavenger".**

Comparativement aux cellules THP-1 où la régulation de la différenciation et de l'expression du SR est bien connue, l'étude de la régulation de l'expression du SR dans les monocytes sanguins n'a pas été aussi approfondie.

Par analogie avec les mécanismes d'activation transcriptionnelle observés dans les cellules THP-1, nous avons vérifié si les mêmes facteurs étaient impliqués dans l'activation du SR dans les monocytes sanguins humains. Cette étude visait à obtenir plus d'informations sur les mécanismes d'activation du SR durant la transformation des monocytes sanguins en macrophages et l'apparition éventuelle des cellules spumeuses.

La différenciation des monocytes et l'expression du SR durant la maturation en culture en présence de sérum autologue ne se produisent pas avec la même cinétique que dans les cellules THP-1. L'expression du SR dans les monocytes humains est variable et présente des différences interindividuelles allant de 10 à 20 fois le niveau basal. Le niveau du SR, atteint à la maturation des cellules varie aussi d'un individu à l'autre. Dans les monocytes humains l'expression du SR en général demeure à un niveau faible dans les premières 24 heures après la mise en culture, et son induction commence pour certains sujets à 24 heures, pour d'autres sujets après 48 heures et augmente graduellement, jusqu'à 4 jours.

L'induction du SR, quoique spécifique à chaque individu, se produit de toute évidence toujours après quelques jours en culture et augmente graduellement pour tous les individus. Cette induction est différente de l'induction du SR dans les cellules THP-1, qui se fait très tôt, dans les premières 24 heures de culture en présence de PMA, et reste constante durant 7 jours.

L'expression des facteurs cJun, JunB et ets2 est aussi individuelle avec un pic d'ARNm situé à des temps différents pour chaque individu. Dans les premières 24 heures en culture, dans les monocytes sanguins humains il semble difficile d'établir l'existence d'un pic d'expression de cJun et ets2. Pour JunB l'induction se produit très rapidement, dès la mise en culture, et diminue lentement dans les heures suivantes.

Les résultats obtenus par EMSA dans les extraits nucléaires des monocytes sanguins humains montrent qu'il n'y a pas d'activation de ces facteurs avant 24 heures; ce qui est en accord avec l'absence d'un pic d'ARNm des facteurs Jun et ets2. Nous démontrons en effet que dans aucun des cas étudiés l'activation des facteurs AP-1 et ets2 ne se produit avant 4 jours; elle se produit entre 96 heures et 168 heures après la mise en culture en présence du SA.

Dans les monocytes sanguins de 20 sujets normolipidémiques étudiés l'expression des facteurs de transcription cJun, JunB et ets2 se produit entre 24 heures et 169 heures après la mise en culture en présence de SA. Le changement du rapport cJun/JunB se produit soit 4 jours soit 7 jours après la mise en culture. Pour ets2 une augmentation d'expression est observée quelquefois à 1 jour et quelquefois à 4 jours. Le changement du rapport cJun/JunB qui se situait à 4 heures après la mise en culture dans les cellules THP-1, augmente après 48 heures de culture en présence de SA dans les monocytes humains.

Comme c'est le cas pour les cellules THP-1, la cinétique d'expression des facteurs cJun/JunB et ets2, dans les monocytes dérivés du sang, est liée à la cinétique de liaison des mêmes facteurs sur le site AP-1/ets du promoteur du SR. Dans les deux cas la cinétique d'activation des facteurs de transcription est compatible avec la cinétique d'expression du SR. L'association entre les cinétiques d'expression du SR et celle des facteurs cJun et ets2 s'avère être positive, comme le montre l'interprétation statistique par la régression linéaire simple (figure IV-9 A et C).

Nous avons donc démontré que la régulation du SR se fait de façon similaire dans les monocytes/macrophages sanguins et les cellules THP-1, mais avec des différences quantitatives et temporelles remarquables. Les facteurs impliqués dans cette activation appartiennent à la famille AP-1/ets. Comparés aux cellules THP-1, cependant les monocytes humains circulants ont une cinétique d'activation de la transcription du SR différente. Elle se produit beaucoup plus tard.

Comme nous l'avons démontré dans les cellules THP-1, l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR dépend de l'état de maturation des cellules. Il existe plusieurs différences entre les cellules THP-1 et les monocytes humains en ce qui a trait à l'effet de l'IFN- $\gamma$ . L'induction du SR dans les monocytes sanguins humains en présence d'IFN- $\gamma$  se produit plus tôt et est plus élevée que dans les cellules THP-1. De plus, l'effet de l'IFN- $\gamma$  sur l'induction du SR dans les monocytes sanguins humains présente des variations interindividuelles. L'amplitude de la stimulation dépend du taux d'expression basal; plus celui-ci est bas, plus la stimulation par l'interféron est marquée.

Même si la transcription des facteurs cJun, JunB et ets2 n'est pas affectée par l'IFN- $\gamma$ , nous démontrons que leur activation et leur liaison sur le site AP-1 sont plus précoces et décelables dès 6 heures après la mise en culture. Cette activation des facteurs AP-1 et ets2, à 6 heures ne se produit pas en présence du SA seul.

L'étude par EMSA de l'occupation du site GAS dans les monocytes sanguins humains nous a permis de démontrer que son occupation survient très tôt en présence de l'IFN- $\gamma$  (6 heures après la mise en culture) et ceci est en concordance avec notre observation de l'occupation du site GAS dans les cellules THP-1. Le facteur de transcription STAT1 $\alpha$  présente aussi une expression élevée similaire à celle observée dans les cellules THP-1 suite au traitement des monocytes avec l'IFN- $\gamma$ .

