HAL
open science

Effets de la protéine C-réactive sur la biologie du monocyte humain dans l'athériosclérose à travers une analyse du transcriptome

Didier Hanriot

To cite this version:

Didier Hanriot. Effets de la protéine C-réactive sur la biologie du monocyte humain dans l'athériosclérose à travers une analyse du transcriptome. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10119 . tel-01777273

HAL Id: tel-01777273

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777273

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

FACULTE DE MEDECINE

N° attribué par la bibliothèque
/--/--/--/--/--/--/--/--/--/--/--/

Thèse
Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Ecole Doctorale : *Biologie Santé Environnement*

Spécialité : *Ingénierie cellulaire et tissulaire*

Par

Didier HANRIOT

EFFETS DE LA PROTEINE C REACTIVE SUR LA BIOLOGIE DU MONOCYTE HUMAIN DANS L'ATHEROSCLEROSE A TRAVERS UNE ANALYSE DU TRANSCRIPTOME

Thèse soutenue publiquement Le 7 Avril 2008

Directeur de thèse : Monsieur le Pr. Dan LONGROIS (Nancy I)

Membres du jury :

Rapporteurs : Madame le Dr. Cécile DUPLAA (Pessac)
Monsieur le Dr. Daniel WAGNER (Luxembourg)

Examinateurs : Monsieur le Pr. Stéphane LAURENT (Paris)
Monsieur le Pr. Jean MANTZ (Clichy)
Monsieur le Pr. Faïez ZANNAD (Nancy)

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

FACULTE DE MEDECINE

N° attribué par la bibliothèque
/--/--/--/--/--/--/--/--/--/--/--/

Thèse
Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Ecole Doctorale : *Biologie Santé Environnement*

Spécialité : *Ingénierie cellulaire et tissulaire*

Par

Didier HANRIOT

EFFETS DE LA PROTEINE C REACTIVE SUR LA BIOLOGIE DU MONOCYTE HUMAIN DANS L'ATHEROSCLEROSE A TRAVERS UNE ANALYSE DU TRANSCRIPTOME

Thèse soutenue publiquement Le 7 Avril 2008

Directeur de thèse : Monsieur le Pr. Dan LONGROIS (Nancy I)

Membres du jury :

Rapporteurs : Madame le Dr. Cécile DUPLAA (Pessac)
Monsieur le Dr. Daniel WAGNER (Luxembourg)

Examinateurs : Monsieur le Pr. Stéphane LAURENT (Paris)
Monsieur le Pr. Jean MANTZ (Clichy)
Monsieur le Pr. Faïez ZANNAD (Nancy)

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Faiez ZANNAD,

Qui m'a accueilli dans son laboratoire et donné les moyens de réaliser ce travail.

Il me fait l'honneur de juger cette thèse, qu'il veuille trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de toute ma considération.

Monsieur le Professeur Dan LONGROIS,

Qui m'a confié et suivi ce travail. Il m'a fait profiter de ses grandes et inestimables connaissances scientifiques et médicales. A travers sa confiance, ses recommandations, son dynamisme et son humanisme, il m'a transmis le plaisir de la recherche fondamentale. Qu'il soit assuré de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur Cécile DUPLAA,

Qui m'a fait un grand hommage et plaisir en acceptant de juger ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de ma grande considération.

Monsieur le Docteur Daniel WAGNER,

Qui a bien voulu me faire la faveur de juger cette thèse, je tiens à lui adresser mon profond respect et toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean MANTZ,

Qu'il soit vivement remercié pour le temps qu'il m'a accordé en jugeant ce travail.

Monsieur le Professeur Stéphane LAURENT,

Qui m'a fait le privilège d'accepter de juger ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

Qu’il me soit permis de remercier très sincèrement,

Madame le Docteur Véronique REGNAULT et Monsieur le Docteur Patrick LACOLLEY,

Pour leurs excellents conseils scientifiques et leurs concours dans l’aboutissement de cette thèse. Qu’ils soient assurés de toute ma sympathie et ma grande reconnaissance.

Madame le Docteur Ketsia HESS,

Sans qui cette thèse ne serait pas ce qu’elle est. Je la remercie pour ses précieux conseils, aussi bien théorique que pratique, en biologie moléculaire. J’ai appris beaucoup d’elle. Qu’elle soit assurée de mon immense gratitude pour sa précieuse aide scientifique de même que son soutien moral.

Madame le Docteur Armelle ROPARS,

Pour ses riches conseils en immunologie et en culture cellulaire. Merci pour son réconfort et son amabilité durant ces années de recherche.

Monsieur le Professeur Paul-Michel MERTES,

Qui m’a apporté son appui et ses connaissances aussi bien scientifiques que médicales lors des nombreuses réunions de travail au cours de cette thèse. Qu’il soit assuré de toute ma considération.

Messieurs les Professeurs Athanase BENETOS et Pierre-Yves MARIE,

Pour leurs excellents conseils scientifiques et médicaux partagés autour de ce projet.

Madame le Docteur Josette CAPIAUMONT,

Pour sa précieuse aide en culture cellulaire et pour m’avoir fait confiance en m’allouant certains enseignements.

Monsieur le Professeur Simon THORNTON,

Pour sa précieuse aide et ses excellents conseils scientifiques dans l'aboutissement de ce projet.

Monsieur le Professeur Jean-Louis GUEANT,

Chez qui j'ai fait mes premiers pas dans le monde de la recherche et qui a eu la gentillesse de me laisser accéder à l'équipement de PCR quantitative en temps réel de son laboratoire. Qu'il soit assuré de ma profonde et sincère estime.

Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE et Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD,

Qui ont eu l'amabilité de m'ouvrir les portes de leur laboratoire pour me donner accès aux techniques de cytométrie en flux.

Madame le Docteur Brigitte DOUSSET,

D'avoir participé à mon initiation dans le domaine de la recherche. Qu'elle soit assurée de toute mon amitié.

Qu'il me soit enfin permis de remercier de tout cœur,

Tous les membres du laboratoire INSERM U684 avec qui j'ai eu tant de plaisir à partager ces moments de travail pendant plus de trois ans…je pense en particulier à Adey, Audrey, Carlos, Carole, Fathia, Frédéric, Gaël, Gaëlle, Jean-Marc, Huguette, Patrick, Rosine, Sandrine, Yvan, Valérie,...et toutes celles et ceux avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

De même que toute l'équipe du service de Biochimie et Biologie moléculaire du Professeur Jean-Louis Guéant, en particulier le Docteur Isabelle Gastin pour son amabilité, le Docteur Rosa Maria Guéant avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer, Jean-Pierre Huet pour sa sympathie et enfin, le Professeur Farès Namour pour ses précieux conseils scientifiques.

A mes parents,

A mes frères, beaux frères et belles-sœurs,

A mes neveux et nièces,

A ma femme Idrissia qui m’a soutenu jusqu’au bout…

…et à mon fils Ziad à qui je dédie cette thèse.

PUBLICATIONS

- Publication n°1:

C-Reactive Protein induces pro- and anti-inflammatory effects, including activation of the liver X Receptor, on human monocytes.

Didier HANRIOT, Gaëlle BELLO, Armelle ROPARS, Carole SEGUIN-DEVAUX, Gaël POITEVIN, Sandrine GROSJEAN, Véronique LATGER-CANNARD, Yvan DEVAUX, Faiez ZANNAD, Véronique REGNAULT, Patrick LACOLLEY, Paul-Michel MERTES, Ketsia HESS and Dan LONGROIS.

Acceptée dans "Thrombosis and Haemostasis" (Thromb Haemost 2008; 99: 558–569)

A fait l'objet d'un Focus Editorial (Thromb Haemost 2008; 99: 461–462)

- Publication n°2:

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

Gaëlle BELLO and Frédéric CAILOTTO, Didier HANRIOT, Marie-Nathalie KOLOPP-SARDA,Véronique LATGER-CANNARD, Ketsia HESS, Faiez ZANNAD, Dan LONGROIS and Armelle ROPARS.

Acceptée dans "Atherosclerosis" (2008).

- Publication n°3:

Retinoic acid amplifies the host immune response to LPS through increased T lymphocytes number and LPS binding protein expression.

Carole SEGUIN-DEVAUX, Didier HANRIOT, Michèle DAILLOUX, Véronique LATGER-CANNARD, Faiez ZANNAD, Paul-Michel MERTES, Dan LONGROIS, Yvan DEVAUX.

Acceptée dans "Molecular and Cellular Endocrinology"

(Molecular and Cellular Endocrinology 245 (2005) 67–76)

- **Publication n°4:**

Extracellular Matrix Turnover and Inflammatory Markers Independently predict Functional Status and Outcome in Chronic Heart Failure. Collagen markers predict functional capacity.
Anca RADAUCEANU, Camille DUCKI, Jean-Marc VIRION, Ziad MALLAT, John McMURRAY, Dirk van VELDHUISEN, Luigi TAVAZZI, Josette CAPIAUMONT-VIN, Minjiang LI, Didier HANRIOT, Faiez ZANNAD.
Soumise à « Journal of Cardiac Failure ».

PRIX

Prix Lydie et Michel Wittner.
Effets de la Protéine C-Réactive sur la biologie du monocyte dans l'athérosclérose : analyse du transcriptome.
Université Henry Poincaré – Nancy – Novembre 2004.

ABREVIATIONS

aa :	acides aminés
aaUTP :	uridine triphosphate amino-allylée
ABCA1 :	ATP-binding cassette transporter A1
Ac :	anticorps
ADM :	adrenomédulline
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AGE :	advanced glycation end
AKT :	protéine kinase spécifique sérine-thréonine
Ang II :	angiotensine II
AP-1 :	activating protein-1
Apo E :	apolipoprotéine E
ARN :	acide ribonucléique
ARNa :	ARN amplifié amino allylé
ARNm :	ARN messager
ATP :	adénosine triphosphate
AVC :	accidents vasculaires cérébraux
A2M :	alpha-2 macroglobuline
cGMP :	cyclic guanosine monophosphate
C/EBP :	CCAAT/enhancer binding proteins
C1q :	fraction du complément
Ca^{2+} :	calcium
CCL-1 :	CC ligand 1
CCR-2 :	CC chemokine receptor 2
CCR-8 :	CC chemokine receptor 8
CHD :	maladie cardiaque coronarienne
CML :	cellule musculaire lisse
CO2 :	dioxyde de carbone
CPAg :	cellules présentatrices d'antigène
CRP :	protéine C-Réactive
CRPn :	CRP native
CRPm :	CRP monomérique
CRPp :	protéine C-Réactive purifiée commerciale
CRPr :	protéine C-Réactive recombinante
CRP-R :	récepteur de la CRP
CRPtg :	CRP humaine transgénique
Ct :	cycle seuil
CTP :	cytosine triphosphate
CTRL :	contrôle
CVD :	maladie cardiovasculaire
CXCR-4 :	CXC chemokine receptor 4
Cy3 :	cyanine 3
Cy5 :	cyanine 5
DAF :	decay accelerating factor
DEPC :	diethylpyrocarbonate
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DO :	densité optique
DTT :	dithio-. threitol
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
dUTP:	désoxyuridine triphosphate
dUTPaa :	désoxyuridine triphosphate amino-allylé
EDRF :	endothelium-derived relaxing factor
EDTA :	acide éthylène-diamine-tetraacétique
ELAM-1:	endothelial leukocyte adhesion molecule
eNOS :	endothelial nitric oxyde synthase
ERK :	extracellular signal-regulated kinase

Fc :	fragment cristallisable
FcγRI :	récepteur I au Fc des immunoglobulines
FcγRII :	récepteur II au Fc des immunoglobulines
FcRs :	récepteurs au Fc des immunoglobulines
FGF :	fibroblaste growth factor
FITC :	fluorescéine isothiocyanate
GT :	guanidine-thymine
GTP :	guanidine triphosphate
HAEC :	cellules endothéliales aortiques humaines
HDL :	high density lipoprotein
HLA-DR :	complexe majeur d'histocompatibilité
HNF-1 :	hepatocyte nuclear factor 1
hsCRP:	protéine C-Réactive ultra sensible
HSP-60 :	heat shock protein-60
ICAM :	molécule d'adhésion intercellulaire
IDL :	intermediate density lipoprotein
IDM :	infarctus du myocarde
IFNγ :	interféron gamma
IgA :	immunoglobuline A
IGF I :	insuline like growth factor I
IgG :	immunoglobuline G
IgM :	immunoglobuline M
IL-1 :	interleukine-1
IL-2 :	interleukine-2
IL-6 :	interleukine-6
IL-8 :	interleukine-8
K :	potassium
Kb :	kilobases
kDa :	kilodaltons
KO :	knock out
LDL :	low density lipoprotein
LPS :	lipopolysachharide
LXRα :	liver X receptor alpha
MAP :	mitogen-activated protein kinases
MCP-1 :	monocyte chemotactic protein 1
MCSF :	macrophage colony stimulating factor
MGCSF :	macrophage growth colony stimulating factor
MIP-1 :	macrophage inflammatory protein-1
MMP :	metalloproteinase
NF-κB :	nuclear factor-kappa B
NO :	monoxyde d'azote
NOS2 :	nitric oxyde synthase 2
OMS :	organisation mondiale de la santé
PAI-1 :	inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
PAI-2 :	inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 2
PBEF :	pre-B cell colony-enhancing factor
PBMC :	cellules mononuclées du sang périphérique
PBS :	tampon phosphate (phosphate buffer saline)
PCh :	phosphorylcholine
PCR :	polymerase chain reaction
PCRq :	PCR quantitative
PDGF :	platelet-derived growth factor
PE :	phycoérythrine
PECAM :	molécules d'adhésion « cellules endothéliales-plaquettes »
PGI_2 :	prostacycline CCR-2
PI3 kinase :	phophatidyl-inositol-3 phosphate kinase
PMA :	phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVD :	peripheral vascular disease
PVDF :	polyvinylidene difluoride

RE :	réticulum endoplasmique
SAP :	serum amyloid protein
SDF-1 :	stromal cell-derived factor-1
SFM :	serum free macrophage
SNP:	single nucleotide polymorphisme
SOD2 :	oxidation-protective superoxyde dismutase type 2
$sPLA_2$:	phospholipase A_2
STAT-3 :	signal transducer and activator of transcription 3
TAE :	tampon tris EDTA
TC :	cholestérol total
TGF-β :	transforming growth factor beta
THP-1 :	lignée cellulaire monocytaire
TIMP-1 :	tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1
TLR :	toll like receptor
Tm :	température de fusion
TNF-α :	tumor necrosis factor alpha
TRAIL :	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
u-PA :	urokinase plasminogene activator
USF1 :	upstream stimulating factor 1
UV :	ultraviolet
VCAM :	molecule d'adhésion des cellules vasculaires
VEGF :	vascular endothelial growth factor
VLDL :	very low density lipoprotein

Table des matières

INTRODUCTION-OBJECTIFS **9**
SITUATION DU SUJET **12**
1. Athérosclérose et inflammation **13**
1.1 L'athérosclérose **13**
1.1.1 Epidémiologie 13
1.1.2 Structure de la paroi vasculaire normale 16
1.1.2.1 Intima 16
1.1.2.2 Media 17
1.1.2.3 Adventice 17
1.1.3 Caractéristiques de la paroi vasculaire athéroscléreuse 18
1.2 Athérosclérose : de la théorie lipidique à l'inflammation **20**
1.2.1 Facteurs inducteurs de l'inflammation et de l'athérogenèse 20
1.2.2 La nature de la réponse inflammatoire 22
1.2.2.1 Interactions entre les cellules endothéliales, les monocytes et les lymphocytes T 22
1.2.2.2 Monocytes et immunité 26
1.2.2.3 Les plaquettes 29
1.2.3 La vulnérabilité de la plaque 31
1.2.3.1 Définition 31
1.2.3.2 Pathophysiologie de la formation de la plaque vulnérable 31
1.3 Les cibles de l'inflammation **33**
1.3.1 Lipoprotéines oxydées 33
1.3.2 Dyslipidémie 34
1.3.3 Hypertension 34
1.3.4 Diabète 34
1.3.5 Obésité 35
1.3.6 Infection 35
1.4 Biomarqueurs inflammatoires et pathologies cardiovasculaires **37**
1.4.1 Description des marqueurs de l'inflammation 37
1.4.1.1 Le fibrinogène 37
1.4.1.2 Les leucocytes 37
1.4.1.3 Les cytokines 38
1.4.1.4 Les molécules d'adhésion 38
1.4.1.5 Les immunoglobulines (Ig) 39
1.4.1.6 La protéine C – Réactive (CRP) 39
1.4.2 La CRP, biomarqueur de l'inflammation et du risque cardiovasculaire 39
1.4.3 Problèmes généraux liés à l'utilisation des biomarqueurs 42
2. La protéine C-Réactive **44**
2.1 Introduction **44**
2.2 Régulation de l'expression **45**
2.3 Structure **48**
2.3.1 La structure affecte la fonction 51
2.4 Concentration circulante de la CRP et inflammation **55**
2.5 Fonctions physiologiques et inflammation **58**
2.6 Réceptorologie de la CRP **63**

2.7 Lien statistique entre la CRP, risque cardiovasculaire et athérosclérose **65**
2.8 Lien causal entre la CRP et l'athérosclérose **72**
2.8.1 La CRP et la plaque athéroscléreuse 72
2.8.2 Interactions avec les cellules et les composants de la paroi artérielle 74
2.8.2.1 Les cellules musculaires lisses 74
2.8.2.2 Les LDL 75
2.8.2.3 Les cellules endothéliales 75
2.8.3 Interactions avec les cellules circulantes et les composants du sang périphérique 78
2.8.3.1 Les monocytes 78
2.8.3.2 Les neutrophiles 80
2.8.3.3 Le complément 81
3. Le monocyte, cellule clé de l'immunité et de l'athérogenèse **82**
3.1 La monocytopoïese **82**
3.2 Propriétés fonctionnelles du monocyte dans l'immunité **82**
3.3 Propriétés fonctionnelles du monocyte dans l'athérogenèse **84**
3.3.1 Rôles des molécules d'adhésion 84
3.3.2 Rôles des chimioattractants 85
3.3.3 Rôles des cytokines secrétées par les monocytes activés 85
3.3.4 Rôle du polymorphisme du gène CD14 86
3.3.5 Interactions monocyte – autres types cellulaires 86
3.4 Régulation de l'activation et désactivation monocytaire **87**
4. Apport du profilage d'expression génique dans l'athérosclérose **90**

MATERIELS ET METHODES **94**
1. Matériel **95**
1.1 Cellules, lignées cellulaires et milieux de culture **95**
1.2 Protéine C-réactive **96**
1.2.1 Purification des contaminants potentiels de la CRP 96
1.2.2 Identification des isoformes de la CRP 97
1.3 Anticorps **97**
1.4 Inhibiteurs de la transduction du signal **98**
2. Méthodes **99**
2.1 Séparation des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) **99**
2.2 Purification des monocytes par tri magnétique **101**
2.3 Mesure de la pureté des monocytes par cytométrie en flux **103**
2.4 Mise en culture des PBMC et traitement avec la CRP **103**
2.5 Mise en culture des monocytes, exposition à la CRP et investigation des voies de transduction du signal **104**
2.6 Mesure de l'expression des gènes par la méthode des puces à oligonucléotides **106**
2.6.1 Conception de la puce à oligonucléotides 106
2.6.2 Préparations des ARN totaux 118
2.6.2.1 Extraction des ARN totaux au Trizol 118
2.6.2.2 Digestion de l'ADN contaminant à la DNase I 118

2.6.2.3 Mesure de la concentration et vérification de l'intégrité des ARN totaux 119
2.6.2.4 Amplification des ARNm en ARN amplifié amino allylé 121
2.6.2.5 Marquage de l'ARNa amino allylé aux fluorophores cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5) 123
2.6.2.6 Fragmentation de l'ARNa amino allylé couplé Cy3 ou Cy5 125
2.6.2.7 Hybridation de l'ARNa amino allylé couplé Cy3 / Cy5 et lavages 125
2.6.3 Lecture de la puce à oligonucléotides, analyse d'images et normalisations 126
2.6.4 Exploitation statistique des données 129
2.7 Mesure de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel 130
2.7.1 Préparation des ARN totaux 130
2.7.2 Transcription inverse des ARN totaux en ADNc 130
2.7.3 PCR quantitative en temps réel 130
2.7.4 Choix des amorces 133
2.7.5 Mise au point de l'efficacité de la PCR et quantification des échantillons 133
2.7.6 Spécificité des produits de la PCR 137
2.8 Immunotransfert des protéines nucléaires et totales par Western blotting 137

RESULTATS ET DISCUSSION 139

ETUDE 1 : Analyse des effets de la Protéine C – Réactive sur la biologie des monocytes dans l'athérosclérose à travers une approche de puces à oligonucléotides et de PCR quantitative en temps réel 140

1. Conditions expérimentales 140
1.1 Effets de la sélection positive CD14+ sur l'activation des monocytes 140
1.2 Interactions entre la CRP et des contaminants potentiels 142
1.3 Analyse des isoformes de la CRPp et de la CRPr 144
1.4 Détermination du temps d'incubation des monocytes avec la CRPp à 12h 146
2. Effets pro et anti-inflammatoires de la CRP sur la biologie du monocyte 148
2.1 Analyse des effets de la CRP sur l'expression globale des gènes *via* les puces à oligonucléotides 148
2.2 Confirmation des modifications d'expression génique mis en évidence par les puces à oligonucléotides à l'aide de la PCR quantitative en temps réel 160
2.3 La CRPp exerce des effets pro-atherogéniques communs sur la biologie du monocyte 164
2.3.1 Cytokines pro-inflammatoires et chimiokines 164
2.3.2 Integrines 166
2.3.3 Inhibiteur de l'activateur du plasminogène, type 2 (PAI-2) et metalloproteinase MMP-1 166

2.4 Effets anti-inflammatoires de la CRPp sur la biologie du monocyte 167
2.4.1 Chimiokines et cytokines anti-inflammatoires 167
2.4.2 alpha-2 macroglobuline (A2M) 169
2.4.3 Adrenomédulline (ADM) 169
2.5 Effets différentiels de la CRP entre les monocytes isolés des femmes et des hommes 170
3. Limites des puces à oligonucléotides 172

ETUDE 2 : Effets de la CRP sur l'expression et l'activation du LXRα chez le monocyte 173

1. Induction de l'expression génique et protéique du LXRα chez les monocytes ex-vivo exposés à la CRP 173
2. Induction de l'expression génique et protéique du LXRα chez les monocytes THP-1 exposés à la CRP 179
3. Exploration des voies de transduction du signal 184
3.1 Voies d'activation des MAP Kinases 184
3.1.1 Activation des voies de transduction via les récepteurs Fcγ 187
3.2 Voie d'activation NF-κB 189
4. Effets athéroprotecteurs de la CRP via l'activation du LXRα chez le monocyte circulant 191

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 198

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 202

PUBLICATIONS 239

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : *Principales causes de décès dans le monde en 2005* 15
Figure 2 : *Structure de la paroi vasculaire normale* 15
Figure 3 : *Dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose* 23
Figure 4 : *Formation de la plaque graisseuse dans l'athérosclérose* 25
Figure 5 : *Formation des lésions avancées de l'athérosclérose* 27
Figure 6 : *Plaques fibreuses instables dans l'athérosclérose* 30
Figure 7 : *Risque relatif de développer une pathologie cardiovasculaire en fonction des biomarqueurs* 41
Figure 8 : *Structure du gène de la CRP* 46
Figure 9 : *Structure moléculaire et morphologie de la CRP humaine* 49
Figure 10 : *Structure de la CRP avec les sites de fixation possibles à FcγRI et C1q* 50
Figure 11 : *Risques relatifs de manifester un premier symptôme de pathologie coronarienne parmi les hommes (A) et les femmes (B) en bonne santé en fonction de leurs concentrations en CRP et de leurs ratios TC/HDL-C* 66
Figure 12 : *Probabilité de survie sans risque de développer une pathologie cardiovasculaire au cours du temps chez les femmes (n=15745) en fonction de leurs taux de CRP et de cholestérol-LDL* 67
Figure 13 *: Risques relatifs de développer une maladie cardiovasculaire ajustés à des multivariables en fonction des taux de CRP et du risque estimé sur 10 ans basés sur le score de risque Framingham* 71
Figure 14 : *Etudes prospectives des taux de CRP comme facteur de risque de développer des maladies vasculaires* 75
Figure 15 : *Les différents niveaux de régulation génomique et protéomique* 91
Figure 16 : *Principe de la séparation des PBMC sur gradient de Ficoll* 100
Figure 17 : *Principe de la purification des monocytes par tri magnétique* 102
Figure 18 : *Profil électrophorètique des ARN totaux des monocytes mis en culture et traités ou non avec la CRP (25 µg/ml) pendant 24 h* 120
Figure 19 : *Profil de la densité des ARN totaux de monocytes mis en culture et non traités avec la CRP* 120
Figure 20 : *Amplification des ARNm et marquage aux fluorophores Cy3 / Cy5* 122

Figure 21 : *Réaction de couplage entre le fluorophore cyanine 5 et le dUTP amino allylé* 124
Figure 22 : *Lecture d'une puce à oligonucléotides par le scanner à micropuce « Affymetrix 428 Array Scanner »* 127
Figure 23 : *Principe d'incorporation du SYBR Green I à l'ADNc double brin* 132
Figure 24 *: Modèle graphique de la PCR quantitative en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles* 136
Figure 25 : *Différence d'expression relative des ARNm d'IL-1α, IL-6 et TNFα entre l'isolement des monocytes (0h) et la mise en culture pendant 20h* 141
Figure 26 : *Isoformes de la CRPp analysées sur gel d'électrophorèse non dénaturant* 145
Figure 27 : *Cinétique représentative des effets de la CRPp sur l'expression des ARNm de cytokines pro ou anti-inflammatoire chez le monocyte humain (n=1) exposé à la CRPp (25µg/mL)* 147
Figure 28 : *Evaluation par PCR quantitative en temps réel des effets pro-inflammatoires de la CRPp sur les monocytes isolés de femmes (n=9) et d'hommes (n=9)* 161
Figure 29 : *Evaluation par PCR quantitative en temps réel des effets anti-inflammatoires de la CRPp sur les monocytes isolés de femmes (n=9) et d'hommes (n=9)* 163
Figure 30 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm du LXRα chez les monocytes humains ex vivo* 174
Figure 31 : *Cinétique représentative de l'expression de l'ARNm du LXRα chez le monocyte humain (n=1) exposé à la CRPp (25µg/ml) pendant 0h, 2h, 6h, 12h et 24h* 175
Figure 32 : *La CRPp augmente l'expression protéique du LXRα chez les monocytes ex vivo* 177
Figure 33 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm de ABCA1 chez les monocytes humains ex vivo* 178
Figure 34 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm de LXRα chez les cellules THP-1* 180
Figure 35 : *La CRPp augmente l'expression protéique du LXRα chez les cellules THP-1* 181
Figure 36 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm de ABCA1 chez les cellules THP-1* 183

Figure 37 : *La CRPp induit l'expression du LXRα via l'activation des voies de transduction du signal ERK et PI3 Kinase* 186
Figure 38 : *Effets des anticorps anti-CD32 (FcγRII) et anti-CD64 ((FcγRI) sur l'expression de l'ARNm du LXRα médiée par la CRPr chez des cellules THP-1* 188
Figure 39 : *La CRPr active la voie NF-κB chez les cellules THP-1* 190
Figure 40 : *Le rôle des gènes cibles des LXRα et β dans l'homéostasie du cholestérol et la lipogenèse* 193

TABLEAUX

Tableau 1 : *Séquence des différentes étapes de la genèse de la plaque athéroscléreuse* 19

Tableau 2 : *Caractéristiques idéales d'un marqueur sérique de risque cardiovasculaire* 41

Tableau 3 : *Comportement de la CRP dans différentes pathologies* 57

Tableau 4 : *Dosages de la CRP en routine clinique* 57

Tableau 5 : *Illustration des 250 gènes présents sur une puce à oligonucléotides* 107

Tableau 6 : *Distribution des 250 gènes sur une puce à oligonucléotides* 117

Tableau 7 : *Paire d'amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel* 134

Tableau 8 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes d'homme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides)* 149

Tableau 9 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes de femmes exposées à la CRPp (puces à oligonucléotides)* 153

Tableau 10 : *Gènes pour lesquels l'expression a augmenté au moins de 50% chez les monocytes de femmes et d'hommes stimulés par la CRPp versus Contrôle (expériences de puces à oligonucélotides)* 158

Tableau 11 : *Gènes pour lesquels l'expression a diminué au moins de 34% chez les monocytes de femmes et d'hommes stimulés par la CRPp versus Contrôle (expériences de puces à oligonucélotides)* 159

INTRODUCTION-OBJECTIFS

Les maladies cardio-vasculaires constituent aujourd'hui la première cause de morbi-mortalité dans les pays développés. Elles sont responsables du tiers des décès en France et sont le plus souvent la conséquence de l'athérosclérose. Cette dernière se caractérise par la formation d'une plaque d'athérome résultant de l'accumulation de lipides, glucides, tissus fibreux…etc. Cette lente métamorphose de l'intima provoque un épaississement local de la paroi qui réduit progressivement la lumière vasculaire (sténose). Une instabilité de la plaque ou sa rupture (thrombose) peut conduire à des accidents vasculaires graves.

Pendant près d'un siècle, la théorie lipidique a largement été mise en avant pour expliquer la pathogenèse de l'athérosclérose. En effet, la majorité des travaux réalisés se limitaient à démontrer la responsabilité des lipoprotéines et plus précisément du cholestérol dans la survenue de l'athérosclérose. Or, de nombreux patients atteints de cette pathologie présentent un bilan lipidique considéré comme normal. Depuis les années 1970, une nouvelle théorie a émergé selon laquelle l'athérosclérose pourrait être considérée comme une maladie inflammatoire chronique des artères. En effet, parmi les paradigmes récents concernant le développement de l'athérosclérose, l'inflammation semble jouer un rôle majeur lors de l'initiation, la progression et les complications aigues (Willerson J.T et Ridker P.M 2004). certaines études suggèrent que les facteurs de risque tels que les lipoprotéines modifiées, la fumée de tabac , l'hyperglycémie, le diabète et l'hypertension artérielle, induisent des lésions encore mal définies reconnues par l'organisme comme des signaux de danger (Matzinger P. 2002) qui activeraient le système immunitaire inné et acquis (Binder C.J *et al*. 2002), entraînant une réponse inflammatoire. Cette hypothèse inflammatoire de l'athérogenèse explique l'intérêt à caractériser de nouveaux marqueurs inflammatoires qui permettent, indépendamment des facteurs de risque classiques (Ridker P.M. 2004), de détecter des patients à haut risque de développer une athérosclérose (Hashimoto H. *et al*. 2001). Ces marqueurs pourraient également être utilisés comme outil de choix dans certaines stratégies thérapeutiques.

L'un de ces marqueurs est la Protéine C – Réactive (CRP), définie en 2003 par les experts comme le biomarqueur de risque cardiovasculaire le plus pertinent d'un point de vue clinique (Pearson T.A. *et al*. 2003) et qui, indépendamment des autres facteurs de risque, peut prédire

l'apparition de l'athérosclérose et ses complications. Des concentrations élevées de CRP (détectée par les mesures ultra sensibles hsCRP) sont corrélées avec l'apparition de l'athérosclérose chez des individus en bonne santé et prédisent les complications aigues de l'athérosclérose (Ridker P.M. 2004).

Bien que de nombreuses études suggèrent un lien causal entre la CRP, l'activation des monocytes et le développement de l'athérosclérose, les mécanismes cellulaires et moléculaires de ces interactions restent incomplètement caractérisés. Notre objectif, dans la première partie de cette thèse, était de mieux comprendre les effets de la CRP sur la biologie du monocyte humain circulant à travers l'analyse d'une partie de son transcriptome grâce à la technologie des puces à oligonucléotides. Puisque le risque de maladies cardiovasculaires est plus élevé chez les hommes par rapport aux femmes et que cette protection diminue après la ménopause où hommes et femmes se rejoignent vis-à-vis de ces risques, nous avons émis l'hypothèse que cette protection pouvait passer par une réponse différente du monocyte à la CRP. Nous avons utilisé une approche que nous appelons génératrice d'hypothèses en étudiant les effets de la CRP sur l'expression génique des monocytes en utilisant une puce à ADN contenant des séquences de cDNA représentatives des gènes exprimés lors de l'activation des monocytes.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons focalisé notre attention sur un récepteur nucléaire dont l'expression génique modifiée a été mis en évidence par l'exploitation des résultats des puces à oligonucléotides : le LXRα. Nous avons alors évalué l'effet de la CRP sur l'expression et l'activation du LXRα et analysé les différentes voies de transduction du signal par lesquelles la CRP pouvait agir. Il est important de souligner le fait que la relation entre CRP et modification de l'expression de l'ARNm codant pour le LXRα a été mise en évidence par l'approche type génératrice d'hypothèses.

SITUATION DU SUJET

1. Athérosclérose et inflammation

1.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est de loin la première cause de mortalité dans les pays développés, et à l'origine de la plupart des maladies cardio-vasculaires. Certains auteurs prévoient d'ailleurs qu'elle pourrait conserver ce palmarès pendant au moins vingt ans.
Pathologie dont la définition est anatomopathologique, elle ne se manifeste qu'au bout de plusieurs années d'évolution infra clinique. Mieux comprendre ses mécanismes, reste donc capital.

La définition de l'AHA (American Heart Association) en 2007 est la suivante :

« L'athérosclérose vient des mots grecs « athero » (pate - colle) et « sclerosis » (dureté). Il s'agit du processus par lequel des substances grasses, cholestérol, produits de dégradation cellulaire, calcium et d'autres composants viennent s'accumuler dans l'intima artériel. Cette accumulation est appelée « plaque ». Elle affecte aussi bien les artères de gros et moyens calibres. Le durcissement des artères apparaît souvent avec l'âge » (http://www.americanheart.org).

1.1.1 Epidémiologie

Les conséquences cliniques de la formation de plaques d'athérome se manifestent à différents niveaux. Elles sont responsables d'affections aiguës ou chroniques (Giral P.1998):
– de cardiopathies ischémiques dues à l'athérosclérose des artères coronaires ;
– d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) dus à l'athérosclérose des artères à visée encéphalique ;
– d'artérites dues, dans 90% des cas (Bouvenot *et al*. 1995), à l'athérosclérose des artères des membres inférieurs
– ou d'ischémies aiguës des membres.

Aussi, l'athérosclérose peut toucher toutes les artères, et entraîner des manifestations ischémiques chroniques (par exemple, l'artérite mésentérique) ou aiguës (infarctus mésentérique).

Parmi les 58 millions de morts estimés dans le monde en 2005, 17.5 millions sont les conséquences directes des maladies cardiovasculaires. Elles représentent 30% de la mortalité totale suivies par le cancer (7.6 millions de morts) et les maladies chroniques respiratoires (4.1 millions) (**Figure 1**) (World Health Organization 2006 2007).

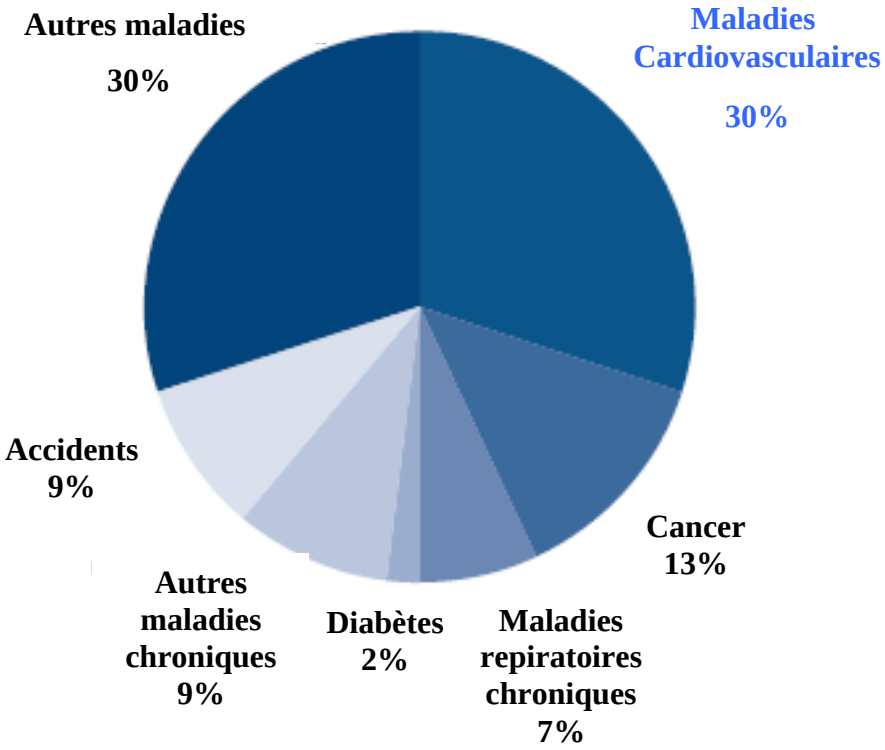


Figure 1 : *Principales causes de décès dans le monde en 2005* (World Health Organization 2006 2007)

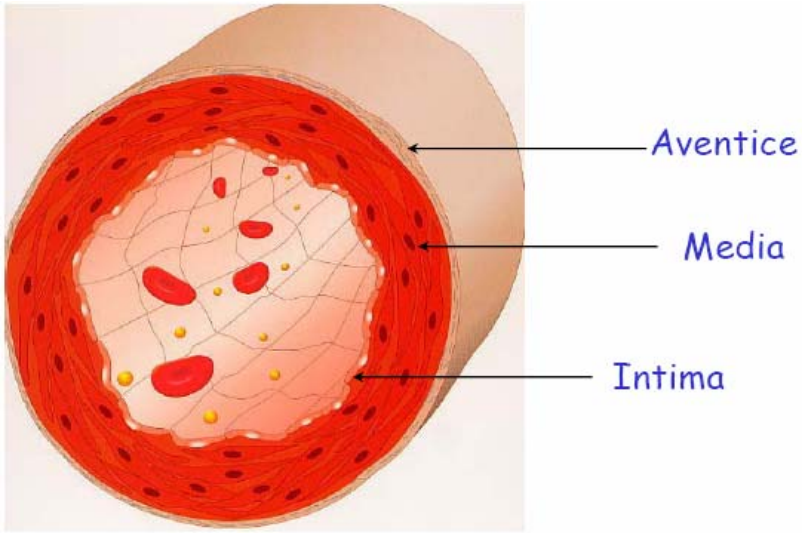


Figure 2 : *Structure de la paroi vasculaire normale*

1.1.2 Structure de la paroi vasculaire normale

Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation (Cohen A. 1997; Luc G.*et al*. 1991). Leur paroi est constituée de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 2**).

1.1.2.1 Intima

C'est la tunique la plus interne et la plus fine ; c'est à ce niveau que se développe l'athérosclérose. Elle est constituée :

– d'une couche unique de *cellules endothéliales*, imbriquées les unes dans les autres et formant une couverture étanche ; cet endothélium possède différentes propriétés :

– des activités métaboliques : synthèse de substances vasoactives (NO, EDRF, PGI2 endothéline), conversion de l'angiotensine ;

– thromborésistance : synthèse de prostaglandine, thrombomoduline, antithrombine, macroglobuline, activateur tissulaire du plasminogène ;

– fonction immunitaire : synthèse d'IL-1.

– d'une couche de *tissu conjonctif* fibro-élastique ;

– d'une lame de fibre élastique constituée d'élastine, la *limitante élastique interne* (absente dans de nombreux vaisseaux).

– parfois, on observe un épaississement de la zone sous-intimale formant un *coussinet intimal*, constitué de cellules musculaires lisses et de macrophages. Ces épaississements sont observés dès la vie foetale ; leur nombre augmente avec l'âge.

La couche sous-endothéliale de *tissu conjonctif* , où se forme la plaque d'athérome, contient des fibres de collagène, quelques fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes qui produisent des protéoglycannes, des glycosaminoglycannes, en particulier des héparane-sulfates, du glycogène, de l'élastine et de la laminine ; elle renferme également un grand nombre de cellules du système immunitaire (Munsch B. *et al.* 1995). Il faut également noter que les héparanne-sulfates sont aussi produits par les cellules endothéliales (Praillet C. *et al*. 1998).

1.1.2.2 Media

C’est la tunique moyenne ; elle est la plus épaisse. C’est le constituant principal de l’artère. Elle est constituée :

- essentiellement de *cellules musculaires lisses*, empilées de façon concentrique en couches appelées *unités lamellaires*. Le nombre de ces couches varie suivant le type d’artère : d’une couche, pour les artérioles, à plusieurs couches, pour les artères élastiques.

Chaque *unité lamellaire* est composée de cellules musculaires lisses entourées d’une matrice extra-cellulaire constituée des protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides.

Hormis dans l’aorte thoracique, la media est avasculaire, sauf dans sa partie externe qui reçoit l’irrigation des *vasa vasorum* de l’adventice.

– une lame d’élastine, la *limitante élastique externe*, sépare la media de l’adventice. Cette limitante n’est toutefois rencontrée que dans les vaisseaux de fort calibre.

1.1.2.3 Adventice

C’est la tunique externe. Elle est constituée :

– d’un *tissu conjonctif* peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes ;

– d’une *enveloppe* qui assure l’ancrage des artères aux structures avoisinantes.

– Elle est irriguée par des *vasa vasorum* qui ont un rôle nourricier pour l’adventice elle-même et pour la partie externe de la media.

– Un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés rejoint les fibres musculaires lisses de la media.

– Elle est aussi parfois parcourue par des fibres musculaires lisses longitudinales.