Nos résultats sur l'occupation des sites AP-1/ets et GAS révèlent une activation très précoce de la liaison des facteurs Jun/ets et STAT respectivement, sur leurs sites du promoteur du SR dans les monocytes stimulés par l'IFN- $\gamma$ . Nous avons observé une inhibition de l'occupation du site AP-1/ets et une diminution de l'occupation du site GAS à 48 heures et 96 heures de culture des monocytes sanguins humains en présence de l'IFN- $\gamma$  comme nous l'avons observé dans les cellules THP-1.

L'effet inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  sur l'expression du SR que nous avons observé après 48 heures, ainsi que l'inhibition de l'occupation du site AP-1/ets est en accord avec les résultats de certains groupes de recherches qui ont démontré que l'IFN- $\gamma$  réduit l'expression de l'ARNm du SR et de son activité, dans les macrophages par l'inhibition de l'activité du complexe AP-1 dépendent de Ras (revue par Steinbrecher, 1999). **Nous avons démontré que si l'IFN- $\gamma$  est bien un inhibiteur du SR dans les macrophages, il agit différemment dans les monocytes où il est un stimulateur de l'expression du SR. Nos résultats apportent des arguments en faveur de l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans la régulation du SR d'une façon particulière, son effet étant lié à l'état de maturation des cellules.**

Les mécanismes intimes impliqués dans le contrôle de la transcription du SR demeurent inconnus, mais les études discutées ici soulignent l'importance des protéines cJun, JunB, et ets2, et de l'IFN- $\gamma$  dans le contrôle de l'expression du SR à la fois dans la lignée monocyttaire THP-1 et dans les monocytes sanguins humains.

Comment peut-on relier entre eux les résultats obtenus ?

Des résultats récents ont démontré l'existence d'une compétition entre STAT 1 $\alpha$  et les facteurs AP-1 dans diverses lignées cellulaires pour une quantité limitée de cofacteurs CBP/p300, des intégrateurs de plusieurs voies de signalisations (Horvai, et al., 1997). L'existence d'une compétition entre les facteurs de transcriptions STAT et AP-1/ets, pour une quantité limitée de co-activateurs CBP/p300 fournit une explication possible de nos résultats. On pourrait supposer que l'effet inhibiteur sur l'expression du SR d'un traitement prolongé à l'IFN- $\gamma$ , soit dû à l'épuisement des co-activateurs CBP/p300 et à d'autres interactions avec différents niveaux de régulation de ces deux voies de signalisation.

Pour expliquer la stimulation de l'expression du SR par l'IFN- $\gamma$ , on peut invoquer une synergie entre l'activation des sites AP-1/ets et GAS dans la trans-activation de la transcription du SR; une situation de coopération semblable a déjà été démontrée pour le promoteur du gène de l'inhibiteur tissulaire de la méthalloprotéinase 1 (TIMP-1) (Bugno et al., 1995).

Il existe plusieurs points de contact entre les deux voies de signalisation ou le PMA et l'IFN- $\gamma$  pourraient coopérer dans l'activation de la voie des MAP kinases impliquées dans l'activation des facteurs AP-1/ets et STAT. Nous présentons un schéma des interactions possibles entre la voie de signalisation AP-1/Ras et celle de STAT/JAK dans la figure V-2.

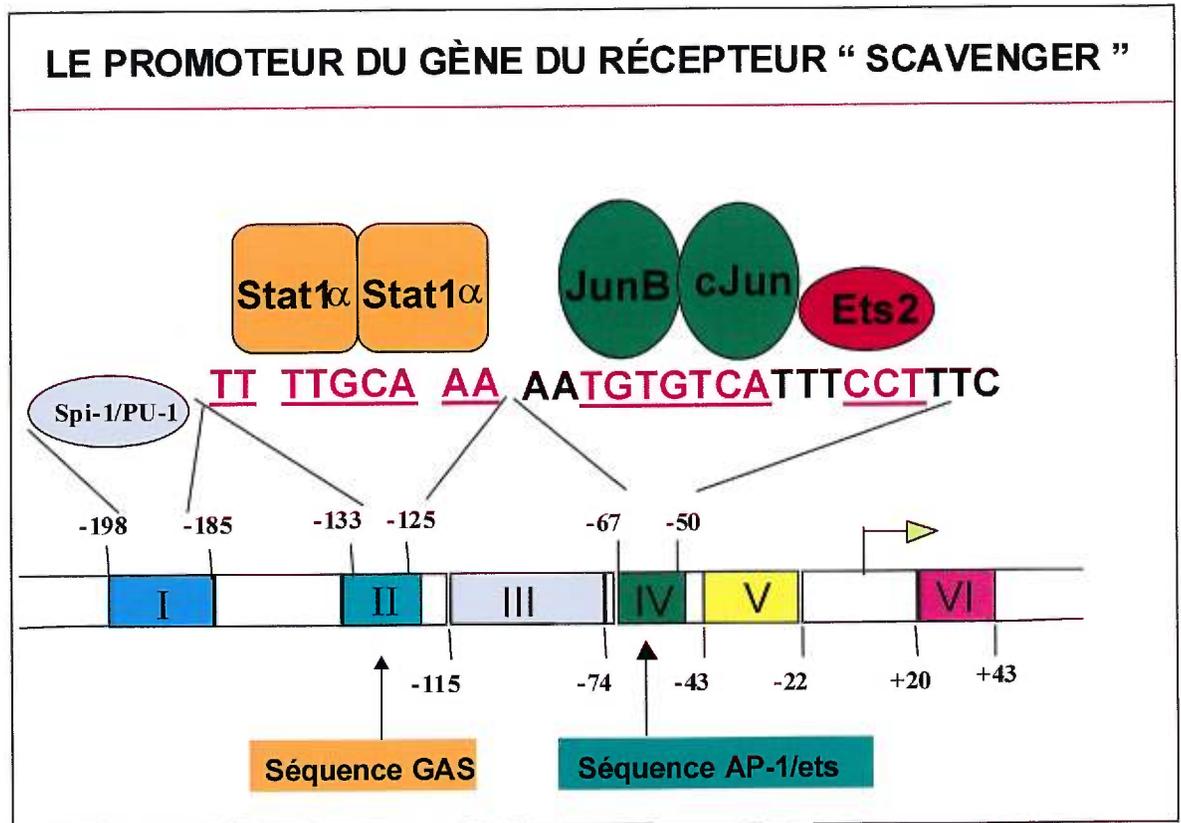
Le PMA est aussi impliqué dans la régulation transcriptionnelle du récepteur de l'IFN- $\gamma$  durant la différenciation des cellules de la lignée monocyttaire THP-1 en macrophages. Le traitement avec le PMA aurait un effet rapide et stimulateur sur l'expression du récepteur de l'IFN- $\gamma$ , effet qui est renversé par le traitement prolongé avec l'IFN- $\gamma$  (Mao et al., 1990). Un tel effet du PMA sur le récepteur de l'IFN- $\gamma$  suggère une autre voie d'interaction entre le PMA et l'IFN- $\gamma$  dans la régulation de certains gènes.