1.1.3 Caractéristiques de la paroi vasculaire athéroscléreuse

D'après les plus récentes descriptions anatomopathologiques, la plaque d'athérosclérose apparaît comme une lente métamorphose de l'intima artériel.

H.C. STARY (Stary H.C. 1994) a proposé en 1994 une séquence des différentes étapes de la genèse de la plaque, en divisant cette évolution en sept stades (**Tableau 1**) :

– un épaississement fibromusculaire de l'intima, présent dès la vie fœtale, se charge durant l'enfance et l'adolescence, de cellules spumeuses (**stade I**).

– des stries lipidiques, dépôts longitudinaux de couleur jaunâtre, apparaissent (**stade II**).

– le centre de l'athérome se constitue (**stade III**) progressivement par accumulation de lipides dans et hors des cellules : c'est le cœur lipidique ou centre athéromateux, véritable point de départ de la plaque chez le jeune adulte.

– ce cœur lipidique va progressivement se couvrir d'une chape fibreuse ou fibromusculaire, constituée de cellules musculaires lisses de la média, de protéines extracellulaires, collagène, élastine et protéoglycanes, de facteur de croissance qui va entretenir cette formation (**stades IV et V)**.

– le phénomène d'athérogenèse étant installé, il peut se maintenir pendant plusieurs années, jusqu'à ce que la lumière de l'artère soit diminuée de 50%, voire davantage (**stade VI**). A ce stade, le sang artériel peut pénétrer dans l'athérome et en augmenter brutalement le volume.

– la plaque athéromateuse peut se calcifier la rendant alors plus ou moins rigide (**stade VII**).

TYPE LÉSIONNEL	TERME PROPOSÉ	DESCRIPTION
I	Macrophages spumeux isolés	Macrophages spumeux isolés dans l'intima. Absence de lipides extracellulaires.
II	Strie lipidique	Couches de macrophages spumeux. Cellules musculaires lisses dans l'intima chargées de lipides. Fines particules lipidiques extracellulaires disséminées.
III	Préathérome	Modifications de type II associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires formant de petits agrégats.
IV	Athérome	Modifications de type Il associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires massifs et confluents (noyau lipidique).
V	Plaque athéroscléreuse	Modifications de type IV associées à des dépôts massifs de collagène (chape fibreuse) recouvrant le noyau lipidique (type Va), avec calcifications (type Vb).
VI	Plaque athéroscléreuse compliquée	Modifications de type V avec rupture de la chape fibreuse (VIa), hémorragie intraplaque (VIb) ou thrombose (VIc).
VII	Plaque fibreuse	Épaississement massif de l'intima par sclérose collagène ; lipides intra- et extracellulaires absents ou présents en quantité négligeable

Tableau 1 : *Séquence des différentes étapes de la genèse de la plaque athéroscléreuse*

1.2 Athérosclérose : de la théorie lipidique à l'inflammation

L'athérosclérose, longtemps associée à un désordre lipidique en raison des concentrations plasmatiques élevées du cholestérol (Ross R. 1999), en particulier le LDL-cholestérol (lipoprotéines de faible densité), a été définie comme l'accumulation de lipides à l'intérieur de la paroi artérielle. En réalité, le processus athérogénique est bien plus complexe. En effet, malgré notre changement de style de vie et l'utilisation de nouvelles approches pharmacologiques pour réduire une concentration plasmatique en cholestérol trop élevée (Shepherd J. *et al*. 1995), les maladies cardiovasculaires continuent à être la première cause de morbi-mortalité dans le monde (Rosamond W. *et al*. 2007). En fait, les lésions atherogéniques sont la conséquence de réponses moléculaires et cellulaires spécifiques qui peuvent s'inscrire dans un contexte inflammatoire (Ross R. 1993), et qui apparaissent principalement au niveau des artères musculaires et élastiques de taille moyenne et large et peuvent induire, entre autre, une ischémie cardiaque ou cérébrale conduisant alors à l'infarctus.

Le type de lésion le plus précoce, appelé aussi « Fatty streak », est une lésion purement inflammatoire constituée seulement de macrophages dérivés de monocytes et de lymphocytes T (Stary H.C. 1994). Elle est retrouvée communément chez les nouveaux nés ainsi que chez les jeunes enfants (Napoli C. *et al*. 1997). Quant aux sujets atteints d'hypercholestérolémie, l'influx de ces cellules est précédé par le dépôt extracellulaire de lipides membranaires et amorphes (Napoli C. *et al* 1997; Simionescu N. *et al*. 1986).

1.2.1 Facteurs inducteurs de l'inflammation et de l'athérogenèse

Les nombreuses observations physiopathologiques cliniques et précliniques ont conduit à définir le « *dysfonctionnement endothélial* » comme la première étape de l'athérosclérose (Davignon J. and Ganz P. 2004). Chaque lésion caractéristique de l'athérosclérose représente un stade différent dans le processus inflammatoire chronique artériel. Si ce dernier devient excessif, la lésion devient alors avancée et complexe. De nombreuses causes peuvent expliquer le stress endothélial conduisant alors à l'athérosclérose telles que les LDL élevés et modifiés, l'obésité, les radicaux libres créés par la fumée de cigarette, l'hypertension, le diabète, les altérations génétiques, les concentrations d'homocystéine plasmatique élevées mais aussi l'infection par des microorganismes tels que les herpes virus ou *Chlamydia pneumoniae*.

L'endothélium des vaisseaux sanguins se sert du NO pour déclencher le relâchement de sa tunique de muscle lisse, provoquant ainsi une vasodilatation et un accroissement du débit sanguin et une diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines (thrombocytes). Ce mécanisme est indispensable à la préservation de l'endothélium. Si cette synthèse de NO se révèle insuffisante, le risque de présenter une maladie cardio-vasculaire augmente (Giannotti G. and Landmesser U. 2007).

Cette dysfonction endothéliale, résultante de différentes agressions, entraîne des réponses compensatoires qui altèrent les propriétés homéostatiques de l'endothélium. Sa perméabilité augmente et l'adhérence vis-à-vis des leucocytes et plaquettes s'accroît, avec en parallèle, le développement des propriétés pro coagulantes et la synthèse des molécules vaso-active, cytokines et facteurs de croissance. Si la réponse inflammatoire ne neutralise pas ou n'élimine pas les agents générateurs de ce stress, ce processus peut continuer indéfiniment. Alors, la réponse inflammatoire stimule la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses qui forment alors une lésion intermédiaire au niveau de la région inflammatoire, et si ces réponses persistent, cela peut entraîner un épaississement de la paroi artérielle compensée par un remodelage (Glagov S. *et al*. 1987) afin que la lumière du vaisseau ne soit pas altérée. Quant aux cellules inflammatoires, les granulocytes sont rarement présents pendant l'athérogenèse (Virmani R. *et al*. 2000). En effet, la réponse inflammatoire est médiée principalement par les macrophages dérivés du monocyte et les lymphocytes T à chaque étape de la maladie (Jonasson L. *et al*. 1986; van der Wal A.C. *et al*. 1989). L'inflammation continue résulte en une augmentation du nombre de macrophages et de lymphocytes qui migrent du sang vers la lésion athérogénique. L'activation de ces cellules mène au relarguage d'enzymes hydrolytiques, de cytokines, de chemokines et de facteurs de croissance (Raines E.W. and Ross R. 1996; Yasuda O. *et al*. 2001) pouvant induire des dommages supplémentaires et éventuellement conduire à la nécrose (Falk E. *et al*. 1995). L'accumulation cyclique des cellules mononucléaires, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses et la formation de tissus fibreux mènent à un agrandissement et à une restructuration de la lésion. Cette dernière, complexe et avancée, se retrouve couverte d'une chape fibreuse qui protège un core lipidique et un tissu nécrotique. Faute de pouvoir compenser éternellement par une dilatation, la lésion athérogénique peut alors envahir la lumière artérielle et altérer le flux sanguin.

1.2.2 La nature de la réponse inflammatoire

1.2.2.1 Interactions entre les cellules endothéliales, les monocytes et les lymphocytes T

Les sites artériels de morphologies spécifiques, tels que les branches, les bifurcations et les courbes entraînent des altérations du flux sanguin comme un cisaillement endothélial et une turbulence accrue (Danesh J., Collins R. *et al.* 1997). L'endothélium surexprime alors des molécules spécifiques responsables de l'adhérence, la migration et l'accumulation de monocytes et de lymphocytes T. Ces molécules d'adhésion qui agissent comme des récepteurs pour les glycoconjugués et les intégrines présentes sur les monocytes et les lymphocytes T, incluent plusieurs sélectines, des molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) et des molécules d'adhésions des cellules vasculaires (VCAM) (Springer T.A. 1994). Les molécules associées à la migration des leucocytes à travers l'endothélium telles que les molécules d'adhésion « cellules endothéliales-plaquettes » (PECAM) (Muller W.A. *et al*. 1993) agissent en conjonction avec des molécules chémotactiques générées par l'endothélium, les cellules musculaires lisses et les monocytes. On retrouve parmi ces molécules MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), l'ostéopontine (Giachelli C.M. *et al*. 1998) ainsi que les LDL modifiées capables d'attirer les monocytes et les cellules T au niveau de la paroi artérielle (Rajavashisth T.B. *et al*. 1990) **(Figure 3)**.

La nature du flux sanguin au niveau des sites vasculaires apparaît essentielle dans le développement des lésions. En effet, les changements de flux altèrent l'expression des gènes qui possèdent des éléments de réponse aux contraintes de cisaillement. Par exemple, les gènes codant pour ICAM-1 (Nagel T. *et al*. 1994), la chaîne β de PDGF (Resnick N. *et al.* 1993) et le facteur tissulaire (Lin M.C. et al. 1997) dans les cellules endothéliales, sont pourvus de ces éléments de réponse et leur expression est augmentée par les contraintes de cisaillement (Mondy J.S. *et al.* 1997). En outre, les altérations du flux sanguin semblent être critiques dans la détermination des sites artériels susceptibles de développer des lésions (Nakashima Y. *et al*. 1998). En effet, le roulement et l'adhérence des monocytes et des cellules T sont prédominants au niveau de ces sites, résultat de la surexpression des molécules d'adhésion à la fois dans les cellules endothéliales et les leucocytes.

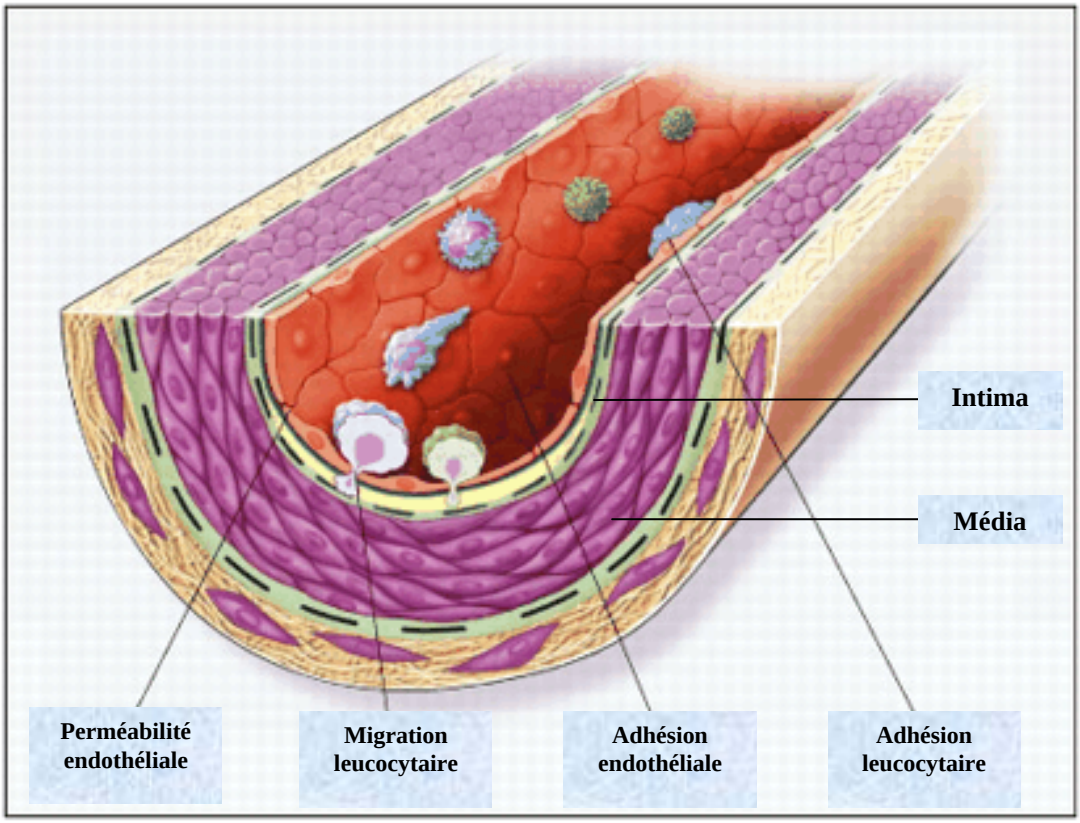


Figure 3 : *Dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose*

Les changements les plus précoces qui précèdent la formation des lésions athérogéniques prennent place dans l'endothélium. Ces changements incluent une augmentation de la perméabilité endothéliale aux lipoprotéines et autres constituants plasmatiques médiée par l'oxyde nitrique, la prostacycline, le PDGF, l'angiotensine II et l'endothéline, ainsi que la surexpression membranaire des molécules d'adhésion leucocytaires telles que la L-sélectine, les intégrines et PECAM-1. D'autres modifications apparaissent telles que la surexpression des molécules d'adhésion endothéliale E-sélectine, P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1. Enfin, la migration des leucocytes vers la paroi artérielle est médiée par les LDL oxydées, MCP-1, IL-8, PDGF, MCSF et l'ostéopontine (Ross R. 1999).

Les chémokines sont aussi responsables de la chimiotaxie et de l'accumulation des macrophages dans les plaques précoces (Boring L. *et al*. 1997; Boring L. *et al*. 1998; Boisvert W.A. *et al*. 1998) (**Figure 4**). L'activation des monocytes et des cellules T mène à la sur expression de récepteurs à leur surface, tels que les molécules « mucin-like » qui fixent les sélectines, les intégrines qui se fixent aux molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines et des récepteurs qui interagissent avec des molécules chimiotactiques (Springer T.A. 1994). Ces interactions « Récepteurs – Ligands » activent alors les cellules mononucléaires, induisent la prolifération cellulaire et participent au développement des réponses inflammatoires au niveau des sites lésés.

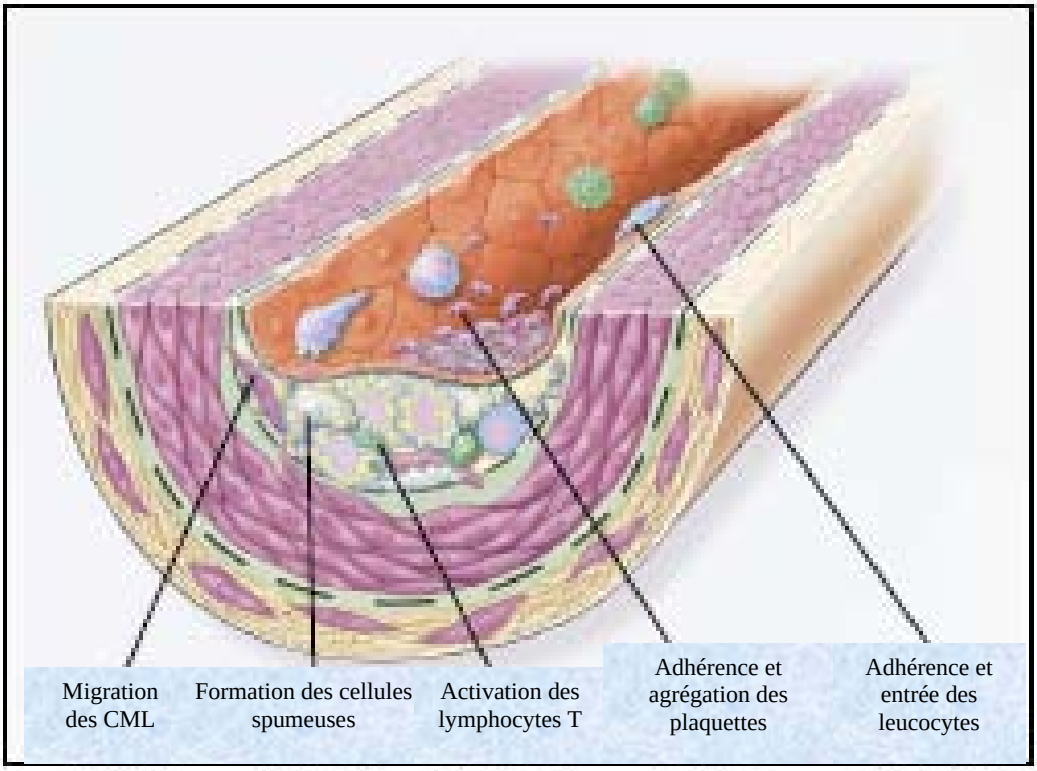


Figure 4 : *Formation de la plaque graisseuse dans l'athérosclérose*

Les plaques graisseuses initiales sont constituées de monocytes chargés en lipides, de macrophages (cellules spumeuses), de lymphocytes T et plus tard par des cellules musculaires lisses (CML). Les étapes impliquées dans ce processus sont : i) la migration des CML stimulée par PDGF, FGF-2 et TGF-β ; ii) l'activation des cellules T médiée par le TNFα, IL-2 et GMCSF ; iii) la formation de cellules spumeuses médiée par les LDL oxydées, le MCSF, le TNFα et IL-1 ; iv) l'adhérence et l'agrégation des plaquettes stimulées par les intégrines, la sélectine P, la fibrine, le facteur tissulaire, le thromboxane A_2 et les facteurs décrits dans la figure 3 comme responsable de l'adhésion et de la migration des leucocytes (Ross R. 1999).

Les souris modifiées génétiquement pour le gène Apolipoprotéine E (Apo E -/-), soumises à un régime riche en graisses, développent une hypercholestérolémie (Nakashima Y. *et al* 1998). L'expression d'ICAM-1 est constitutivement augmentée au niveau des sites susceptibles d'être lésés. En fait, ICAM-1 est présent à la surface endothéliale chez les souris sauvages mais augmente chez les souris ApoE -/-. En revanche, VCAM-1 est absent chez les souris sauvages mais elle est présente au niveau des mêmes sites artériels chez les souris déficientes en ApoE (Nakashima Y. *et al* 1998). Alors, l'adhésion des monocytes et des cellules T peut apparaître après augmentation d'une ou plusieurs molécules d'adhésion agissant de concert avec les molécules chimiotactiques telles que MCP-1, IL-8 ou les LDL modifiées. Les souris déficientes en ICAM-1, P-sélectine, CD18 ou les 3 à la fois, et soumises à un régime alimentaire riche en lipides, développent seulement de petites lésions athérogéniques, au contraire des souris sauvages (Hynes R.O. and Wagner D.D. 1997). La comparaison des rôles relatifs de ces molécules dans l'inflammation artérielle et microvasculaire peut fournir des indices pour mieux cibler et modifier le processus inflammatoire et alors réprimer l'athérosclérose.

1.2.2.2 Monocytes et immunité

Le monocyte, précurseur du macrophage dans tous les tissus, est acteur à chaque phase de l'athérogenèse. Les macrophages dérivés du monocyte sont des cellules présentatrices d'antigène (CPAg) qui secrètent des cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, metalloprotéases et autres enzymes hydrolytiques. L'invasion continue, la survie et la prolifération des cellules mononuclaires au niveau des lésions, dépendent en partie de facteurs tels que le MCSF et le MGCSF (pour les monocytes) et IL-2 (pour les lymphocytes). L'exposition continue au MCSF permet au macrophage de survivre *in vitro* et de se multiplier au sein des lésions. En revanche, les cytokines inflammatoires telles que l'IFNγ (interféron γ) activent les macrophages et sous certaines conditions stimulent l'apoptose. Si cela apparaît *in vivo*, les macrophages forment des cores nécrotiques caractéristiques des lésions avancées et complexes (**Figure 5**).

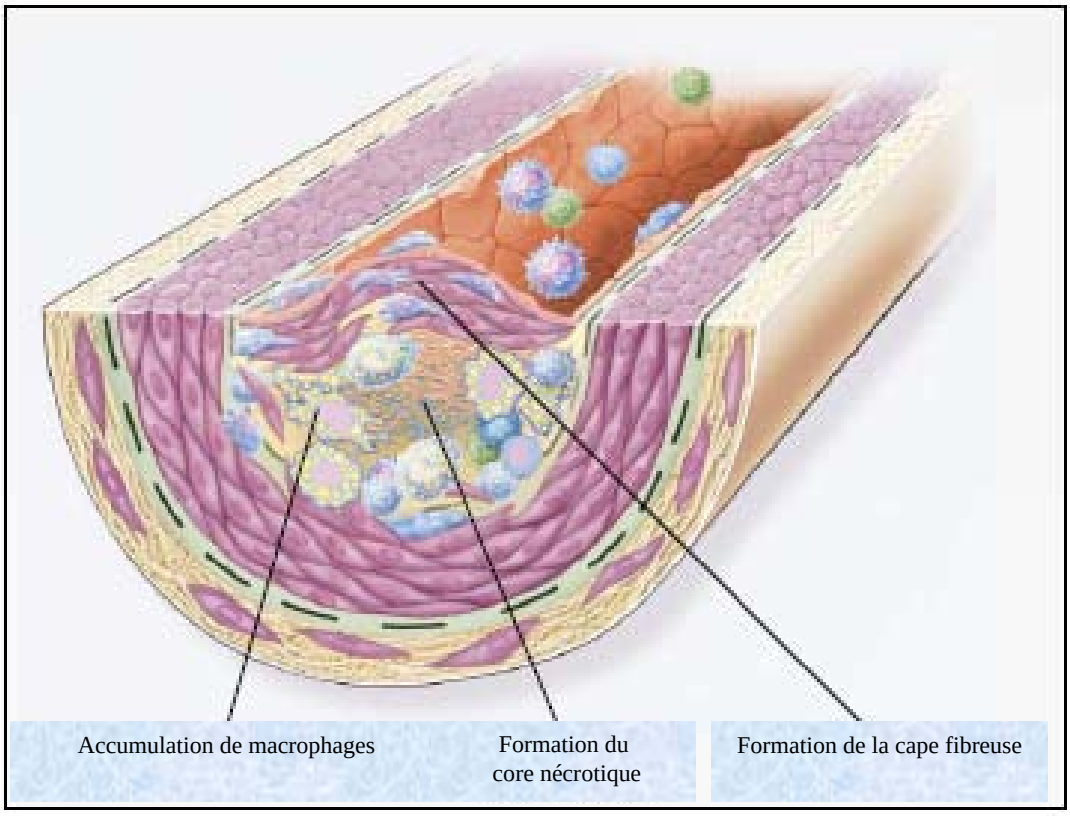


Figure 5 : *Formation des lésions avancées de l'athérosclérose*

Lorsque les plaques graisseuses progressent pour devenir plus complexes, elles tendent à former une chape fibreuse qui recouvre la lésion de la lumière. Cela représente un type de cicatrisation fibreuse en réponse au traumatisme. La chape fibreuse recouvre un mélange de leucocytes, lipides et débris, qui peuvent former un core nécrotique. Ces lésions s'étendent par l'intermédiaire de l'adhésion et pénétration leucocytaire continue, toujours causées par les mêmes facteurs que ceux listés en figures 3 et 4. Les facteurs principaux associés à l'accumulation de macrophages incluent le MCSF, MCP-1 et les LDL oxydées. Le core nécrotique est le résultat de l'apoptose et nécrose, de l'activité protéolytique augmentée et de l'accumulation de lipides (Ross R.1999).

Initialement, seules les cellules musculaires lisses semblaient capables de proliférer pendant l'expansion des lésions athérogéniques, mais la réplication des macrophages dérivés du monocyte et des cellules T, est probablement aussi importante (Rosenfeld M.E. and Ross R. 1990). La capacité des macrophages à produire des cytokines (TNF-α, IL-1 et TGF-β), des enzymes protéolytiques (en particulier des métalloprotéases) et des facteurs de croissance (PDGF et IGF I) peut-être essentielle dans le rôle de ces cellules à promouvoir à la fois des dommages et des réparations qui accompagnent la progression de la lésion (**Figure 4**).

Les macrophages activés expriment les antigènes d'histocompatibilité de classe II tels que HLA-DR qui leur permettent de présenter les antigènes aux lymphocytes T. C'est pourquoi, il n'est pas surprenant que les réponses immunes médiées par les cellules puissent être impliquées dans l'athérogenèse puisqu'à la fois les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont présents dans les lésions à toutes les étapes (Hansson G.K. *et al*. 2002). Les cellules T sont activées quand elles se fixent à l'antigène présenté par les macrophages. Cette activation se traduit par la sécrétion de cytokines dont l'INF γ et les TNF α et β qui amplifient ainsi la réponse inflammatoire. Les cellules musculaires lisses au niveau des lésions présentent également des molécules HLA de classe II à leur surface, supposées être induites par l'INF γ et peuvent aussi présenter des antigènes aux cellules T. L'un des antigènes possible peut-être les LDL oxydées (Stemme S. *et al*. 1995) produits par les macrophages (Folcik V.A. *et al*. 1997).

Certaines protéines à savoir HSP-60, peuvent aussi contribuer à l'auto-immunité, du fait de leurs nombreuses fonctions dont l'assemblage, le transport intracellulaire et la prévention de la dénaturation protéique. Ces protéines peuvent être hautement exprimées dans les cellules endothéliales et participer aux réponses immunes (Wick G *et al*. .1997).

Enfin, une molécule immuno-régulatrice, la CD40 ligand (CD40-L) (Hollenbaugh D. et al. 1995) ainsi que son récepteur le CD40, peuvent être exprimés, *in-vivo*, par les macrophages, les cellules T, l'endothélium et les cellules musculaires lisses dans les lésions athérogéniques. L'activation du système immunitaire semble être lié à la surexpression de CD40-L et CD40 (Mach F. *et al*. 1997; Schonbeck U. *et al*. 1997b). D'autre part, le CD40-L induit la sécrétion de IL-1 β par les cellules vasculaires amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (Schonbeck U.

et al. 1997a), alors que l'inhibition de CD40 par des anticorps bloquants réduit la formation des lésions chez des souris ApoE -/- (Mach F. *et al*. 1998).

1.2.2.3 Les plaquettes

En l'absence de dommages, les plaquettes sont essentielles dans le maintien de l'intégrité vasculaire et la protection contre l'hémorragie spontanée via la réparation de l'endothélium. Elles jouent également un rôle dans le développement de syndromes coronariens aigus, dans l'apparition de dommages cérébrovasculaires et dans la formation et l'extension de plaques athéroscléreuses. En effet, les plaquettes activées peuvent s'accumuler sur les parois artérielles et recruter des plaquettes additionnelles au sein du thrombus en expansion. L'adhésion plaquettaire et la thrombose sont ubiquitaires lors de l'initiation et la génération des lésions de l'athérosclérose chez les animaux et humains (Ross R. 1993) (**Figure 4**).

Les plaquettes qui adhérent à la paroi des vaisseaux dont l'endothélium est endommagé, contribuent au développement des lésions athéroscléreuses chroniques (Davi G. and Patrono C. 2007). Ces plaquettes activées relarguent leurs granules qui contiennent des cytokines et des facteurs de croissance, qui ensemble avec la thrombine, contribuent à la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses et des monocytes (Gawaz M. *et al*. 2005). En outre, l'activation des plaquettes mène à la formation d'acide arachidonique libre qui peut être transformé en thromboxane A_2, l'un des plus puissants vasoconstricteurs et agrégants plaquettaires connus, ou bien en leucotriènes capables d'amplifier la réponse inflammatoire.

La rupture de la plaque d'athérome et la thrombose sont des complications des lésions avancées qui mènent à des syndromes coronariens instables ou à l'infarctus du myocarde (Davies M.J. 1990) (**Figure 6**).

L'un des composants essentiels des plaquettes est le récepteur aux glycoprotéines IIb/IIIa qui appartient à la superfamille des intégrines des récepteurs des molécules d'adhésion et apparaît à la surface des plaquettes pendant l'activation plaquettaire et la formation du thrombus. Ces récepteurs ont une fonction homéostatique essentielle et leurs antagonistes empêchent la formation de thrombus chez les patients qui ont eu un infarctus du myocarde (Badimon J.J. *et al*. 1997).

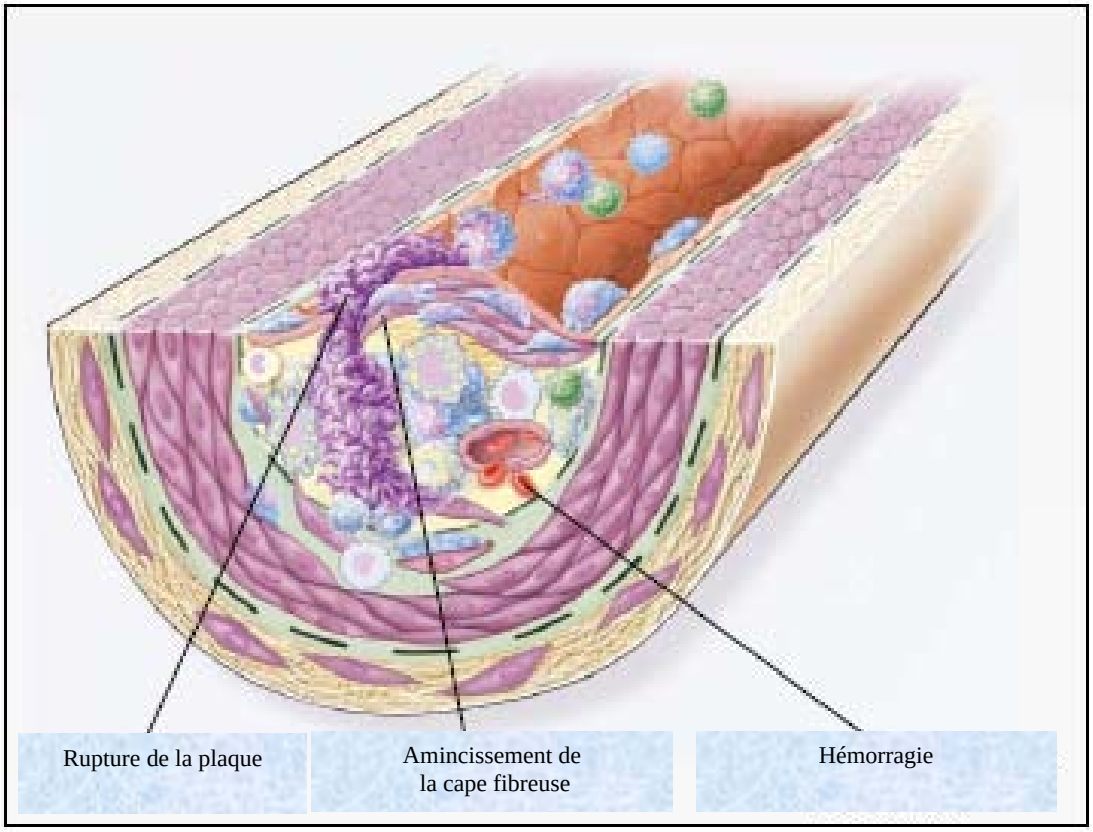


Figure 6 : *Plaques fibreuses instables dans l'athérosclérose*

La rupture de la chape fibreuse peut rapidement mener à la thrombose. Elle apparaît habituellement à des sites où la chape fibreuse qui recouvre la lésion avancée est plus fine. La raison de cet amincissement de la chape fibreuse est due à l'influx continu et à l'activation des macrophages qui sécrètent des metalloprotéases (MMPs) et d'autres enzymes protéolytiques au niveau de ces sites. Ces enzymes causent la dégradation de la matrice qui peut conduire à l'hémorragie depuis les vaso vasorum ou la lumière de l'artère. Cela résulte alors en la formation d'un thrombus et par conséquent à l'occlusion de l'artère (Ross R. 1999).

1.2.3 Vulnérabilité de la plaque

1.2.3.1 Définition

Le terme de « plaque vulnérable » désigne la plaque athéroscléreuse présentant un risque élevé de thrombose (Waxman S. *et al*. 2006). Les études d'autopsie suggèrent qu'il existe plusieurs types histologiques de plaque vulnérable. Si les caractéristiques systémiques de la maladie sont dominantes, les efforts pour détecter et traiter les plaques vulnérables sont probablement peu efficaces. Même si peu de plaques vulnérables se développaient, elles pourraient apparaître rapidement, certainement en réponse à un stimulus inflammatoire systémique, et rendrait probablement inutile toute tentative de traitement local.

La présence de plaques dans de nombreux sites artériels, l'implication inflammatoire diffuse observée dans l'arbre coronarien et la présence d'au moins une plaque thrombosée chez la plupart des patients atteints de syndromes coronariens aigus confirment la nature systémique de la maladie (Goldstein J.A. *et al*. 2000). Cependant, il est prouvé que les lésions menant aux manifestations cliniques sont focales. Les cardiologues trouvent généralement qu'une seule localisation est responsable de manifestations coronariennes aigues.

1.2.3.2 Pathophysiologie de la formation de la plaque vulnérable

Des progrès considérables dans l'identification des processus cellulaires et moléculaires conduisant à l'athérosclérose et à ses conséquences cliniques, ont été réalisés ces dernières années (Daugherty A. *et al*. 2005; Libby, Ridker *et al.* 2002). Même si le LDL cholestérol joue un rôle central dans le développement de la maladie, il est clairement établi que c'est l'inflammation qui initie les lésions et est probablement responsable de l'activation de la maladie (Duff G.W. *et al*. 2006; Hansson G.K. 2005).

Des souris déficientes en ApoE et qui développent des plaques d'athérome de type avancées similaires à celles de patients ont permis de mieux comprendre les observations cliniques. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine diminuent le risque de survenue d''infarctus du myocarde (IDM) chez les patients mais leurs mécanismes d'actions ne sont pas clarifiés. Chez les souris ApoE -/-, les concentrations d'angiotensine II sont associés à un risque accru de survenue de plaques vulnérables (Mazzolai L. *et al.* 2004). Une augmentation

du nombre de lymphocytes T-helper de type-1 (Th1) favorise également l'appariation de ce type de plaques, ce qui indique un rôle possible des lymphocytes Th1 dans leur formation.

Les souris ApoE-/- ont également été utilisées pour étudier le mécanisme de recrutement des leucocytes à l'intérieur des plaques fibroathéromateuses (Eriksson E.E. 2004). A la fois les protéines PF4 et RANTES jouent un rôle dans le recrutement leucocytaire et le blocage de RANTES mène à une diminution des lésions d'athérosclérose.

L'apoptose, caractéristique prédominante des plaques vulnérables qui entraîne la mort soudaine d'origine coronarienne chez les patients a été étudiée chez ses souris (Kolodgie F.D. *et al.* 2000). Les souris ApoE-/- transfectées avec le ligand Fas, qui induit l'apoptose, ont montré plus de signes de vulnérabilité de la plaque (rupture de la plaque, hémorragie intraplaque, dépôt de fer…) que les souris non transfectées (Zadelaar A.S. *et al.* 2005). Il y avait 3 fois plus d'apoptose au niveau des enveloppes recouvrant les plaques chez les souris transfectées. Les études de Michowitz ont rapporté que l'expression du ligand TRAIL (Tumor necrosis factor – related apoptosis-inducing ligand) était augmentée dans les plaques avec core nécrotique à la fois chez les animaux et l'espèce humaine. Le ligand est colocalisé avec des LDL oxydées, suggérant un mécanisme par lequel l'infiltration des LDL pourrait augmenter la mort cellulaire et par conséquent mener à la formation de cores nécrotiques (Michowitz Y. *et al.* 2005).

Les metalloprotéases (MMP) peuvent dégrader les constituants de la plaque d'athérome. Leur taux de glycosylation est étroitement lié à leur degré d'activation. L'augmentation de l'activité des MMP8 et MMP9 est associée à un phénotype de plaque inflammatoire (Sluijter J.P. *et al*. 2006). La glycosylation des MMP peut donc jouer un rôle dans la rupture de la plaque.

Les forces vasculaires et hémodynamiques jouent également un rôle dans la formation et la rupture de plaques athéroscléreuses vulnérables. Plusieurs équipes ont démontré que les régions artérielles soumises à de faibles forces de « cisaillement » étaient prédisposées à la formation de plaques avancées, grâce aux conditions créées qui favorisent la transmigration des lipides et des cellules inflammatoires à l'intérieur de la paroi artérielle. A contrario, des forces de cisaillement plus intenses peuvent provoquer la rupture de la plaque et l'agrégation plaquettaire, conduisant alors à la thrombose (Stone P.H *et al*. 2003; Slager C.J. *et al*. 2005).

Il a été rapporté que dans les plaques aortiques humaines, la densité des microvaisseaux est augmentée dans les lésions avec inflammation, hémorragie intraplaque et plaques vulnérables, suggérant que la néovascularisation contribue à la formation et la rupture de la plaque (Moreno P.R. *et al*. 2004).

1.3 Les cibles de l'inflammation

1.3.1 Lipoprotéines oxydées

Pendant plus d'un siècle, on a considéré que les lipides étaient la cause *sine qua non* du développement de l'athérosclérose. Lors de ces 20 dernières années, un modèle plausible reliant lipides et inflammation comme facteurs de l'athérosclérose a émergé. Selon l'hypothèse de l'oxydation, les LDL retenues dans l'intima, par la fixation aux protéoglycanes, subissent des modifications oxydatives (Williams K.J. and Rodrigueza W.V. 1998; Berliner J. *et al.* 1997). Ainsi, les hydroperoxydes lipidiques, les lysophospholipides, les composés carbonylés sont localisés dans la fraction lipidique de l'athérome(Witztum J.L. and Berliner J.A 1998). Ces lipides modifiés peuvent induire l'expression de molécules d'adhésion, chimiokines, cytokines pro-inflammatoires et autres médiateurs de l'inflammation au niveau des macrophages et des cellules de la paroi vasculaire. La partie « apoprotéine » des particules lipoprotéiniques peut subir des modifications dans la paroi artérielle, rendant alors celles-ci antigéniques. Les particules sont alors capable de stimuler les cellules T activant, par conséquent, la réponse immunitaire (Stemme S.*et al* 1995).

Bien qu'attractive, et argumentée par un nombre important d'expériences, l'hypothèse d'un lien étroit entre les LDL oxydées et l'athérosclérose continue encore à être approfondie. En effet, l'analyse chimique des différents types de lipides modifiés et de protéines extraites à partir d'athérome humain ne correspondent pas forcément aux composants dérivés de lipoprotéines oxydées in vitro qui ont fourni la plupart des preuves reliant lipoprotéines oxydées et inflammation.

1.3.2 Dyslipidémie

D'autres particules lipoprotéiques tels que les VLDL (lipoprotéines riches en triglycérides), les remnants de VLDL (VLDLR), les IDL et la lipoprotéine Lp(a) ont un potentiel athérogène. Ces particules peuvent subir les mêmes modifications oxydatives que les LDL. De plus, certaines expériences suggèrent que les VLDL beta peuvent elles-mêmes activer les fonctions inflammatoires des cellules endothéliales vasculaires (Dichtl W. *et al.* 1999; Mackness M.I. *et al*. 1998).

1.3.3 Hypertension

L'hypertension est l'un des facteurs de risque principal de l'athérosclérose. Tout comme pour l'athérosclérose, l'inflammation peut contribuer à la physiopathologie de l'hypertension fournissant alors le lien physiopathologique entre ces deux maladies. L'angiotensine II (Ang II), en plus de ces propriétés vasoconstrictrices, peut conduire à l'inflammation de l'intima. Par exemple, Ang II induit la production de l'anion superoxyde depuis les cellules endothéliales artérielles et les cellules musculaires lisses (Griendling K.K. *et al.* 1997). Ang II peut également augmenter l'expression chez les CML des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et MCP-1 ainsi que de la molécule d'adhésion VCAM-1 sur les cellules endothéliales.

1.3.4 Diabète

Le diabète est un autre facteur de risque de l'athérosclérose, tout aussi important. La glucotoxicité, qui dépend de l'évolution du métabolisme glucidique à partir des voies glycolytiques, peut conduire à la formation de produits glucidiques via les voies de synthèse du sorbitol, de l'hexosamine, et des produits AGE (produits de glycation avancés). Ces voies augmentent le stress oxydatif et/ou bloquent l'action de l'insuline. D'autre part, un défaut génétique du récepteur à l'insuline (g972R insulin receptor substrate 1 variant) peut conduire à la dysfonction endothéliale. De plus, même en l'absence de résistance à l'insuline, l'hyperglycémie active la voie de synthèse de l'hexosamine chez les cellules endothéliales, ce qui affecte la production de NO, augmente la production et l'activité des MMP-2 et MMP-9 et active l'endothélium entraînant alors sa dysfonction (Federici M. and Lauro R. 2005). L'hyperglycémie associée au diabète peut mener à la modification de macromolécules par

l'ajout de produits de glycation avancés (AGE) (Schmidt A.M. *et al.* 1999). En se fixant sur des récepteurs de surface tels que RAGE (récepteur AGE), ces protéines modifiées peuvent augmenter la production de cytokines proinflammatoires et activer d'autres voies inflammatoires au niveau des cellules endothéliales vasculaires.