Un phénomène très important dans la différenciation des cellules est l'adhérence au substrat, processus qui dépend des intégrines, qui sont à la fois des molécules d'adhérence et de transmission du signal de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur et *vice versa* (revue par Clark et Brugge, 1995).

L'analyse des intégrines qui reconnaissent le motif RGD induites durant la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages, suite au traitement avec le PMA et avec l'IFN $\gamma$ , démontre que le PMA augmente l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , et induit aussi l'expression d'une autre intégrine que nous n'avons pas encore identifiée. L'IFN- $\gamma$  n'a aucun effet sur l'induction de ces intégrines, qu'il soit ajouté seul ou en même temps que le PMA.

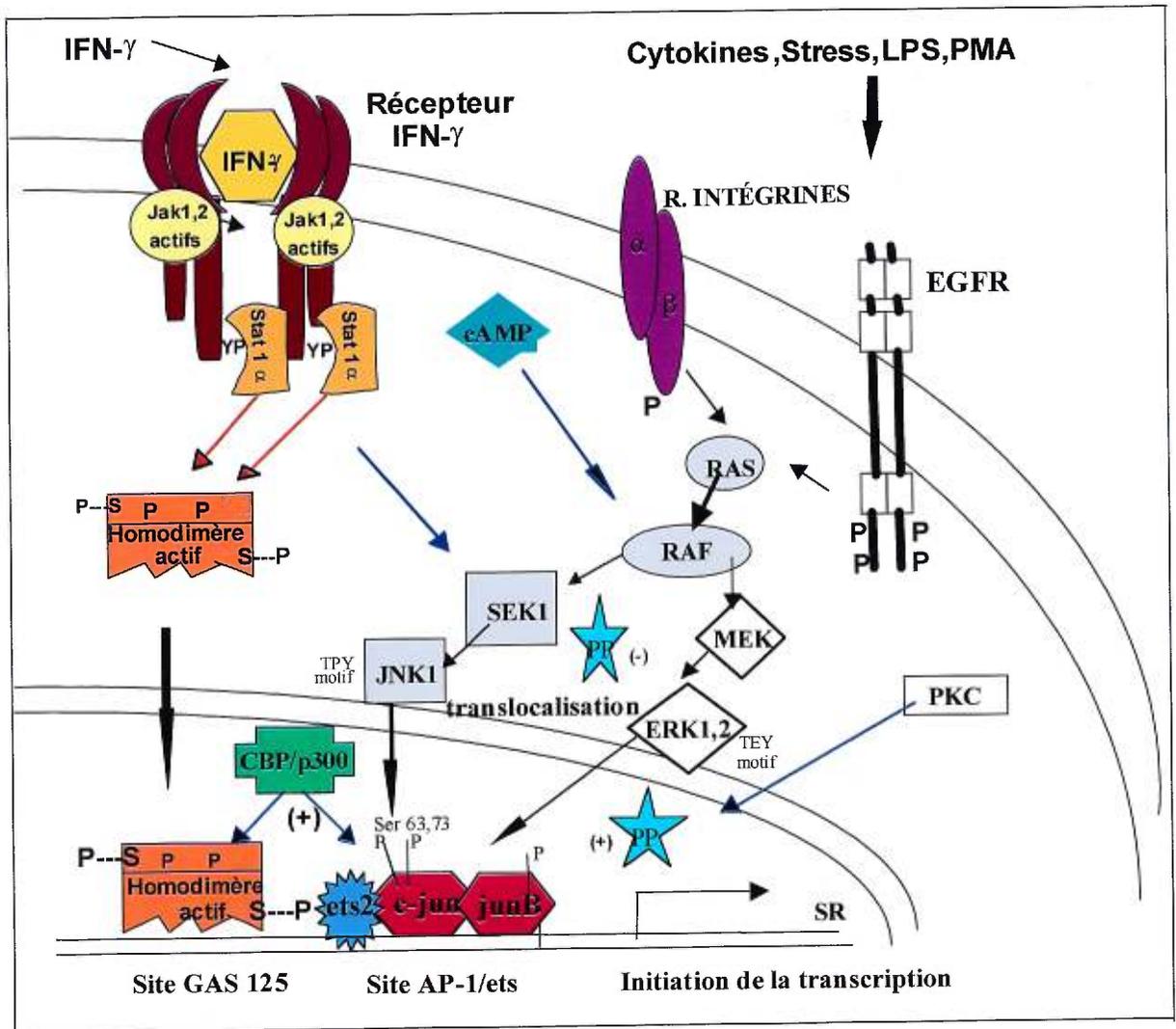
Des recherches sont prévues pour identifier ces intégrines et pour déterminer quel serait leur rôle dans la transduction du signal d'induction du récepteur "scavenger".