1.3.5 Obésité

L'obésité prédispose non seulement à la résistance à l'insuline et donc au diabète, mais contribue aussi à la dyslipidémie athérogénique. En effet, des concentrations élevées d'acides gras libres provenant de la graisse viscérale enrichissent le foie et stimule la synthèse des VLDL par les hépatocytes. L'élévation des VLDL peut diminuer le taux de cholestérol-HDL en augmentant les échanges de HDL vers les VLDL par la protéine de transfert cholesteryl esterase. Le tissu adipeux peut alors synthétiser des cytokines tels que TNFα et IL-6 (Yudkin J.S. *et al.* 1999). De cette façon, l'obésité elle-même induit l'inflammation et potentialise l'athérogenèse. Les études épidémiologiques de See et al. (See R. *et al.* 2007) axées sur l'association des différentes mesures de surpoids et d'obésité avec l'athérosclérose confirment que l'obésité contribue à la mortalité cardiovasculaire via le développement de l'athérosclérose.

1.3.6 Infection

Les agents infectieux fournissent également un stimulus inflammatoire qui accentue l'athérogenèse (Libby P. *et al.* 1997; Danesh J. *et al* 1997). Les infections aigues peuvent altérer l'hémodynamique, la coagulation et les systèmes fibrinolytiques précipitant alors les évènements ischémiques. Les infections extravasculaires chroniques (gingivite, prostatite, bronchite…) peuvent augmenter la production extravasculaire de cytokines inflammatoires et par conséquent accélérer l'évolution de lésions athérosclérreuses. La plupart des plaques d'athérome humaines montrent des signes d'infection d'agents microbiens tels que *Chlamydia pneumoniae*. Cette bactérie, présente dans la plaque artérielle, peut relarguer du lipopolysaccharide (LPS) qui est une endotoxine et des protéines « heat shock » qui peuvent stimuler la production de médiateurs pro-inflammatoires chez les cellules endothéliales vasculaires, les CML et les leucocytes infiltrés dans la paroi (Kol A. *et al*. 1999).

D’autre part, des pathologies inflammatoires chroniques comme le lupus érythémateux ou la polyarthrite rhumatoïdes sont associées à un risque accru d’athérome et de ses complications (Dessein P.H. *et al*. 2004; Asanuma Y. *et al*. 2003).

Récemment, la concentration d’anticorps anti – HSP a été reliée à la prévalence de certaines pathologies, telles qu’une maladie artérielle coronarienne ou un infarctus cérébral, résultats du développement de l’athérosclérose. En effet, les lymphocytes T anti – HSP en circulation peuvent augmenter le risque d’athérosclérose. L’infection par Helicobacter pylori chez des souris ApoE +/- LDLr +/- induit l’athérosclérose et les réponses immunes dominantes des lymphocytes Th1 anti – Helicobacter pylori HSP sont une cause majeure dans la progression de l’athérosclérose (Ayada K. *et al*. 2007). Les HSP60, exprimées sur les cellules stressées de l’endothélium vasculaire, pourraient être la cible antigénique d’une réponse auto-immune, à cause de leur mimétisme moléculaire avec les HSP bactériens.

1.4 Biomarqueurs inflammatoires et pathologies cardiovasculaires

Un nombre important de maladies inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn, sont associés à des taux élevés de composés circulants, tels que la protéine C-réactive, le fibrinogène, les immunoglobulines et d'autres protéines de la phase aigue de l'inflammation. D'autre part, l'hyperlipémie n'étant présente que dans moins de 50% chez les patients qui ont développé un IDM, et étant donné le rôle essentiel des médiateurs inflammatoires dans l'athérogenèse et la physiopathologie de la vulnérabilité de la plaque d'athérome, l'attention s'est focalisée sur les concentrations plasmatiques de ces marqueurs inflammatoires (biomarqueurs) et leurs capacités à prédire un risque accru à développer une pathologie cardiovasculaire.

Ces dernières années, différents groupes ont cherché à savoir si les marqueurs circulants de l'inflammation pouvaient être également des marqueurs de l'athérosclérose. Deux questions se sont alors posées :

- Est-ce que les marqueurs circulants de l'inflammation diffèrent entre les patients atteints d'athérosclérose et ceux en bonne santé ?
- Est-ce que les marqueurs circulants de l'inflammation diffèrent entre les sujets atteints d'une pathologie athérosclérеuse stable et ceux dont la plaque risque de se rompre (syndromes coronariens aigus).

1.4.1 Description des marqueurs de l'inflammation

1.4.1.1 Le fibrinogène

Cette protéine est synthétisée par le foie. Ses effets hémostatiques augmentent la viscosité sanguine et l'adhésion des leucocytes. Sa sécrétion est régulée par un grand nombre de cytokines. Ce marqueur de l'inflammation est élevé chez les sujets en bonne santé mais qui héritent d'un risque pour l'infarctus du myocarde (Margaglione M. *et al*. 2000).

1.4.1.2 Les leucocytes

La phase la plus précoce de formation de la plaque est marquée par l'infiltration de leucocytes dans la paroi artérielle. Les leucocytes sont produits par la moelle osseuse et participent à la

synthèse de nombreuses cytokines inflammatoire et des anticorps. Les cytokines affectent elles-mêmes le nombre de cellules dans le sang périphérique. Le nombre de leucocytes est statistiquement associé à différents facteurs de risque cardiovasculaire tels que le tabagisme, l'obésité et la pression sanguine.

1.4.1.3 Les cytokines

Les principales cytokines pro-inflammatoires sont les interleukines IL-1, IL-6 et TNF-α. TNFα est une cytokine circulante multifonctionnelle sécrétée des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses aussi bien que des macrophages. Cette cytokine joue un rôle majeur dans la cascade de stimulation et d'activation d'autres cytokines. Quant aux autres cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6, ce sont des cytokines pleïotropiques à effets variés reliés à l'inflammation, la défense de l'organisme et l'infiltration tissulaire (Van Snick J. 1990; Papanicolaou D.A. *et al*. 1998). IL-6 est un médiateur clé de la réponse aigue de l'inflammation et le déterminant principal de la production de CRP (Heinrich P.C. et al. 1990; Baumann H. and Gauldie J. 1990).

1.4.1.4 Les molécules d'adhésion

L'adhésion des leucocytes circulants à l'endothélium et leur transmigration à l'intérieur de la paroi artérielle est une étape précoce dans la formation de l'athérosclérose. Ces étapes sont dépendantes d'une cascade d'évènements médiée par une famille de molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales vasculaires (Munro J.M. and Cotran R.S.1988; Albelda S.M. *et al*. 1994). La molécule 1 d'adhésion cellulaire vasculaire, la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM-1), la molécule d'adhésion leucocytaire (ELAM-1) et le récepteur E-selectin sont exprimés à la surface des cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et macrophages tissulaires (O'Brien K.D. *et al.* 1996; Libby P. and Li H. 1993). Ces molécules d'adhésion induisent le roulement des monocytes et lymphocytes à leurs surfaces, ainsi que la fixation et la migration transendothéliale de ces cellules sanguines (Luscinskas F.W. *et al*. 1994; Gerszten R.E. et al. 1996; Berlin C. et al. 1995; Alon R. *et al*. 1995).

1.4.1.5 Les immunoglobulines

Elles sont sécrétées par les lymphocytes B activés et font parti de la réponse immunitaire humorale suite à l'agression de microorganismes. Les IgG, IgA et IgM sont sécrétés à partir des lymphocytes activés et participent en fonction du temps de réponse à la fonction de « mémoire immune ».

1.4.1.6 La protéine C-réactive

La CRP est une protéine pentamérique synthétisée dans le foie. Sa principale action est d'activer le complément et de bloquer les infections. Les principaux stimuli de la sécrétion de la CRP sont IL-1 et IL-6. Les niveaux circulants de la CRP sont reliés à un grand nombre de facteurs de risques cardiovasculaires tels que l'obésité, la fumée de cigarette, le fibrinogène, le cholesterol-HDL, la pression sanguine, le taux de triglycérides, le diabète, aux apolipoprotéines B et inversement aux taux de cholestérol-HDL à la fois chez les enfants et les adultes (Mendall M.A. *et al*. 1996; Cook D.G. *et al.* 2000). D'autre part, l'augmentation de la température au niveau de plaques coronariennes instables évaluées par un cathéter thermogénique invasif est corrélée à des concentrations élevées de CRP (Stefanadis C. *et al.* 2000).

1.4.2 La CRP, biomarqueur de l'inflammation et du risque cardiovasculaire

L'utilisation en pratique clinique du dosage de la CRP pour estimer le risqué cardiovasculaire semble plus intéressant que celui de la plupart des biomarqueurs de l'inflammation (Ridker P.M. 1999). Pour exemple, il n'existe aucun standard pour mesurer la lipoprotéine a. Quant aux variations circadiennes du fibrinogène, elles rendent sa quantification difficile. Bien que la concentration de l'homocystéine soit reliée à la prédiction du risque cardiovasculaire, les données prospectives sur son utilité prédictive sont encore inconsistantes, tout comme les données prospectives concernant la lipoprotéine a (Greenland P. 2003). Les capacités prédictives des niveaux plasmatiques de la hsCRP et du fibrinogène s'ajoutent à ceux des concentrations plasmatiques de lipides (cholestérol total, triglycérides, HDL…).

Cependant, il n'est pas clair si la détermination du risque peut être améliorée par la combinaison de mesures additionnelles telles que la lipoprotéine a, l'homocystéine ou des marqueurs fibrinolytiques tels que l'activateur du plasminogène tissulaire ou l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1). En effet, l'analyse des marqueurs de prédiction du risque cardiovasculaire dans l'étude « Women's Health Study » (Ridker P.M, Hennekens C.H. *et al*. 2000) a montré que la valeur plasmatique de la CRP-hs était de loin le meilleur marqueur, et lorsque combiné aux taux plasmatiques de cholestérol / cholestérol-HDL, elle fournissait la prédiction la plus puissante du risque cardiovasculaire **(Figure 7)** (Ridker P.M. 2003).

La CRP présente des caractéristiques idéales pour être marqueur de risque, comme l'indique la plupart des critères présentés dans le tableau 2 (de Ferranti S.D. and Rifai N. 2007). En effet, de nombreux travaux démontrent aujourd'hui un rôle biologique de la CRP dans l'athérosclérose. Les concentrations de CRP détectées par analyse ultrasensible (hsCRP) sont associées au risque cardiovasculaire dans les études épidémiologiques prospectives. L'analyse ultrasensible repose sur une technique immunoturbidimétrique qui s'appuie sur l'agglutination immunologique de particules de latex sur lesquelles sont fixées des anticorps anti-CRP. Cette technique permet de détecter des concentrations de CRP inférieures à 0.1 mg/L (Grandjean F. *et al.* 2006). L'hsCRP complète les modèles prédictifs de maladies cardiovasculaires, tels que le score de risque de Framingham. D'autre part, les méthodes de mesure de la CRP sont standardisées (Kimberly M.M. *et al.* 2003). Enfin, les interventions qui diminuent le risque cardiovasculaire diminuent également les concentrations de hsCRP.

Le but principal des programmes de « screening » du risque cardiovasculaire doit être l'identification des individus à haut risque lorsque ceux-ci sont contrôlés par rapport à leur style de vie (tabagisme, exercice, aliementation, pression sanguine…). Il est évident que le respect des recommandations concernant le style de vie est directement relié au risque absolu de développer une pathologie cardiovasculaire. Ainsi, la prise en compte des taux de CRP dans le diagnostic combinée à l'exploration lipidique fournit un outil de prédiction puissant.

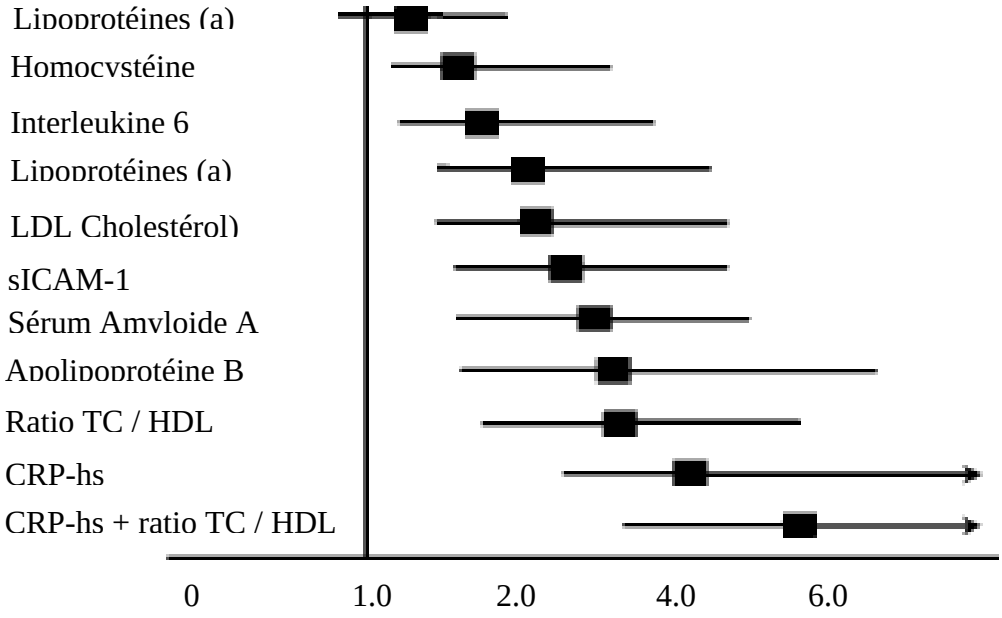


Figure 7 : *Risque relatif de développer une pathologie cardiovasculaire en fonction des biomarqueurs* (Ridker P.M. 2003)

Tableau 2: *Caractéristiques idéales d'un marqueur sérique de risque cardiovasculaire* (de Ferranti S.D. and Rifai N. 2007)
1. Présente un lien biologique avec le risque
2. Prédit les maladies cardiovasculaires en fonction des populations selon des méthodologies de recherches variées (épidémiologique, prospective…)
3. Agit indépendamment des autres facteurs de risque
4. Augmente la capacité à prédire la maladie à l'aide du score de risque Framingham
5. Présente une stabilité biologique relative au cours du temps
6. Dosable facilement à l'aide de techniques reproductibles et standardisées
7. Sa concentration varie lors de traitements thérapeutiques

Cependant, il faut noter qu'il n'y a aucune évidence que la réduction des taux de CRP réduise les risques d'évènements cardiovasculaires. Toutefois, de nombreuses interventions connues pour réduire le risque cardiovasculaire sont liées à la réduction des taux de CRP, telles que la perte de poids, le régime, l'exercice et l'arrêt de la cigarette. De plus, plusieurs agents pharmacologiques qui réduisent le risque cardiovasculaire influencent également les taux de CRP. Parmi ceux-ci, les statines sont capables de réduire les taux médians de CRP de 15 à 25 % dès 6 semaines après le début de la thérapie.

1.4.3 Problèmes généraux liés à l'utilisation des biomarqueurs

La mise en évidence d'une relation statistique entre la concentration d'un biomarqueur et la survenue d'un événement clinique devient intéressante lorsque le biomarqueur est un facteur de risque indépendant (analyse multivariée). Dans la majorité, mais pas dans toutes les études, les concentrations élevées de CRP sont un facteur de rique indépendant. Cependant, la prédiction du risque de survenue d'un évènement clinique est améliorée par l'utilisation de plusieurs biomarqueurs (de Ferranti S.D. and Rifai N. 2007).

Les associations statistiques entre concentrations des biomarqueurs sont le résultat d'études épidémiologiques. Les valeurs des odds ratios (OR) sont faibles (entre 1 et 2) (Ridker P.M. et al. 2002; Ridker P.M. and Cook N.2004). Néanmoins, ces valeurs de OR ne permettent pas l'utilisation de l'information fournie par la concentration d'un biomarqueur pour décider de la pertinence d'un traitement pour un patient donné.

La pertinence clinique d'un biomarqueur est renforcée si sa biologie est comprise et si ceci permet la mise en évidence d'une relation causale entre le biomarqueur et la physiopathologie de la pathologie. En l'occurrence, de nombreux travaux essayent de répondre à cette question concernant la CRP, à savoir si elle est juste marqueur de risque ou bien médiateur de l'athérothrombose (Blake G.H. and Ridker P.M. 2003).

Enfin, l'intérêt clinique est amélioré lorsque la concentration du biomarqueur peut être utilisée pour la titration des doses de médicaments utilisés pour traiter la pathologie en question ou ses complications. Pour exemple, l'analyse des données issues de l'étude PROVE-IT (Pravastaton or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy) a montré que, indépendemment des concentrations de LDL (< 70mg/dL), les patients traités aux statines dont les concentrations

de hsCRP étaient les plus faibles (< 2mg/L), avaient de meilleures chances de survies que ceux dont les concentrations étaient élevées (> 2mg/L) (Ridker P.M. *et al*. 2005).

Ainsi, les données accumulées sur la capacité des concentrations plasmatiques de la hsCRP à prédire le risque cardiovasculaire, complétées par les données de mesures lipidiques, ont conduit à des recommandations, établies par l'AHA (American Heat Association) et le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (Pearson T.A. 2003). Ces recommandations stipulent que la mesure de la hsCRP est logique pour estimer le risque cardiovasculaire dans le cadre de la prévention primaire coronarienne et en particulier, chez les individus à risque.

2. La protéine C-Réactive

2.1 Introduction

La Protéine C –Réactive est un membre de la famille protéique des pentraxines qui inclue la protéine Sérum Amyloid (SAP), un constituant de tous les dépôts amyloides. Chez l'homme et d'autres espèces animales, la CRP est une protéine plasmatique dont la concentration augmente de manière rapide et importante en réponse à une infection ou un dommage tissulaire. La CRP, liée au Ca^{2+}, se fixe spécifiquement à la phosphorylcholine (PCh), constituant de nombreuses bactéries et polysaccharides fongiques, ainsi qu'à la plupart des membranes cellulaires biologiques (Volanakis J.E. and Kaplan M.H. 1971). En effet, la CRP a été découverte et nommée en raison de sa réactivité avec les résidus PCh de C-polysaccharide, l'acide teichoique de *Streptococcus pneumoniae* (Tillet W.S. and Francis T. 1930). La CRP se fixe également sur certains constituants nucléaires qui ne contiennent pas de PCh, tels que les petites particules ribonucléiques (Pepys J. and Longbottom J.L. 1971; Du Clos T.W. 1989). La CRP complexée au ligand est reconnue par C1q et stimule efficacement la voie classique d'activation du complément humain (Kaplan M.H. and Volanakis J.E. 1974; Volanakis J.E. 1982a). La CRP complexée peut aussi éliciter des réponses des cellules phagocytaires à travers la fixation aux récepteurs FcγRI et FcγRII (Bharadwaj D. *et al.* 1999; Marnell L. *et al*. 1995). Cette capacité à reconnaître des agents pathogènes et à médier leur élimination en activant la voie du complément et en recrutant les cellules phagocytaires, fait de la CRP un constituant important de la première ligne de défense innée de l'hôte. D'autre part, la protéine apparaît jouer un rôle dans la clairance des cellules hôtes apoptotiques et nécrotiques, permettant ainsi une restauration de la structure et de la fonction des tissus endommagés. Cependant, comme d'autres éléments liés à l'immunité, la CRP n'a pas seulement des effets protecteurs mais peut développer des effets potentiellement nocifs. Ainsi, la CRP est impliquée directement dans l'athérogenèse (Torzewski M. *et al*. 2000; Zwaka, Hombach T.P. *et al*. 2001) et dans la médiation des dommages tissulaires dans l'infarctus du myocarde (Griselli M. *et al.* 1999).

2.2 Régulation de l'expression

La rapide augmentation de la concentration de la CRP dans le sérum lors de la phase aigue inflammatoire permet d'atteindre une magnitude dans la réponse de 1000 fois entre 24h et 48h. Le retour à un taux normal de CRP (quelques µg/ml) s'effectue avec un temps de demi-vie de 48h, temps relativement long pour un biomarqueur.

La CRP est principalement synthétisée par le foie (Gabay C. and Kushner I. 1999), mais son expression extrahépatique a été également démontrée (Dong Q. and Wright J.R. 1996). L'expression de la CRP est régulée principalement au niveau transcriptionnel mais des mécanismes post-transcriptionnels peuvent également jouer un rôle significatif. Le gène de la CRP a été cartographié sur le chromosome 1 humain, entre les régions 1q21 et 1q23. Il contient 2263 nucléotides et a un seul intron (Woo P. *et al.* 1985). Le transcript est caractérisé par la présence d'une longue région non traduite 3' de 1.2 kb qui peut-être médie sa dégradation rapide après restauration de la structure et de la fonction tissulaire (**Figure 8**) (Marnell L. *et al.* 2005).

La régulation transcriptionnelle de la CRP a été étudiée de manière intensive à la fois *in vitro* et *in vivo,* et les résultats combinés ont établis que l'interleukine 6 (IL-6) est le principal inducteur du gène de la CRP, alors que l'interleukine 1 (IL-1), les glucocorticoïdes et d'autres facteurs dont les produits d'activation du complément, agissent en synergie avec IL-6 pour potentialiser ces effets (Ganapathi M.K. *et al*. 1991; Szalai A.J. *et al.* 2000; Toniatti C. *et al*. 1990). IL-1β stimule l'induction d'IL-6 à travers les voies de transduction NF-κB et p65 (Agrawal A. *et al.* 2003). L'induction d'IL-6 est médiée par les facteurs de transcription STAT3 se fixant aux éléments de réponse -108 (Zhang D. *et al.* 1996) et C/EBPβ (IL-6-inducible CCAAT/enhancer binding proteins) se fixant aux élements de réponse -52 (Agrawal A., *et al*. 2003) et -219 (Li S.P. *et al.* 1990). Des études récentes ont montré que la fixation de C/EBPβ à cette position requiert la présence de la protéine Rel p50 qui la recouvre au niveau d'une séquence non-consensus (Cha-Molstad H. *et al.* 2000). Les deux protéines et leurs éléments génomiques correspondants forment alors un complexe ternaire, qui peut-être interagit directement avec le promoteur (Agrawal A. *et al.* 2001).

La transcription est également contrôlée à travers les éléments E-box (Szalai A.J. *et al.* 2005) du promoteur aux positions -412 à -407 (E-box1) et -394 à -389 (E-box2). Le facteur USF1 (Upstream stimulating factor 1) se fixe sur E-box1. Enfin, un site proche de la queue poly(A) est également nécessaire pour l'expression de la CRP chez la souris transgénique (Murphy C. *et al.* 1995).

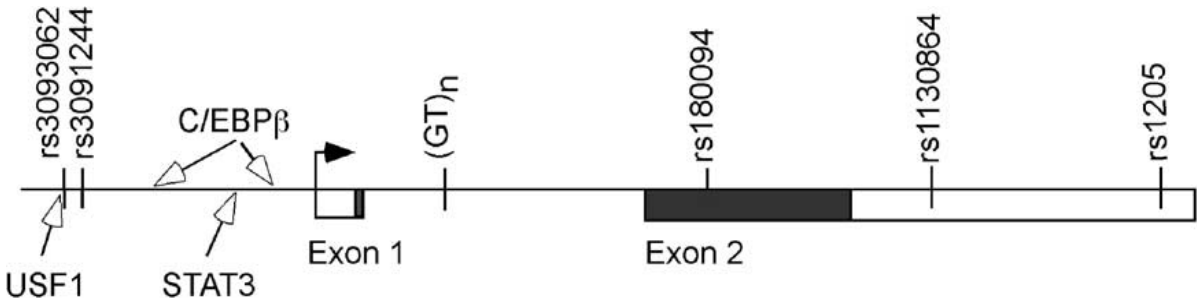


Figure 8 : *Structure du gène de la CRP*

Les exons sont représentés sous forme de boite alors que les introns et régions intergéniques sous forme de ligne. Les sites de fixation sur le promoteur des facteurs de transcription STAT3, C/EBPβ et USF1 sont indiqués par des flèches blanches. L'exon 1 contient la séquence principale et les deux premiers acides aminés de la protéine mature. Les régions codantes de la protéine mature sont présentées des boîtes noires. Les SNPs et les répétitions dinucléotidiques $(GT)_n$ sont indiqués par un trait sur le gène. Le site de démarrage de la transcription est indiqué par une flèche noire. Les SNPs rs3093062 et rs3091244 sont dans les éléments E-box1 et E-box2 respectivement. Le SNP rs1800947 est à l'intérieur de la région codante mais ne modifie pas la séquence d'acides aminés. Enfin, les SNPs rs1130764 et 1205 sont dans la région 3' non codante (Marnell L. *et al* 2005).

Cependant, des études réalisées sur des souris déficientes en IL-6 ont démontré que l'IL-6, bien que nécessaire, n'est pas suffisante pour une expression induite du transgène de la CRP (Weinhold B. and Ruther U. 1997). En effet, alors que les souris femelles n'expriment jamais de manière constitutive ou induite la CRP transgénique, les souris mâles expriment seulement la CRP transgénique en présence de testostérone (Szalai A.J. *et al.* 1998) .

Les concentrations à l'état basal de la CRP montrent clairement qu'il existe une transmission génétique dans 40% des études familiales effectuées (Kluft C. and de Maat M.P. 2003). Actuellement, trois polymorphismes du gène de la CRP sont associés à des changements de ses concentrations basiques (Brull D.J. *et al.* 2003; Szalai A.J. *et al*. 2002; Zee R.Y. and Ridker P.M. 2002). En identifiant les variations génétiques du gène de la CRP, des phénotypes dits « à risque » ont pu être décrits. Ces catégories avec un risque associé au génotype permettent de discriminer les individus à niveau faible de CRP mais présentant un phénotype pro-imflammatoire accru. Ainsi, le gène de la CRP est constitué de plusieurs polymorphismes associés au risque de pathologie cardiovasculaire (Hage F.G. and Szalai A.J. 2007). Certains polymorphismes affectent la quantité de CRP produite. Dans le gène de la CRP, les variations introniques dans les répétitions GT sont liées à des variations des taux de CRP sanguine et au risque de développer des évènements vasculaires. Parallèlement, le SNP (single polymorphisme nucleotide) +29A/T est également lié à la concentration de CRP sanguine mais pas au risque de resténose. Dans l'exon II, le SNP +1059G/C corrèle très bien avec la concentration de CRP sanguine, et dans au moins une étude, est associé à la vélocité du pouls. Cependant, il n'y a aucune corrélation avec la thrombose artérielle, la pression sanguine ou la resténose. Dans la région du promoteur, le SNP triallélique -390C/T/A, le seul polymorphisme de la CRP qui soit fonctionnel, corrèle avec la concentration de CRP et le risque de développer une maladie cardiovasculaire. Presque 10% des variations totales des concentrations de CRP sont liés directement aux SNP du gène de la CRP (Hage F.G. and Szalai A.J. 2007).

Les mécanismes post-transcriptionnels contribuent également à la régulation de l'expression de la CRP. De manière spécifique, il a été montré que le taux de sécrétion de la CRP était fortement accéléré lors de la phase aigue de l'inflammation (MacIntyre S.S. *et al.* 1985). Dans des conditions physiologiques normales, la CRP est synthétisée à des faibles taux, le pentamère étant assemblé à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) et largement retenu par deux carboxylestérases résidentes (Macintyre S. *et al.* 1994). Lors de la phase

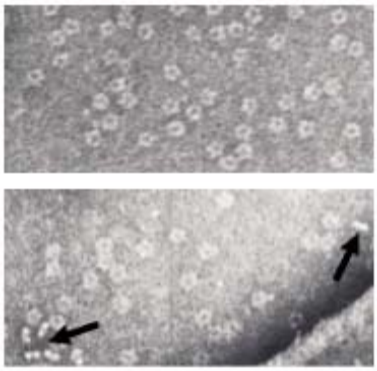
inflammatoire aigue, le temps de sécrétion de la CRP « pulse marquée » du RE est réduit de 18 heures à 75 minutes. Cette accélération prononcée de la sécrétion est apparemment due à une diminution de l'affinité de la CRP pour l'une des deux estérases suite à un changement de structure (Yue C.C. *et al.* 1996).

2.3 Structure

La structure de la CRP a été déterminée par cristallographie aux rayons X à une résolution de 3 Å (Shrive A.K. et al. 1996; Thompson D. *et al.* 1999). Comme la SAP, la CRP est constitué de 5 protomères associés de manière non covalente arrangés symétriquement autour d'un pore central **(Figure 9)**. Le protomère est constitué de 206 acides aminés (aa) repliés en 2 feuillets β antiparallèles avec une topologie aplatie. La structure est très similaire à celle de la SAP bien que certaines propriétés caractérisent chaque protéine.

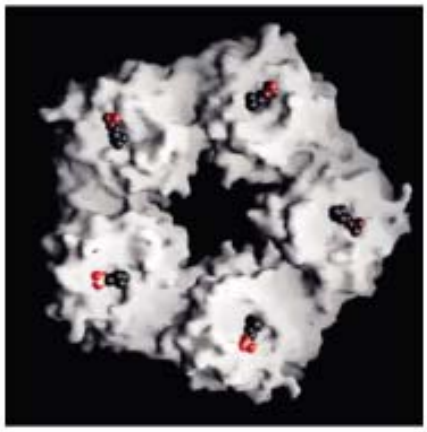
Les données de microscopie électronique (Roux K.H. *et al.* 1983) et de cristallographie indiquent que tous les protomères de la CRP pentamérique ont la même orientation. Ainsi, la molécule présente deux faces, une face dite de « reconnaissance » constituée de 5 sites de fixation à la phosphocholine et aux ions Ca^{2+} et une face dite « effectrice » constituée des sites de fixation à C1q et probablement aux récepteurs Fc. Deux régions d'acides aminés de la CRP ont été identifiées comme essentielles à la fixation sur les récepteurs FcγRI : la séquence LLGGPS homologue de la séquence (234 - 239) de l'IgG_1 humain et la séquence ALPAPI (327 – 333). Cette séquence d'acides aminés (175 à 185) de la CRP forme la pointe d'une longue fente profonde au sein de chaque protomère au niveau de la face effectrice (**Figure 10**). Les autres sous-unités de la figure 10 montrent des résidus autour de cette fente jouant un rôle important dans l'interaction avec C1q (Agrawal A. *et al.* 2001) et les récepteurs Fc (Bang R. *et al.* 2005; Marnell L. *et al* 1995). La modélisation de la fixation de la CRP à C1q a prédit que chaque domaine globulaire de C1q fixe un pentamère de CRP au niveau du pore central de la face effectrice (Gaboriaud C. *et al*. 2003).

A



B

C



<u>Figure 9</u> : *Structure moléculaire et morphologie de la CRP humaine*

A : Photographie en microscopie électronique de la forme pentamérique typique. ***B*** : Diagramme de la structure cristalline, montrant les plis de lectine et les 2 atomes de Ca^{2+} (sphères) au niveau du site de fixation du ligand de chaque protomère. ***C*** : Modèle dans l'espace de la molécule de CRP avec une molécule de phosphocholine localisée dans le site de fixation du ligand de chaque protomère (Pepys M.B. and Hirschfield G.M. 2003).

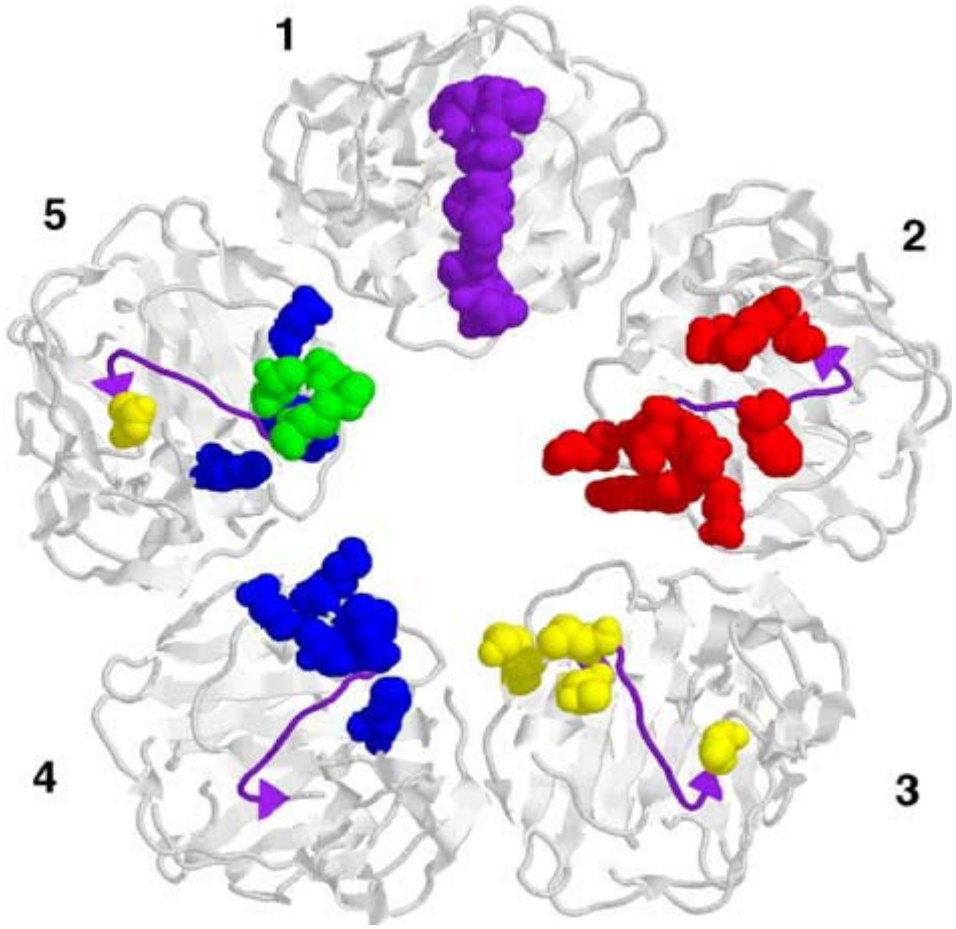


Figure 10 : *Structure de la CRP avec les sites de fixation possibles à FcγRI et C1q*

Le pentamère de CRP est représenté avec les résidus d'acides aminés 175 – 185 (violet) sous forme tridimensionnelle au niveau de la sous-unité 1 et sous forme de flèche dans les autres sous-unités. Sur la sous-unité 3, les résidus d'acides aminés (jaune) sont directement impliqués dans la fixation au récepteur FcγR. Le site de fixation à C1q envisagé est indiqué sur la sous-unité 4 (bleu). La sous-unité 5 présente à la fois les résidus des sous-unités 3 et 4 et de nouveaux résidus (vert) importants pour la fixation à la fois de C1q et de FcγR (Marnell L. 2005).

2.3.1 La structure affecte la fonction

Il existe plusieurs isoformes de la CRP : la forme native, pentamérique (CRPn) et l'isoforme monomérique (CRPm) (Taylor K.E. and van den Berg C.W. 2007). En effet, la CRPn peut se dissocier de sa forme pentamérique en sous-unités monomériques CRPm. Cette dissociation peut s'effectuer dans diverses conditions incluant un pH basique (Potempa L.A. *et al.* 1983), l'absence de calcium (Wu Y. *et al.* 2002), l'augmentation de la température (Potempa L.A. 1983) et la chélation (Potempa L.A. *et al.* 1987). Il est possible également que les différentes isoformes soient liées à un polymorphisme diminuant la stabilité de la structure pentamérique de la CRP, conduisant alors à la formation de la CRP monomérique. L'autre hypothèse est d'imaginer une augmentation de la stabilité de la CRP monomérique fixée à la membrane cellulaire, conduisant ainsi à une activation cellulaire endothéliale accrue.

Parallèlement à l'existence de plusieurs isoformes, la CRP subit des modifications post-traductionnelles qui pourraient influer sur son action. L'équipe de Das et al. (Das T. *et al.* 2003) a identifié, purifié et caractérisé plusieurs CRP issues de 6 conditions pathologiques différentes. Les auteurs ont mis en évidence des variants moléculaires glycosylés en fonction des conditions cliniques. Les différences observées lors des migrations électrophorétiques des CRP peuvent être les effets cumulés de petites différences dans les structures des monomères. La possible induction de quelques glycosyltransférases nécessaires pendant la régulation enzymatique post-traductionnelle pourrait être l'expression privilégiée de certains gènes exposés à des matériaux toxiques. Ceci faciliterait alors des niveaux de glycosylation différents lors des modifications post-traductionnelles. Ainsi, il est envisageable que les CRP soient modifiées de manières différentes, conservant toutefois leurs structures de pentraxines, mais avec quelques changements mineurs dans leur séquence d'acides aminés et glycosylation, les rendant unique dans leur fonction biologique.

Au-delà des controverses sur le rôle direct ou non de la CRP dans les maladies cardiovasculaires (Scirica B.M. and Morrow D.A. 2006), de nombreuses questions se posent sur la forme active de la CRP (CRPn ou CRPm) et si oui ou non ces isoformes se fixent à la surface cellulaire. Plusieurs équipes ont essayé de répondre à ces questions, mais les résultats restent aujourd'hui encore très contradictoires.

La relation entre certaines données obtenues *in vitro* et des observations cliniques a été débattue, étant donné que les concentrations de CRP utilisées dans la plupart des expériences étaient en excès de 5 mg/L (Blake G.J. and Ridker P.M. 2003). De plus, les expériences *in vitro* sont faites avec de la CRP native pentamérique. Il est alors probable que les niveaux circulants de CRP ne reflètent pas exactement les concentrations tissulaires de CRP. L'étude de Khreiss et al. (Khreiss T. *et al*. 2004a) argumente cette théorie. La CRP doit subir un changement de structure à la surface de la membrane cellulaire lors de l'activation endothéliale. Ce composant actif est alors déposé dans la paroi vasculaire où il induit l'athérogenèse. La CRP monomérique est capable d'induire l'activation endothéliale en moins de 4 heures alors que la CRP native, à savoir pentamérique, nécessite une action d'au moins 24 heures. Les actions de la CRP monomérique sont étroitement liées à la structure tissulaire (monocouche de cellules endothéliales) plus qu'à l'environnement sérique (présence de cofacteurs). Puisque les effets de la CRP native sont dépendants d'un cofacteur sérique non identifié, qui peut ne pas être présent en quantité physiologique dans les milieux de culture cellulaire, les concentrations *in vitro* de la CRP nécessitent alors d'être plus élevées pour compenser ce manque.

Parallèlement à ces études axées sur les actions potentiellement différentes de la CRP en fonction de sa structure, une autre étude de Khreiss et al. effectuée sur des plaquettes sanguines et neutrophiles en présence de différentes isoformes de la CRP (Khreiss T. *et al.* 2004b) confirme le rôle essentiel de la structure de la CRP dans sa fonction développée. En effet, la CRPn inhibe l'activation plaquettaire et empêche la capture plaquettaire par les neutrophiles, alors que la CRPm présente des activités pro thrombotiques puissantes. Cela signifie que la CRP monomérique peut induire et développer des syndromes coronariens aigus plus importants que la CRP native. L'action de la CRPn était fortement inhibée en présence d'anticorps anti-CD32 alors que les effets de la CRPm étaient atténués de manière significative par des anticorps anti-CD16. Enfin, la perte de la symétrie pentamérique de la CRP induit la secrétion d'IL-8 chez les neutrophiles humains via l'activation de NF-κB et AP-1 (Khreiss T. *et al.* 2005).

D'autres études, au contraire, indiquent que le pouvoir d'action de la CRP passe principalement par sa forme native. Ainsi, Pasceri et al. (Pasceri V. et al. 2000) ont montré que la CRPn active directement les cellules endothéliales humaines en induisant l'expression de molécule d'adhésion. Récemment, des préparations de CRPn pentamérique humaine,

issues de deux sources différentes (recombinante et sérique) et soumises à un traitement à l'urée et à l'EDTA pour obtenir des préparations de CRPm, ont presenté des activités différentes sur des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC). En effet, la CRPn exercait des effets athérogéniques plus puissants sur les HAEC comparée à la CRPm (Devaraj S. *et al.* 2006). La CRPn, à des concentrations plus faibles que la CRPm, augmente l'expression d'IL-8 et PAI-1 et diminue les prostacyclines et l'activité eNOS des cellules endothéliales. Il est important de noter que ces expériences ont été faites en présence de polymyxine B pour écarter tout effet biologique médié, non par la CRP, mais par des contaminants bactériens issus des préparations de CRP.

Face à ces deux hypothèses sur la forme active de la CRP, une troisième se présente avec la conclusion que ni la CRPn, ni la CRPm n'a la capacité d'induire la sécrétion de chémokines IL-8 et MCP-1 ou d'augmenter l'expression de molécule d'adhésion intracellulaire chez les cellules endothéliales (Taylor K.E. and van den Berg C.W. 2007). D'autre part, les auteurs ont mis en évidence, par cytométrie en flux, que seul la CRPm se fixait aux cellules endothéliales. L'explication la plus probable fournie par l'équipe de Taylor sur les différences de résultats observés avec l équipe de Khreiss et celle de Devaraj est la contamination des préparations de CRP avec des produits bactériens. Toutefois, cette hypothèse n'est pas justifiée, puisque ces équipes se sont affranchies de ces artéfacts à travers des étapes de purification et l'utilisation de produits antibactériens (polymyxine B). De plus, des travaux récents effectués sur des cellules endothéliales aortiques humaines à expression réduite pour le gène Toll Like Receptor 4 (TLR4) ont mis en évidence, de manière directe et pour la première fois, que les effets de la CRPn ne sont pas liés à une contamination de LPS (Dasu M.R. *et al.* 2007).