Une multitude de facteurs, de conditions, et de processus peuvent moduler la réponse transcriptionnelle du SR durant la différenciation des cellules THP-1 et les monocytes humains. Il est clair que la compréhension des mécanismes intimes de l'activation de la transcription du SR demande à être approfondie. Des travaux sont en cours dans notre laboratoire pour la caractérisation par "super shift" des composants du complexe protéique qui se lie sur le site AP-1 du promoteur du SR en présence du PMA ou en présence de l'IFN- $\gamma$  dans les cellules THP-1 et en présence du SA ou de l'IFN- $\gamma$  dans les monocytes humains.



**FIGURE V-1. Nouvelle structure fonctionnelle du promoteur du gène du SR avec les sites responsables de la transcription.**

La figure présente l'emplacement du site GAS fonctionnel (découvert par notre groupe de recherche), entre les deux sites régulateurs connus Spi-1/PU-1 et AP-1/ets dans le promoteur du SR (adapté de Moulton et al., 1994)



**FIGURE V-2. Voies de signalisation impliquées dans l'expression du SR.**

La figure présente les niveaux d'interactions possibles entre les voies de signalisation de l'IFN- $\gamma$  et de MAPK impliquées dans la régulation de l'expression du SR.

Interactions au niveau du cytosol: stimulation des JNK1 et ERK1,2 par l'IFN- $\gamma$ .

Interactions au niveau du noyau: compétition pour les co-activateurs.

Interactions au niveau du promoteur: coopération entre les sites régulateurs.

Adapté de: Cano E., TIBS, **20**, 1995, Waskiewicz A. J., Curr. Opin. Cell. Biol. **7**, 1995, Davis R., TIBS **19**, 1994 et Stark R. G., Annu. Rev. Biochem. **20**, 1998.

STAT= transducteur du signal et activateur de la transcription, ERK1,2= kinase1,2 régulée par les signaux externes, EGFR= récepteur du facteur de croissance épidermique, JNK= kinase du domaine amino terminale de Jun, GAS= site d'activation par l'IFN-gamma, JAK= kinase Janus, SEK1= kinase1 pour SAPK/ERK, MEK= kinase pour MAPK/ERK, CBP= protéine de liaison du CREB, AP-1/ets= protéine activatrice-1/E26 transformation specific, PKC= protéine kinase C, LPS= lipopolysaccharide, PMA= phorbol-12-myristate-13-acétate, PP= protéine phosphatase, YP= tyrosine phosphorylée.

## VI. RÉFÉRENCES

1. Adunyah S. E., Unlap T. M., Wagner F. and Kraft A. S. **1991**. Regulation of c-jun expression and AP-1 enhancer activity by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Biol. Chem.* 266, 5670-5675.
2. Aftring R.P. and Freeman M.W. **1995**. Structure of the murine macrophage scavenger receptor gene and evaluation of sequences that regulate expression in the macrophage cell line, P388D1. *J. Lipid Res.* 36, 1305-1314.
3. Angel P., Imagawa M., Chiu R., Stein B., Imbra R. J., Rahmsdorf H. J., Jonat C., Herrlich P. and Karin M. **1987**. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
4. Angel P., Hattori K., Smeal T. and Karin M. **1988**. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875-885.
5. Angel P. and Karin M. **1991**. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-157.
6. Aperlo C., Pognonec P., Stanley E. R. and Boulukos K. E. **1996**. Constitutive c-ets2 expression in M1D+ myeloblast leukemic cells induces their differentiation to macrophages. *Mol. Cell Biol.* 16, 6851-6858.
7. Arts J., Grimbergen J., Toet K. and Kooistra T. **1999**. On the role of c-Jun in the induction of PAI-1 gene expression by phorbol ester, serum, and IL-1 $\alpha$  in HepG2 cells. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 39-46.
8. Ashkenas J., Penman M., Vasile E., Acton S., Freeman M. and Krieger M. **1993**. Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors. *J. Lipid Res.* 34, 983-1000.

9. Bickel P. E. and Freeman M. W. **1992**. Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *J. Clin. Invest.* *90*, 1450-1457.
10. Bossy-Wetzel E., Bakiri L. and Yaniv M. **1997**. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* *16*, 1695-1709.
11. Boulukos K. E., Pognonec P., Sariban E., Bailly M., Lagrou C. M. and Ghysdael J. **1990**. Rapid and transient expression of Ets2 in mature macrophages following stimulation with cMGF, LPS, and PKC activators. *Genes Dev.* *4*, 401 - 409.
12. Brown M. S. and Goldstein J. L. **1983**. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* *52*, 223-261.
13. Bruder J. T., Heidecker G. and Rapp U. R. **1992**. Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev.* *6*, 545-556.
14. Brugge J. S., and McCormick F. **1999**. Cell regulation intracellular networking. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 173-176.
15. Bugno M., Graeve L., Gatsios P., Koj A., Heinrich P. C., Travis J. and Kordula T. **1995**. Identification of the interleukin 6/ oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promoter. *Nucleic Acids Res.* *23*, 5041-5047.
16. Cano E. and Mahadevan L. C. **1995**. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 117-122.