La CRP a été localisée au sein de lésions athéroscléreuses et les cellules de la lésion produisent elle-même la CRP (Calabro P. *et al*. 2003; Kobayashi S. *et al.* 2003; Torzewski J. *et al*. 1998; Torzewski M. et al 2000; Venugopal S.K. *et al*. 2005; Yasojima K. *et al.* 2001). Alors que la CRPn a été identifiée dans des lésions athéroscléreuses humaines précoces, colocalisée avec le complément, la CRPm a été identifiée dans l'intima de vaisseaux sanguins normaux (Diehl E.E. *et al*. 2000). A la différence de la CRPn, la CRPm n'active pas le complément. D'autre part, il est peu probable que la CRPm soit présente dans des lésions athéroscléreuses de la paroi artérielle où les concentrations en Ca^{2+} sont en excès à 2mM. Du fait, cela remet en question la pertinence de l'intérêt *in vivo* de la CRP (Pepys M.B. and

Hirschfield G.M. 2003). Cependant, il est tout à fait plausible que dans certains états pathophysiologiques, tels que des syndromes coronariens aigus, il existe des microdomaines d'environnement acide dans la paroi vasculaire qui pourraient activer la conversion de la CRPn en CRPm.

Avec le développement des souris transgéniques pour la CRP humaine (CRP-tg), un modèle animal existe aujourd'hui afin de déterminer le rôle de la CRP *in vivo*. Là encore, les résultats *in vivo* ne sont pas clairs. La CRP de souris appelée SAP (Serum Amyloid P composant) est présente seulement en très faible quantité dans le sang, et sa concentration ne varie pas ou peu pendant l'inflammation (Szalai A.J. and McCrory M.A. 2002). Deux études récentes ont révélé que l'expression de la CRP humaine chez la souris induit, de manière active, un processus cardiovasculaire « adverse ». Tout d'abord, la CRP humaine entraîne un phénotype prothrombotique, mis en évidence par des taux élevés d'occlusions thrombotiques après un dommage artériel (Danenberg H.D. *et al.* 2003). D'autre part, le croisement de souris CRP-tg avec une souris ApoE-/- montre que la CRP joue un rôle actif dans l'athérogenèse *in vivo* (Paul A. et al. 2004). En effet, ces souris CRP-tg/ApoE-/- présentent des signes cliniques d'athérosclérose aortique accélérée, associés à une augmentation du dépôt de complément dans la paroi vasculaire ainsi qu'une expression élevée d'un certain nombre de molécules (récepteur de l'angiotensine 1, VCAM-1 et collagène). Toutefois, ces résultats *in vivo* restent controversés par les travaux de Tennent *et al*. qui concluent que la CRP humaine transgénique n'est ni pro-atherogénique, ni pro-athérothrombotique, ni pro-inflammatoire chez les souris ApoE-/- (Tennent G.A. *et al*. 2008). La différence peut s'expliquer par une concentration basale en CRP plus élevée dans l'étude de Paul et al. que dans celle de Tennent *et al*.
Cependant, la fonction *in-vivo* de la CRP n'est pas encore clairement définie car des différences importantes existent dans la séquence nucléotidique et la régulation de celle-ci chez la souris (SAP) (Hirschfield G.M. *et al.* 2005). En effet, la CRP n'est pas une protéine de la phase aigue chez la souris puisque sa concentration n'excède pas 1-2 mg/L même au pic de la réponse de la phase aigue de l'inflammation, alors que la concentration plasmatique et le comportement lors de la phase aigue de l'inflammation de la CRP humaine chez des souris transgéniques male C57BL/6 sont comparables aux caractéristiques de la CRP chez les humains. D'autre part, il faut noter que les souris femelles expriment le transgène de la CRP à des taux beaucoup plus faibles que les males et ne peuvent être prises en compte dans les modèles étudiés (Hirschfield G.M. *et al.* 2003). Le mécanisme epliquant la différence de sexe dans l'expression transgènique chez la souris n'est pas connu, car le transgène contient la

séquence promotrice humaine complète (Ciliberto G. *et al.* 1987) et il n' y a pas de différence d'expression de la CRP entre les hommes ou les femmes, du moins dans cette étude.

2.4 Concentration circulante de la CRP et inflammation

Chez l'adulte en bonne santé, la concentration médiane de la CRP est de 0.8 mg/l, le 90ème centile est de 3 mg/l et le 99ème centile est de 10 mg/l (Shine B. *et al*. 1981). Ces valeurs, après un stimulus inflammatoire, peuvent augmenter de 50 mg/l à plus de 500 mg/l. La CRP plasmatique est produite en majorité par les hépatocytes principalement sous le contrôle transcriptionnel de la cytokine IL-6 même si d'autres sites de synthèse locale de CRP et de sécrétion ont été suggérés. La synthèse hépatique de novo démarre très rapidement suite à seul stimulus. Les concentrations sériques augmentent jusqu'à 5 mg/l dans les 6 heures qui suivent et atteignent un taux maximal au bout de 48 heures. La demie vie plasmatique de la CRP est d'environ 19 heures et reste constante quelle que soit les conditions physiologiques. Seul le taux de synthèse détermine la concentration circulante de la CRP (Vigushin D.M. *et al.* 1993). Ceci reflète alors l'intensité du processus pathologique stimulant la production de CRP. Dés que le stimulus responsable de l'augmentation de la CRP cesse, le taux de CRP circulante chute rapidement conduisant à la clairance de la CRP plasmatique. Chez la population générale non sélectionnée de sujets en bonne santé, la valeur médiane de CRP est légèrement plus élevée que chez les donneurs de sang et tend à augmenter avec l'âge et le poids, reflet probablement de l'incidence supérieure des pathologies subcliniques (Hutchinson,W.L. *et al.* 2000). Cependant, et de manière surprenante étant donné la sensibilité, le turn-over et les valeurs normales de la CRP, les sujets de la population générale tendent à avoir des concentrations stables de CRP caractéristiques de chaque individu, mise à part des pics occasionnels liés probablement à des infections mineures ou subcliniques, inflammatoires ou traumatiques. D'autre part, il n'y a aucune variation saisonnière des concentrations basales de la CRP.

Les associations entre la production de la CRP et les polymorphismes génétiques des cytokines IL-1 et IL-6 ont été suggérées. Une répétition polymorphique des bases GT dans l'intron du gène codant pour la CRP, est associée à des différences de concentrations basales de la CRP chez les individus en bonne santé, les patients atteints de lupus érythémateux (Szalai A.J. 2002b) et chez des individus susceptibles de développer une maladie à

pneumocoque invasive. Si de tels polymorphismes, particulièrement dans le gène de la CRP lui-même, sont étroitement corrélés avec des concentrations basales de CRP et/ou le taux de la CRP dans la phase inflammatoire aigue, mais aussi avec les signes cliniques, l'attribution d'un rôle de défense de l'organisme à la CRP lors d'une maladie inflammatoire sera renforcée.

De plus, dans la plupart des maladies (**Tableau 3**) les valeurs circulantes de la CRP reflètent l'état inflammatoire et les dommages tissulaires en cours, bien mieux que d'autres paramètres biologiques analysés lors de la phase aigue inflammatoire tels que la viscosité plasmatique et la vitesse de sédimentation des globules rouges. Les valeurs de la CRP lors de la phase aigue inflammatoire ne montrent pas de variations circadiennes et ne sont pas affectées par le métabolisme alimentaire. Un dommage hépatique peut altérer la production de la CRP sans qu'aucune autre pathologie ni drogues ne puissent la réduire, d'où l'importance de ce très bon marqueur biochimique non spécifique de l'inflammation.

La mesure de sa concentration contribue à mettre en évidence une maladie organique, à contrôler la réponse de l'organisme au traitement inflammatoire ou infectieux, à détecter une infection récurrente chez des individus immunodéprimés et enfin à mettre en évidence des maladies spécifiques caractérisées par une réponse inflammatoire aigue absente ou modeste (**Tableau 4**).

Tableau 3 : *Comportement de la CRP dans différentes pathologies* (Pepys and Hirschfield 2003)

Concentrations élevées en CRP	
Infections	Bactéries
	Mycobactéries
	Virus
Complications allergiques ou infection	Fièvre rhumatismale
	Œdème érythémateux
Maladie inflammatoire	Arthrite rhumatoïde
	Arthrite chronique juvénile
	Maladie de Reiter
	Maladie de Crohn
	Fièvre méditerranéenne familiale
Nécrose	Infarctus du myocarde
	Embolie tumorale
	Pancréatite aigue
Traumatisme	Chirurgie
	Brûlures
	Fracture
Cancer	Lymphome
	Carcinome
	Sarcome
Concentrations plus faibles ou normales de la CRP	
	Lupus érythémateux
	Leucémies
	Colite ulcérative

Tableau 4 : *Dosages de la CRP en routine clinique* (Pepys and Hirschfield 2003)

Test de "screening" pour les maladies organiques
Évolution de l'activité de la maladie dans les conditions inflammatoires
Arthrite chronique juvénile
Arthrite rhumatoïde
Maladie de Reiter
Maladie de Crohn
Fièvre rhumatoïde
Fièvres familiales incluant la fièvre méditerranéenne
Pancréatite aigue
Diagnostic et gestion de l'infection
Endocardite bactérienne
Septicémie néonatale et méningite
Infection dans un lupus érythémateux
Infection dans une leucémie
Complications post-opératoires incluant l'infection et le thromboembolisme
Diagnostic différentiel et classification de maladies inflammatoires
Lupus érythémateux vs arthrite rhumatoïde
Maladie de Crohn vs colite ulcérative

2.5 Fonctions physiologiques et inflammation

La fonction biologique principale de la CRP est déterminée par sa capacité à reconnaître les agents pathogènes et les cellules endommagées chez l'hôte et à médier leur élimination en recrutant le système du complément et les cellules phagocytaires. Le PCh, le principal ligand de la CRP, est principalement détecté dans les acides techoïques, les carbohydrates capsulaires et les lipopolysaccharides des bactéries et autres micro-organismes. Le PCh est retrouvé chez S. pneumoniae (Brundish D.E. and Baddiley J. 1968), Haemophilus influenzae (Weiser J.N. *et al.*. 1997), Pseudomonas aeruginosa, Neisseria meningitides et Neisseria gonorrhoeae (Serino L. and Virji M. 2000), Proteus morganii (Potter M. 1971), et enfin Aspergillus fumigatus (Pepys J. and Longbottom J.L.1971).

Le PCh est également présent dans le feuillet externe de nombreuses membranes biologiques au niveau de la lécithine et de la sphingomyeline. La mise en évidence de l'interaction entre la CRP et les membranes cellulaires a été fournie par des expériences montrant que la CRP était associée aux membranes cellulaires endommagées et nécrotiques au niveau de sites inflammatoires et des nécroses tissulaire, exclusivement (Kushner I. and Kaplan M.H. 1961; Kushner I. *et al.* 1963). Il a été démontré également que la CRP pouvait réagir avec des émulsions de phospholipides (lécithine et sphingomyéline) contenant des PCh.

La fonction de la CRP est également étroitement liée à la phospholipase A_2 ($sPLA_2$), une enzyme secrétée par le foie comme une protéine de la phase aigue inflammatoire (Hack C.E. *et al.* 1997). La $sPLA_2$ agit sur les phospholipides en générant des lysophospholipides et en libérant l'acide arachidonique précurseur des prostaglandines et des thromboxanes. Cependant, la $sPLA_2$ ne peut pas hydrolyser les phospholipides du feuillet membranaire externe des cellules normales où beaucoup de lécithines sont présentes (Fourcade O. *et al.* 1995). Les dommages cellulaires causent donc un échange de phospholipides (flip-flop) entre les feuillets interne et externe, conduisant à un enrichissement de la couche externe en phosphatidylsérine et en phosphatidylethanolamine, normalement présentes dans la couche interne. Les phospholipides deviennent alors plus susceptibles à l'hydrolyse par la $sPLA_2$ qui génère alors des lysophospholipides tels que la lysolécithine. En retour, la CRP peut alors interagir avec le feuillet externe par l'intermédiaire de la PCh contenue dans la lysolécithine (Hack C.E. *et al.* 1997). Le flip-flop membranaire apparaît chez les cellules en apoptose

(Martin S.J. *et al.* 1995) qui deviennent alors des cibles pour la $sPLA_2$ et la CRP. L'évidence expérimentale de la fixation de la CRP aux cellules apoptotiques a été fournie récemment (Gershov D. *et al.* 2000), une analyse cinétique indiquait que la fixation de la CRP à des cellules subissant l'apoptose apparaissait plus tardivement que la fixation de l'annexine V à la phosphatidylsérine. Ainsi, le réarrangement lipidique membranaire et la génération de lysolécithine par la $sPLA_2$, précèdent la fixation de la CRP.

Des cellules sujettes à une attaque du complément (Li Y.P. *et al.*1994) présentent une distribution de la CRP à leur surface similaire à celle du complexe d'attaque membranaire du complément. Cependant, on ignore si la fixation de la CRP dans ce cas, est liée à la disruption des phospholipides causée par l'insertion du complexe protéique du complément ou bien à la génération de lysolécithine par la $sPLA_2$ (McCloskey M.A. *et al.*1989).

En plus de se fixer à des cellules stressées mais intactes, la CRP interagit avec des constituants membranaires et nucléaires de cellules nécrotiques. Plusieurs constituants nucléaires tels que les histones (Du Clos T.W. *et al.* 1988), les petites protéines et particules ribonucléaires (Du Clos T.W. 1989; Pepys M.B. *et al.*1994) interagissent avec la CRP de manière Ca^{2+} dépendante. Parallèlement, la PCh et la CRP ont été détectées au niveau des noyaux des cellules nécrotiques au niveau des sites inflammatoires (Gitlin J.D. *et al.*. 1977).

La CRP fixée à un ligand multivalent est reconnue par C1q et peut efficacement initier la formation de la convertase C3 à travers la voie d'activation classique du complément (Siegel J. *et al.* 1975). Un changement de conformation des protomères de la CRP est nécessaire pour exposer leurs sites de fixation à C1q. Les données sur sa structure (Shrive A.K. *et al.*1996) indiquent la présence d'un site de fixation de la CRP par la protomère. Cependant, en tenant compte de la taille relative de la CRP et de la tête globulaire de C1q (Agrawal A. *et al.* 2001), il est probable que seul un site de fixation à C1q par pentamère soit actif. Il semble donc que plusieurs pentamères de la CRP soient nécessaires pour l'activation de la voie classique du complément, condition également requise lors de l'activation du complément par les IgG. L'assemblage de la convertase C3 par la CRP complexée s'effectue de la même manière que par les complexes immuns. Comme des agrégats immuns, les précipitats insolubles de CRP-PCh sont solubilisés par le complément et les fragments de C3 se fixent de façon covalente à

la CRP et PCh lors de la réaction de solubilisation (Volanakis J.E. 1982b). Ainsi, l'activation initiée par la CRP de la voie classique du complément mène à une reconnaissance de la surface membranaire activée avec des fragments opsonisants de C3 et C4, en accord avec le fait que la CRP médie la phagocytose de ses ligands comme le démontrent de nombreuses données expérimentales *in vitro* et *in vivo.* Les activités fonctionnelles de la CRP attribuables à des interactions directes avec des cellules phagocytaires sont connues depuis plusieurs années (Hokama Y. *et al.* 1962; Kindmark C.O. 1971; Mortensen R.F. *et al.* 1976) mais des récepteurs potentiels de la CRP n'ont été identifiés que récemment. D'après l'équipe de Du Clos, les récepteurs des IgG sont également des récepteurs de la CRP.

En vue de l'évolution constante des données concernant la biologie des FcRs et particulièrement de leur capacité à développer des signaux activateurs ou inhibiteurs aux cellules effectrices (Daeron M. 1997), il est possible que les résultats contradictoires apparents sur les effets de la CRP rapportés au fil des années, puissent être attribués, au moins en partie, à l'expression différentielle et/ou à des profils variés d'agrégation de FcRs. L'expression différentielle des récepteurs pourrait être liée à l'exposition des cellules à différents types de cytokines, alors que les profils d'agrégation pourraient dépendre en partie de la nature du ligand de la CRP ou de la CRP elle-même.

L'interaction de la CRP, liée à une particule ou à un type cellulaire, avec des cellules phagocytaires conduit à la phagocytose de la cellule ou de la particule. Les propriétés opsonisantes de la CRP ont été démontrées à la fois dans les macrophages (Mortensen R.F. *et al.* 1976; Mortensen R.F. and Duszkiewicz J.A. 1977) et les neutrophiles (Kilpatrick J.M. and Volanakis J.E. 1985; Kindmark C.O. 1971). La phagocytose de particules opsonisées par la CRP des monocytes ou neutrophiles de souris s'effectuerait à travers le FcγRI (CD64) (Mold C. *et al.*2001). L'accélération de la phagocytose sous l'effet de la CRP est également médiée indirectement par des fragments du complément opsonisants liés à des ligands de la CRP résultats de l'activation du complément initié par la CRP (Edwards K.M. *et al.* 1982).

La signification des propriétés opsonisantes de la CRP lors de la défense de l'organisme contre des infections bactériennes a été démontrée à l'aide de souris transgéniques pour la CRP humaine (hCRPtg). En effet, la CRP murine ne réagit pas de la même manière que la CRP humaine. Elle est exprimée très faiblement et n'augmente pas lors de la phase aigue

inflammatoire. Par conséquent, une souris exprimant de la CRP humaine transgénique lors d'une phase aigue inflammatoire inductible, peut être un bon modèle pour l'étude *in vivo* de cette protéine. Les souris hCRPtg infectées par *S. pneumoniae* éliminent la bactérie de la circulation sanguine plus efficacement et survivent plus longtemps par rapport aux animaux contrôle (Szalai A.J. *et al.* 1995). Des expériences de déplétion en complément ont démontré que le complément fournit le mécanisme majeur de la clairance bactérienne et de la protection de l'organisme médiée par la CRP bien qu'un effet direct de la CRP était aussi observé (Szalai A.J. *et al.* 1996). Il est possible également que les deux ligands CRP et C3b/iC3b agissent en synergie pour augmenter le processus de phagocytose. Cependant, la protection contre l'infection bactérienne n'est pas restreinte à *S. pneumoniae* puisque de récentes expériences ont démontré que la CRP protège les souris contre *Salmonella typhimurium*. Ces souris hCRPtg vivent plus longtemps avec une mortalité beaucoup plus faible que les souris contrôles. Le mécanisme d'action le plus important attribué à la CRP chez ces souris, provient de la clairance sanguine précoce et du nombre de bactéries diminué dans le foie et le pancréas (Szalai A.J. *et al.* 2000). Cependant, le spectre de protection bactérien couvert par la CRP n'a pas encore été défini. En plus des bactéries, la CRP augmente la phagocytose des cellules apoptotiques (Gershov D. *et al.* 2000). Cet effet dépend de l'action synergique de la CRP et du complément et peut devenir important en cas de prévention vis-à-vis des réponses auto-immunes par les constituants nucléaires des corps apoptotiques.

Au-delà de la phagocytose, l'interaction entre la CRP et les monocytes/macrophages a été rapportée pour induire une activité tumorocidale (Barna B.P. *et al.* 1987; Tebo J.M. and Mortensen R.F. 1991), accélérer le métabolisme oxydatif (Zeller J.M. *et al.* 1986), la production de peroxyde d'hydrogène (Tebo J.M. and Mortensen R.F. 1991) et la sécrétion d'IL-1 et TNFα (Galve-de Rochemonteix B. *et al.* 1993). Contrairement à ses effets exercés sur les monocytes/macrophages, la CRP apparaît atténuer l'activation des neutrophiles. Ainsi, la CRP inhibe la production de superoxyde induit par la PMA et la sécrétion granulaire (Buchta R. *et al.* 1988; Dobrinich R. and Spagnuolo P.J. 1991). Ces effets étaient corrélés avec une réduction significative de la phosphorylation des protéines intracellulaires. Les réponses chimiotactiques induites par IL-8, FMLP et C5a dans les neutrophiles sont également inhibées par la CRP (Kew R.R. *et al.* 1990; Zhong W. *et al.* 1998). Cette inhibition semble corrèler avec une réduction de l'activité p38 kinase induite par les peptides

chimiotactiques (Heuertz R.M. *et al.* 1999). De plus, la CRP est capable de provoquer le clivage et la perte de la L-selectine à la surface des neutrophiles réduisant ainsi l'adhésion aux cellules endothéliales et ralentissant la migration vers les tissus (Zouki C. *et al.* 1997). Enfin, la CRP médie également la perte du récepteur membranaire à l'IL-6 chez les neutrophiles, un effet qui pourrait moduler l'activité de cette cytokine (Jones S.A. *et al.* 1999). Ces effets de la CRP sur les neutrophiles corrèlent assez bien avec des études *in-vivo* sur des modèles d'animaux d'alvéolites. La CRP pouvait inhiber le développement de la maladie induite par C5a chez des lapins traités avec des injections de CRP aussi bien que chez des souris transgéniques pour la CRP lapine (Heuertz R.M. *et al.*1993; Heuertz R.M. *et al.*1994). Les données combinées des effets de la CRP sur les neutrophiles indiquent que la CRP sous-régule la réponse inflammatoire aigue. Enfin, et toujours en accord avec ces résultats, la protection exercée par la CRP vis-à-vis d'une endotoxémie létale chez des souris transgéniques pour la CRP lapine a été observée, bien que les mécanismes exacts expliquant cette protection restent encore inconnus (Xia D. and Samols D. 1997).