17. Castellazzi M., Spyrou G., La Vista N., Dangy J-P., Piu F., Yaniv M. and Brun G. **1991**. Overexpression of c-jun, junB, junD affects cell growth differently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 8890-8894.
18. Chan E. D., Winston B. W., Jarpe M. B., Wynes M. W. and Riches D. W. H. **1997**. Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 13167-13174.
19. Chiu R., Angel P. and Karin M. **1989**. Jun-B differs in its biological properties from and is a negative regulator of c-Jun. *Cell* *59*, 979-986.
20. Clark E. A. and Brugge J. S. **1995**. Integrins and Signal Transduction Pathways: The Road Taken. *Science* *268*, 233-239.
21. Clinton S. K., Underwood R., Hayes L., Sherman M. L., Kufe D. W. and Libby P. **1992**. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* *140*, 301-316.
22. Curran T. and Franza B. R. Jr. **1988**. Fos and Jun: The AP-1 Connection. *Cell* *55*, 395-397.
23. Daniel-Lamazière J-M., Lacolley P., Bézie Y., Challande P. and Laurent S. **1997**. Interactions cellule/matrice et propriétés élastiques des gros troncs artériels. *Med. Sci.* *13*, 799-808.
24. Daugherty A., Cornicelli J. A., Welch K., Sendobry S. M. and Rateri D. L. **1997**. Scavenger receptors are present on rabbit aortic endothelial cells in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 2369-2375.
25. Davis R. J. **1994**. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends. Biochem. Sci.* *19*, 470-473.

26. De Kimpe S. J., Änggard E. E. and Carrier M. J. **1998**. Reactive oxygen species regulate macrophage scavenger receptor type I, but not type II, in the human monocytic cell line THP-1. *Mol. Pharmacol.* *53*, 1076-1082.
27. Deng T. and Karin M. **1993**. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes & Dev.* *7*, 479-490.
28. Dufva M., Svenningsson A. and Hansson G. K. **1995**. Differential regulation of macrophage scavenger receptor isoforms: mRNA quantification using the polymerase chain reaction. *J. Lipid Res.* *36*, 2282-2290.
29. Dusanter-Fourt I., Mayeux P. and Gisselbrecht S. **1994**. Transduction du signal par les récepteurs de cytokines. *Med. Sci.* *10*, 825-835.
30. Emi M., Asaoka H., Matsumoto A., Itakura H., Kurihara Y., Wada Y., Kanamori H., Yazaki Y., Takahashi E., Lepert M., et al., **1993**. Structure, organisation, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J. Biol. Chem.* *268*, 2120-2125.
31. Estus S., Zaks W. J., Freeman R. S., Gruda M., Bravo R. and Johnson E. M. Jr. **1994**. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* *127*, 1717-1727.
32. Fogelman A.M., Haberland M.E., Seager J., Hokom M. and Edwards P. A. **1981**. Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.* *22*, 1131-1141.

33. Franklin C. C., Sanchez V., Wagner F., Woodgett J. R. and Kraft A. S. **1992**. Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7247-7251.
34. Fraser I., Hughes D. and Gordon S. **1993**. Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* **364**, 343-346.
35. Freeman M., Ashkenas J., Rees D. J., Kingsley D. M., Copeland N. G., Jenkins N. A. and Krieger M. **1990**. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and II murine macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8810-8814.
36. Freeman M., Ekkel Y., Rohrer L., Penman M., Freedman N.J., Chisolm G.M. and Krieger M. **1991**. Expression of type I and type II bovine scavenger receptor in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4931-4935.
37. Garrington T. P. and Johnson G. L. **1999**. Organisation and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 211-218.
38. Gelman L., Staels B. and Auwerx J. **1997**. Rôle des co-facteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux hormonaux par les récepteurs nucléaires. *Med. Sci.* **13**, 961-970.
39. Geng Y-J. and Hansson G. K. **1992**. Interferon- $\gamma$  inhibits Scavenger Receptor expression and foam cell formation in Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Clin. Invest.* **89**, 1322-1330.

40. Geng Y-J., Kodama T. and Hansson G. K. **1994**. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb.* *14*, 798-806.
41. Giry C., Giroux L. M., Roy M., Davignon J. and Minnich A. **1996**. Characterisation of inherited scavenger receptor overexpression and macrophage phenotype in a normolipidemic subject with planar xanthomas. *J. Lipid Rech.* *37*, 1422-1435.
42. Glass C. K., Rose D. W. and Rosenfeld M. G. **1997**. Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 222-232.
43. Goldman P. S., Tran V. K. and Goodman R. H. **1997**. The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* *52*, 103-119; discussion 119-120.
44. Goldstein J.L. Ho Y.K. Basu S.K. and Brown M.S. **1979**. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *76*, 333-337.
45. Grewal T., Boudreau M., Roy M., Chamberland A., Lefebvre C., Lavigne J., Davignon J. and Minnich A. **1998**. Expression of  $\gamma$ -IFN responsive genes in scavenger receptor over-expressing monocytes is associated with xanthomatosis. *Atherosclerosis* *138*, 335-345.
46. Grewal T., Priceputu E., Davignon J., and Bernier L. Stimulation of scavenger receptor type A expression in IFN- $\gamma$  activated early monocytes : identification of an IFN- $\gamma$  responsive element in the scavenger receptor-A promoter. (Manuscrit en préparation).

47. Guidez F., Li A. C., Horvai A., Welch J. S. and Glass C. K. 1998. Differential utilisation of Ras signaling pathways by macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF receptors during macrophage differentiation. *Mol. Cell Biol.* 18, 3851-3861.
48. Gupta S., Pablo A. M., Jiang X-c., Wang N., Tall A. R. and Schindler C. 1997. IFN- $\gamma$  potentiates atherosclerosis in ApoE Knock-out mice. *J. Clin. Invest.* 99, 2752-2761.
49. Hamilton J. A. 1993. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages-some controversies. *Immunol. Today* 14, 18-24.
50. Haslinger A. and Karin M. 1985. Upstream promoter element of the human metallothionein-IIA gene can act like an enhancer element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8572-8756.
51. Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A. and Karin M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135-2148.
52. Hilberg F., Aguzzi A., Howells N. and Wagner E. F. 1993. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 179-181.
53. Horvai A. E., Xu L., Korzus E., Brard G., Kalafus D., Mullen T. M., Rose D. W., Rosenfeld M. G. and Glass C. K. 1997. Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1074-1079.
54. Horvath C. M. and Darnell J. E. Jr. 1997. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 233-239.

55. Hsu H.-Y., Nicholson A. C. and Hajjar D. P. **1996**. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J. Biol. Chem.* *271*, 7767-7773.
56. Ihle J. N. **1995**. Cytokine receptor signalling. *Nature* *377*, 591-594.
57. Imamura K., Dianoux A., Nakamura T. and Kufe D. **1990**. Colony-stimulating factor-1 activates protein kinase C in human monocytes. *EMBO J.* *9*, 2423-2428.
58. Ishibashi S., Inaba T., Shimano H., Harada K., Inoue I., Mokuno H., Mori N., Gotoda T., Takaku F. and Yamada N. **1990**. Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* *265*, 14109-14117.
59. Jayaraman G., Srinivas R., Duggan C., Ferreira E., Swaminathan S., Somasundaram K., Williams J., Hauser C., Kurkinen M., Dhar R., Weitzman S., Buttice G. and Thimmapaya B. **1999**. p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter. *J. Biol. Chem.* *274*, 17342-17352.
60. Juliano R. L. and Haskill S. **1993**. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* *120*, 577-585.
61. Kamei Y., Xu L., Heinzl T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S. K., Heyman R. A., Rose D. W., Glass C. K., and Rosenfeld M. G. **1996**. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* *85*, 403-414.
62. Kaplan J.-C. et Delpech M. **1993**. La régulation de l'expression des gènes: différenciation, cycle cellulaire, embryologie moléculaire, dans *Biologie moléculaire et médecine. 2e édition*, Flammarion/Médecine-Sciences, Paris, p.89-143.

63. Karin M. and Hunter T. **1995**. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757.
64. Karin M., Liu Zg. and Zandi E. **1997**. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.
65. Kodama T., Reddy P., Kishimoto C. and Krieger M. **1988**. Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9238-42.
66. Kodama T., Freeman M., Rohrer L., Zabrecky J., Matsudaira P. and Krieger M. **1990**. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343, 531-570.
67. Kohn F., R. and Klingemann H-G. **1991**. Regulation of fibronectin receptor ( $\alpha 5\beta 1$ ) mRNA expression in human monocytes and monocytes derived macrophages by activation/differentiation signals. *Exp. Hematol.* 19, 653-658.
68. Kolch W., Heidecker G., Kochs G., Hummel R., Vahidl H., Mischak H., Finkenzeller G., Marme D. and Rapp U. R. **1993**. Protein kinase C-alpha activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature (London)* 364, 249-252.
69. Kouzarides T. and Ziff E. **1988**. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336, 646-651.
73. Krieger M. and Herz J. **1994**. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601-637.
70. Laemmli U. K., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

71. Lamarche B. and Lewis G. F. **1998**. Atherosclerosis prevention for the next decade: Risk assessment beyond low density lipoprotein cholesterol. *Can. J. Cardiol.* *14*, 841-851.
72. Landschulz W. H., Johnson P. F. and McKnight S. L. **1988**. The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* *240*, 1759-1764.
73. Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R. **1987**. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* *49*, 741-752.
74. Lee, W., Lin, C. and Curran, T. **1988**. Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilisation and results in increased amount of partially modified fos protein. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 5521-5527.
75. Li H., Freeman M. W. and Libby P. **1995**. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J. Clin. Invest.* *95*, 122-133.
76. Lin A., Frost J., Deng T., Smeal T., Al-Alawi N., Kikkawa U., Hunter T., Brenner D. and Karin M. **1992**. Casein Kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* *70*, 777-789.
77. Lougheed M., Ming Lum C., Ling W., Suzuki H., Kodama T. and Steinbrecher U. P. **1997**. High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. *J. Biol. Chem.* *272*, 12938-12944.
78. Lucas D. M., Lokuta M. A., McDowell M. A., Doan J. E. S. and Paulnock D. M. **1998**. Analysis of the IFN- $\gamma$ -signaling pathway in macrophages at different stages of maturation. *J. Immunol.* *160*, 4337-4342.

79. Mao C., Merlin G. and Aguet M. **1990**. Differential regulation of the human IFN- $\gamma$  receptor expression in Raji and IM9 lymphoblastoid cells versus THP-1 monocytic cells by IFN- $\gamma$  and phorbol myristate acetate. *J. Immunol.* *144*, 4688-4696.
80. Matsumoto A., Naito M., Itakura H., Ikemoto S., Asaoka H., Hayakawa I., Kanamori H., Aburatani H., Takaku F., Suzuki H., Kobari Y., Miyai T., Takahashi K., Cohen E. H., Wydro R., Housman D. E. and Kodama T. **1990**. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 9133-9137.
81. Mavrothalassitis G. J., Watson D. K. and Papas T. S. **1990**. Molecular and functional characterization of the promoter of ETS2, the human c-ets-2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 1047-1051.
82. McCarthy J. B., Vachhani B. V., Wahl S. M., Finbloom D. S. and Feldman G. M. **1997**. Human monocyte binding to fibronectin enhances IFN- $\gamma$ -induced early signaling events. *J. Immunol.* *159*, 2424-2430.
83. Mehta F., Lallemand D., Pfarr C. M. and Yaniv M. **1997**. Transformation by ras modifies AP-1 composition and activity. *Oncogene* *14*, 837-847.
88. Mietus-Snyder M., Frieri A., Glass C. K. and Pitas R. E. **1997**. Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: A role for oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 969-978.
84. Mietus-Snyder M., Glass C. K. and Pitas R. E. **1998**. Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBP $\beta$ . Both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *18*, 1440-1449.

85. Minden A. and Karin M. **1997**. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.
86. Momiyama N., Shimada H. and Mitsuhashi M. **1996**. Suppression of c-jun by antisense oligonucleotides inhibits cell adhesion but not respiratory burst during phorbol ester-induced differentiation of U937 human monoblastic cells. *Cell Growth & Differ.* 7, 1005-1012.
87. Moulton K. S., Semple K., Wu H. and Glass C. K. **1994**. Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4408-4418.
88. Muller M. M., Schreiber E., Schaffner W. and Matthias P. **1989**. Rapid test for in vivo stability and DNA binding of mutated octamer binding proteins with 'mini extracts' prepared from transfected cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6420.
89. Nollert M. U., Panaro N. J. and McIntire L. V. **1992**. Regulation of genetic expression in shear stress-stimulated endothelial cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 665, 94-104.
90. Ogawa M. **1993**. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853.
91. Pearson A. M., 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 20-28.
92. Pitas R.E. **1990**. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells: Up-regulation by phorbol esters. *J.Biol. Chem.* 265, 12722-12727.
93. Pulverer B. J., Kyriakis J. M., Avruch J., Nikolakaki E. and Woodgett J. R. **1991**. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.

94. Rajotte D., Sadowski H. B., Haman A., Gopalbhai K., Meloche S., Liu L., Kristal G. and Hoang T. **1996**. Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 88, 2906-2916.
95. Ricote M., Li A. C., Willson T. M., Kelly C. J. and Glass C. K. **1998**. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-86.
96. Ross R. **1993**. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature (London)* 362, 801-809.
97. Ryder K. and Nathans D. **1988**. Induction of proto-oncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8464-8467.
98. Sakai M., Shichiri M., Hakamata H. and Horiuchi S. **1998**. Endocytosed Lysophosphatidylcholine, through the scavenger receptor, plays an essential role in oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 119-124.
99. Schmitz G., Orso E., Rothe G. and Klucken J. **1997**. Scavenging, signalling and adhesion coupling in macrophages: implications for atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 8, 287-300.
100. Scholer H., Haslinger A., Heguy A., Holtgreve H. and Karin M. **1986**. In vivo competition between a metallothionein regulatory element and the SV40 enhancer. *Science* 232, 76-80
101. Schütte J., Viallet J., Nau M., Segal S., Fedorko J. and Minna J. **1989**. JunB inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* 59, 987-997.

102. Sevilla L., Aperlo C., Dulic V., Chambard J. C., Boutonnet C., Pasquier O., Pognonec P. and Boulukos K. E. **1999**. The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2624-2634.
103. Smeal T., Binetruy B., Mercola D. A., Birrer M. and Karin M. **1991**. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature (London)* *354*, 494-498.
104. Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R. G., Silverman R. H. and Schreiber R. D. **1998**. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 227-264.
105. Steinberg D., Carew T. E., Fielding C., Fogelman A. M., Mahley R. W., Sniderman A. D. and Zilversmit D. B. **1989**. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* *80*, 719-723.
106. Steinbrecher U. P. **1999**. Receptors for oxidized low density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* *1436*, 279-298.
107. Stewart M., Thiel M. and Hogg N. **1995**. Leukocytes integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 690-696.
108. Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., Kamada N., Kataoka M., Jishage K., Sakaguchi H., Kruijt J. K., Higashi T., Suzuki T., van Berkel T. J., Horiuchi S., Takahashi K., Yazaki Y. and Kodama T. **1997**. The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) in vivo: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J. Atheroscler. Thromb.* *4*, 1-11
109. Szabo E., Preis L. H., Brown P. H. and Birrer M. J. **1991**. The role of jun and fos gene family members in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced hemopoietic differentiation. *Cell Growth & Differ.* *2*, 475-482.

110. Szabo E., Preis L. H. and Birrer M. J. **1994**. Constitutive cJun expression induces partial macrophage differentiation in U-937 cells. *Cell Growth & Differ.* **5**, 439-446.
111. Thibault G. Sodium Dodecyl Sulfate-stable complexes between Echistatin and RGD-dependent Integrins: A novel approach to study Integrins. Manuscrit en préparation.
112. Valledor A.F., Borràs F.E., Cullel-Young M. and Celada A. **1998**. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leuk. Biol.* **63**, 405-416.
113. van der Kooij M. A., Morand O. H., Kempen H. J. and van Berkel T. J. **1996**. Decrease in scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages treated with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 106-114.
114. van Kooyk Y. and Figdor C. G. **1993**. Lymphocyte adhesion mediated by integrins. *Res. Immunol.* **144**, 709-722.
115. van Lenten B. J. and Fogelman A. M. **1992**. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* **148**, 112-116.
116. Villanova J. G., Jose L., Lucena D., Arcás N. F. and Engel A. R. **1996**. Increased expression of scavenger receptor type I gene in human peripheral blood from hyperlipidemic patients determined by quantitative additive RT-PCR. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 135-141.
117. Vogt P. K. and Bos T. J. **1990**. Jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* **55**, 1-35.

118. Vojtek A. B., Hollenberg S. M. and Cooper J. A. **1993**. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205-214.
119. Waskiewicz A. J. and Cooper J. A. **1995**. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascade and phosphatase regulation in mammals yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 798-805.
120. Wasyluk B., Hahn S. L. and Giovane A. **1993**. The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211, 7-18.
121. Watson D. K., McWilliams M. J., Lapis P., Lautenberger J. A., Schweinfest C. W. and Papas T. S. **1988**. Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7862-7866.
122. Wolberger C. **1993**. Transcription factor structure and DNA binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 3-10.
123. Wu H., Moulton K., Horvai A., Parik S. and Glass C. K. **1994**. Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2129-2139.
124. Young H. A. and Hardy K. J. **1995**. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* 58, 373-381.
125. Yurochko A. D., Liu, D. Y., Eierman, D. and Haskill S. **1992**. Integrins as primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9034-9039.
126. Zhang H., Yang Y. and Steinbrecher U.P. **1993**. Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *J. Biol. Chem.* 268, 5535-5542.

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier et témoigner toute ma reconnaissance au **Dr Jean Davignon**, directeur du Groupe de Recherches sur les hyperlipidémies et l'Athérosclérose de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour son précieux soutien financier. Je voudrais le remercier pour son esprit critique, sa rigueur scientifique et toute l'aide accordée avec générosité et compétence durant mes études et la rédaction de ce mémoire.

Je remercie sincèrement le **Dr Suzanne Lussier-Cacan** pour avoir cru en mes capacités, pour son soutien scientifique permanent, ses encouragements, sa sympathie et ses observations judicieuses qui m'ont bien aidée tout au long de mes études. Je la remercie aussi pour m'avoir donné l'occasion d'acquérir l'excellente formation scientifique que j'envisageais à mon arrivé comme étudiante.

Toute mon entière reconnaissance va au **Dr Lise Bernier** que j'ai eu la grande chance et l'honneur d'avoir comme superviseur de mes travaux et qui avec patience, dynamisme et rigueur scientifique m'a beaucoup aidé à mener ce projet à bonne fin. Elle a été pour moi non seulement une très compétente codirectrice de recherches, mais une vraie amie qui avec ses remarques de grande qualité humaine et scientifique a su m'encourager, me donner confiance pour poursuivre avec enthousiasme le complexe et captivant univers de la recherche.

Je prie les techniciennes de recherche du laboratoire de biologie moléculaire, Ann Chamberland, Chantal Lefebvre et Jacques Lavigne de bien vouloir accepter toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour l'aide inestimable, les conseils et la patience qu'ils ont gentiment prouvée envers moi tout au long de ce projet. Par dessus tout je voudrais leur dire combien j'apprécie leur compétence, leur amitié, les observations pertinentes et le soutien technique de qualité qui a contribué à ma formation professionnelle.

Je suis très reconnaissante à tout le personnel technique du laboratoire: Michel Tremblay, Lucie Boulet, Claudia Rodriguez, Louis-Jacques Fortin, Nancy Doyle, Hélène Jacques. Ils ont su toujours trouver le temps pour m'aider à apprendre les secrets de la recherches. Avec compétence, gentillesse et dans une ambiance amicale ils m'ont aidé à m'intégrer et à réussir dans mon travail.

Je tiens à remercier le Dr Laurence Mabile, une vraie amie qui m'a soutenue moralement et m'a aidé à passer les moments difficiles. Avec ses opinions très concises et compétentes, avec son esprit ouvert, elle a contribué à mon intégration professionnelle. J'adresse mes remerciements à mes collègues d'études Caroline Marcoux et Isabelle Gagnon, pour leur gentillesse et leur attitude qui m'ont aidé à passer de bons moments dans ce groupe.

Je voudrais remercier sincèrement les gens du secrétariat et du service informatique, Lise St-Germain, Lisa Tassoni, Micheline Caron, Joanne Griffith, Aline Bolduc, et Gilles De Serres pour l'amabilité, la compétence et l'aide qu'ils m'ont gentiment accordés chaque fois que j'ai sollicité.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à l'infirmière chef de la clinique de lipides, Denise Dubreuil, pour le travail indispensable de prélèvements sanguins et la sollicitude qu'elle a prouvé tout le temps de notre collaboration.

Je remercie le Dr Gaétan Thibault pour l'amabilité, la sollicitude, et le travail excellent d'identification des intégrines, qui fut très apprécié.

Ma grande reconnaissance va à mon époux Viorel et à mes enfants Liviu et Andra qui m'ont supportée et soutenue avec amour et confiance tout au long de mes études et de la rédaction de ce projet, et je voudrais leur témoigner qu'ils ont été et ils sont toujours mon grand atout.

Le projet a été subventionné par **Novartis Pharma Canada/MRC UI 11407** à qui je témoigne toute ma reconnaissance.