De nombreuses et récentes études montrent une association directe entre les niveaux sériques élevés de CRP et le risque de développer une maladie cardiovasculaire (Haverkate F. *et al.* 1997; Koenig W. *et al.* 1999; Ridker, P.M. *et al.* 2000; Rohde L.E. *et al.* 1999). D'autre part, de très fortes associations ont été démontrées entre les concentrations de CRP après un infarctus du myocarde et le devenir clinique à long terme (Tommasi S. *et al.* 1999) incluant le risque de mortalité (Lindahl B. *et al.* 2000; Nikfardjam M. *et al.* 2000). L'interprétation la plus simple de ces données a été de considérer la CRP comme un marqueur sensible de l'inflammation, processus connu pour être à la base de pathologies cardiovasculaires. Cependant, plusieurs rapports publiés ces dernières années, indiquent que la CRP n'est pas juste un marqueur d'une pathologie déjà existante, mais elle serait impliquée directement dans la pathogenèse des lésions athéroscléreuses (Torzewski M. *et al.* 2000; Zwaka T.P. *et al.* 2001) et/ou dans les dommages tissulaires qui accompagnent l'infarctus du myocarde aigu (Griselli M. *et al.* 1999).

2.6 Réceptorologie de la CRP

L'interprétation des résultats de la littérature sur la réceptorologie de la CRP doit tenir compte du fait que les informations sur les relations structures-fonctions des différentes isoformes de CRP n'ont pas toujours été prises en compte. Par ailleurs, dans les études anciennes, la CRPp (commerciale ou non) était probablement contaminée par de faibles concentrations d'immunoglobulines. De surcroît, la présence dans le milieu de culture de sérum, qui peut également contenir des immunoglobulines ou d'autres ligands de la CRP, rend l'interprétation des résultats sur les récepteurs de la CRP encore plus difficiles.

Ainsi, la réceptorologie de la CRP est depuis longtemps à l'étude et encore mal comprise. Les récepteurs de la CRP (CRP-Rs) sont présents sur de nombreux types de leucocytes : les neutrophiles polymorphonucléaires (Buchta R. *et al.* 1987; Muller H. and Fehr J. 1986), les monocytes circulants (ZellerJ.M. *et al.* 1986) et les lymphocytes (James K. *al.* 1981; Mortensen R.F. *et al.* 1975). Alors que quelques études ont mis en évidence des récepteurs spécifiques de la CRP sur des leucocytes (Tebo J.M. and Mortensen R.F. 1990; Zen Q. *et al.* 1997), d'autres expériences ont démontré une interaction entre la CRP et les récepteurs au Fc des immunoglobulines (Bharadwaj D. *et al.* 1999; Marnell L.L. *et al.* 1995). Le récepteur FcγRI de haute affinité pour les IgG était identifié comme étant un récepteur de faible affinité pour la CRP (Marnell L.L. *et al.* 1995), alors qu'ultérieurement le récepteur FcγRII de faible affinité pour les IgG était décrit comme le récepteur principal de la CRP (Bharadwaj D. *et al.* 1999). Deux variants alléliques de FcγRIIa exprimés de manière codominante et qui résultent en un changement d'acide aminé en position 131 (H/R) présentent des affinités différentes pour IgG_1 et IgG_2. Il a été rapporté que ces deux variants alléliques conférent des fixations différentes à la CRP sur les leucocytes (Stein M.P. *et al.* 2000). Chez les monocytes, la fixation de la CRP sur ces cellules exprimant FcγRIIa-131H/H était difficilement détectable alors qu'une fixation significative a été démontrée sur les FcγRIIa-131R/H et les FcγRIIa-131R/R. Cependant, les études initiales (Bharadwaj D. *et al.* 1999; Stein M.P. *et al.* 2000) utilisaient des anticorps anti-CRP afin de démontrer la fixation de la CRP à FcγRIIa. Il était suggéré que la détection de cette interaction résultait en réalité de l'interaction de la partie Fc des anticorps anti-CRP avec FcγRIIa lui-même (Saeland E. *et al.* 2001). Dans les expériences utilisant cette fois-ci des fragments F(ab) d'anticorps anti-CRP (clone CRP 8 Sigma), aucune

fixation de la CRP sur FcγRIIa-R131 n'a été détectée sur les leucocytes polymorphonucléaires et des cellules IIA.6 transfectées pour FcγRIIa.

D'autres auteurs ont proposé que l'observation faite à propos de la fixation de la CRP à FcγRIIa pouvait être due à une contamination par l'IgG de la solution de la CRP utilisée dans les études d'interaction (Hundt M. *et al.* 2001). Finalement, une fixation de la CRP à haute affinité dépendante de Ca^{2+} sur la partie extracellulaire de FcγRI a été démontrée récemment à l'aide d'une technique de résonance plasmique de surface (BIAcore système) (Bodman-Smith K.B. *et al.* 2002). Cette observation contredit les résultats précédents de Marnell et al. qui montrait une fixation de faible affinité de la CRP sur FcγRI expimé sur des cellules COS-7 (Marnell L.L. *et al.* 1995).

Ainsi, les données à propos des interactions directes de la CRP avec des récepteurs cellulaires restent encore confuses et la question d'un récepteur majeur cellulaire de la CRP n'a pas encore été résolue. En vue de l'importance que peut prendre la CRP dans la pathogenèse de l'athérosclérose, comme nous allons le décrire par la suite, l'identification d'un récepteur majeur de la CRP et son inhibition ou potentialisation par des moyens pharmaceutiques pourraient être un enjeu majeur dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2.7 Lien statistique entre la CRP, risque cardiovasculaire et athérosclérose

La CRP est considérée depuis longtemps comme un marqueur sensible de l'inflammation (Tillet W.S. and Francis T. 1930). Les études prospectives épidémiologiques réalisées ces dernières années, montrent que la CRP est un biomarqueur des risques cardiovasculaires (Danesh J. *et al.* 1998; Folsom A.R. *et al.* 2002; Haidari M. *et al.*. 2001; Koenig W. *al.* 1999; Speidl W.S. *et al.* 2002). Si les sujets sont à la fois dans le quintile supérieur des concentrations plasmatiques de CRP et du ratio cholestérol total / cholestérol-HDL, leur risque de développer une pathologie cardiovasculaire est augmenté par un facteur de 8 à 9 (Rifai N. and Ridker P.M. 2001) (**Figure 11**). Récemment, les données issues d'une étude faite sur une large population (Women's Health Study) ont révélé que les plus mauvais taux de survie des femmes corrélaient avec les concentrations plasmatiques de la CRP appartenant au quintile supérieur en comparaison avec le quintile supérieur des valeurs plasmatiques de LDL cholestérol (Ridker P.M. *et al.* 2002) (**Figure 12**).

(A) HOMME (B) FEMME

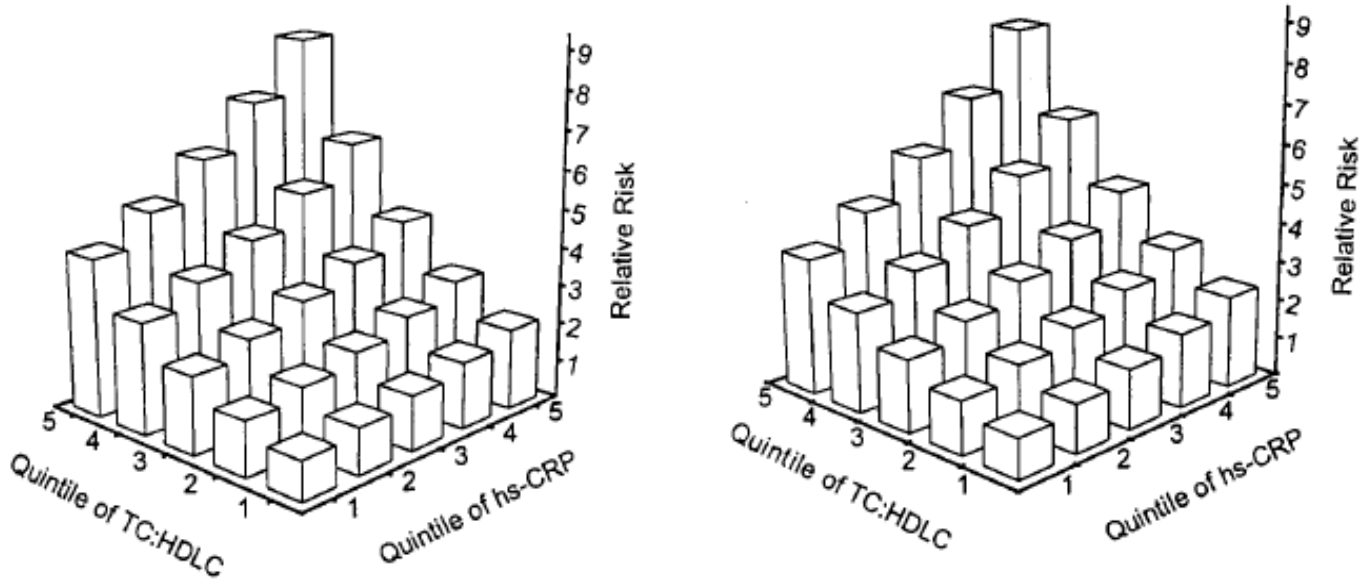


Figure 11 : *Risques relatifs de manifester un premier symptôme de pathologie coronarienne parmi les hommes (A) et les femmes (B) en bonne santé en fonction de leurs concentrations en CRP et de leurs ratios TC/HDL-C*

TC signifie cholestérol total et HDL-C le cholestérol-HDL (Ridker P.M. *et al.* 1997; Ridker P.M *et al. et al.* 2000).

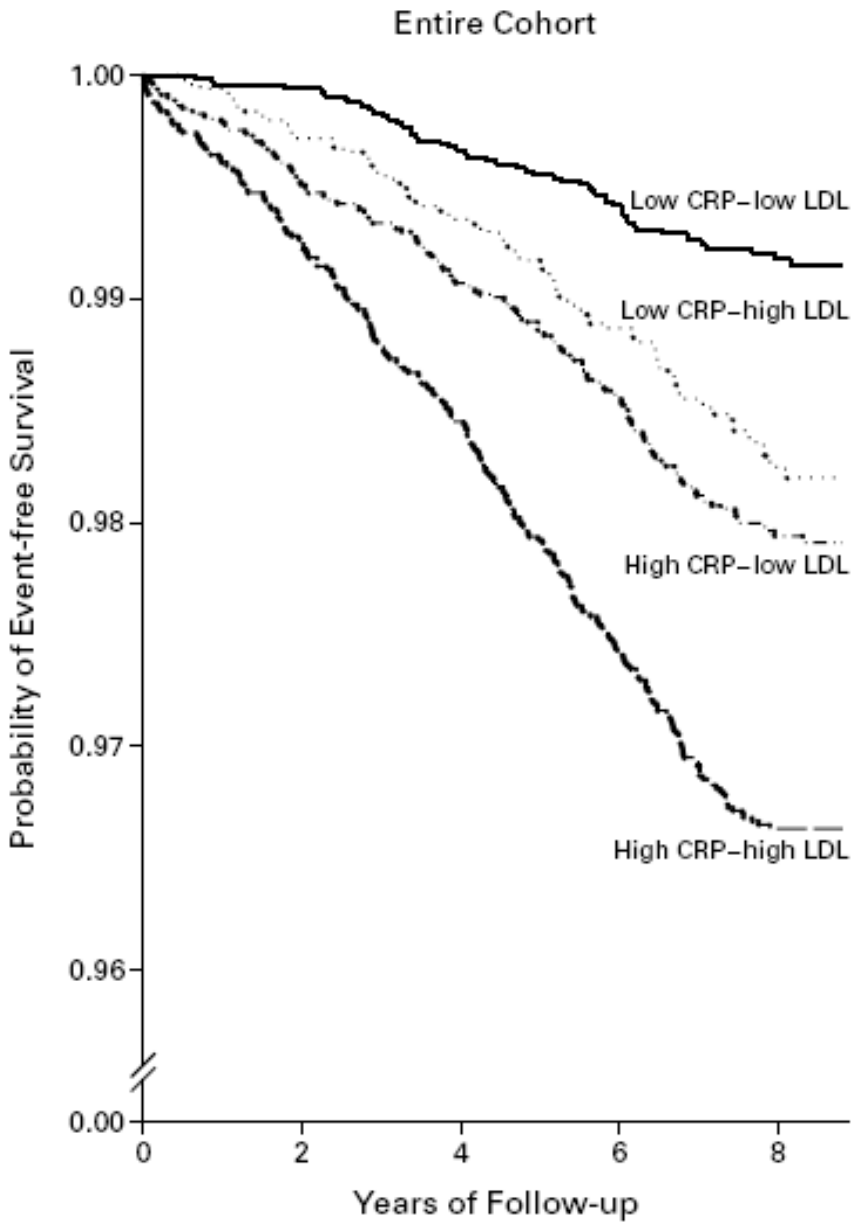


Figure 12 : *Probabilité de survie sans risque de développer une pathologie cardiovasculaire au cours du temps chez les femmes (n=15745) en fonction de leurs concentrations de CRP et de cholestérol-LDL*

Les valeurs médianes sont les suivantes : CRP = 1.52 mg/ml et cholestérol-LDL = 1.237 g/l (Ridker P.M. *et al.* 2002).

Les femmes appartenant au sous-groupe « CRP élevée – LDL bas » ont plus de risque de développer une pathologie cardiovasculaire que celles du sous-groupe « CRP bas – LDL élevé ». Ces données suggèrent donc que le niveau plasmatique de la CRP est un paramètre prédictif plus puissant que les valeurs de LDL cholestérol.

De tous les syndromes cliniques associés aux concentrations de la CRP, l'angine de poitrine instable (« angor instable »), qui est une douleur intermittente consécutive à l'apparition de l'ischémie myocardique, reste l'un des syndromes les plus informatifs existants (Liuzzo G. *et al.* 1994). En effet, dans ce cas clinique, les concentrations mesurées de CRP partagent les patients en deux groupes, ceux à risque élevé et ceux à faible risque. Les patients qui présentent des symptômes d'angine de poitrine instable et éventuellement un risque d'infarctus du myocarde > 90% ont des concentrations de CRP élevées. Ainsi, les sujets en angor instable avec des concentrations de CRP les plus élevées nécessitant en général une revascularisation, développent plus facilement une thrombose coronarienne ou meurent suite à un événement cardiovasculaire. Malheureusement, les syndromes coronariens aigus démontrent également la difficulté d'utiliser la CRP comme marqueur clinique. En effet, dans les infarctus du myocarde non attendus, moins de 50 % des patients ont des niveaux de CRP élevés, et dans la phase aigue, les niveaux de CRP ne permettent pas d'identifier de manière efficace les patients avec un infarctus du myocarde causé par une thrombose intra coronarienne.
En conclusion, un consensus international établit la CRP comme l'un des marqueurs les plus utilisés cliniquement pour stratifier les patients à risque modéré (défini par le score de risque Framingham) pour des complications futures de l'athérosclérose (**Figure 13)**.

Au-delà des patients présentant un risque modéré pour des évènements cardiovasculaires, la CRP peut éventuellement jouer un rôle clinique dans la stratification du risque chez les patients dialysés. En effet, la maladie cardiovasculaire reste la cause la plus importante de mortalité chez ce groupe de patients. Ainsi, un niveau élevé de CRP (>8 mg/L) chez une personne dialysée sans symptômes ischémiques, prédit une mortalité de 70 % dans les trois ans à venir (deFilippi C. *et al.* 2003). Un tel niveau de mortalité suggère que la CRP chez les patients dialysés devrait être considérée comme un marqueur de risque essentiel comparé à d'autres paramètres cliniques et biologiques.

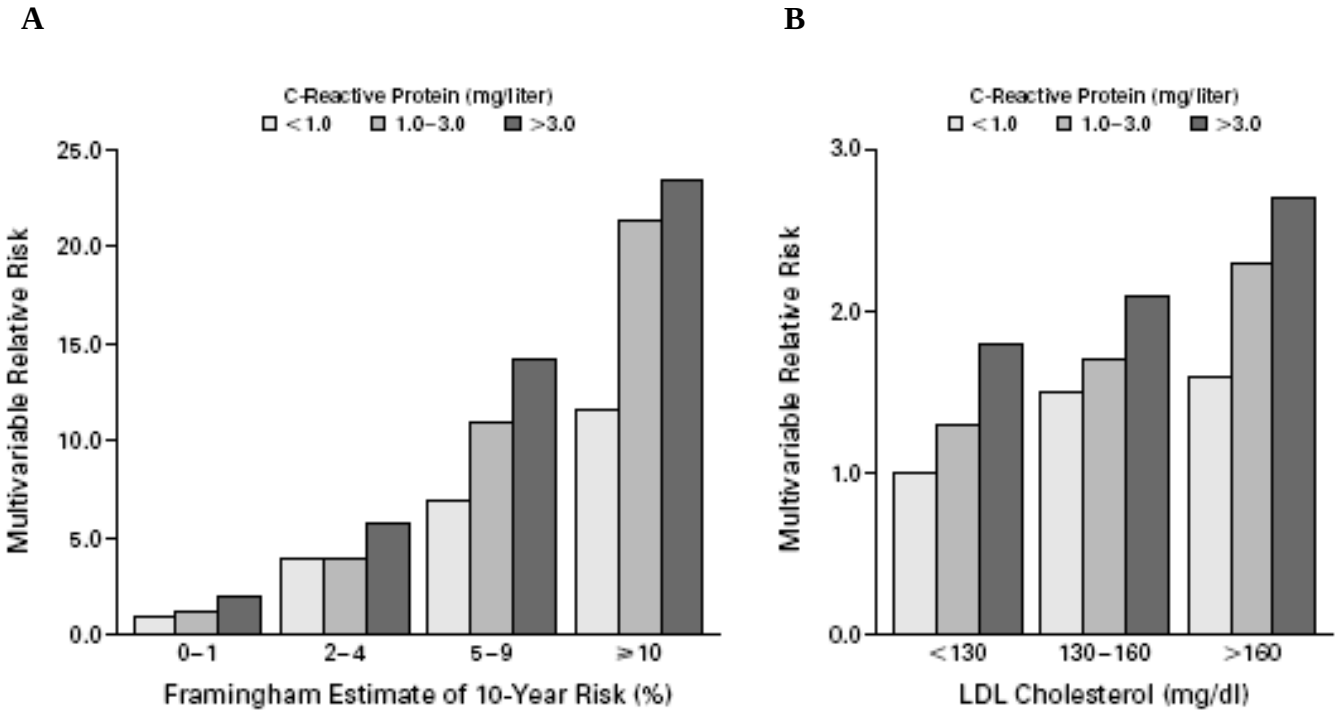


Figure 13 : *Risques relatifs de développer une maladie cardiovasculaire ajustés à des multivariables en fonction des concentrations de CRP et du risque estimé sur 10 ans basés sur le score de risque Framingham*

A : Risque relatif en fonction d'une période donnée et de la concentration de CRP mesurée (< 1.0 mg/l, entre 1.0 et 3.0 mg/l ou > 3.0 mg/l) ***B*** : Risque relatif en fonction de la concentration de cholestérol-LDL (< 1.3 g/l, entre 1.3 et 1.6 g/l ou > 1.6 g/l) et la concentration de CRP mesurée (< 1.0 mg/l, entre 1.0 et 3.0 mg/l ou > 3.0 mg/l) (Ridker P.M. *et al.* 2002).

De manière similaire, chez les sujets qui ont subi une transplantation cardiaque, les concentrations de CRP sont corrélées avec le syndrome de la maladie artérielle coronarienne associée à une transplantation, cause majeure de l'échec de la transplantation (Eisenberg M.S. *et al.* 2000). Alors que ce syndrome est cliniquement et pathologiquement distinct de l'athérosclérose, les concentrations de CRP élevées (> 7.2 mg/L) sont associées au développement de l'athérosclérose dans les artères du cœur transplanté (sans évidence d'un rejet tissulaire). Il faut noter qu'aucun autre test sérologique n'a ce pouvoir prédictif sur le développement de l'athérosclérose liée à une greffe. D'autre part, la CRP corrèle étroitement avec les niveaux sériques d'ICAM-1, marqueur de l'activation endothéliale et les facteurs cliniques qui mènent à l'activation endothéliale (Labarrere C.A. *et al.* 2002). Vu les associations cliniques entre la CRP et l'athérosclérose, tout laisse à croire que la CRP n'est pas juste un marqueur de risque mais également un acteur ou facteur de risques intimement impliqué dans la pathogenèse de l'athérosclérose comme l'indiquent de nombreuses données fondamentales. Plus d'une douzaine d'études de populations ont démontré que les niveaux de CRP pouvaient prédire un risque cardiovasculaire futur **(Figure 14)**.

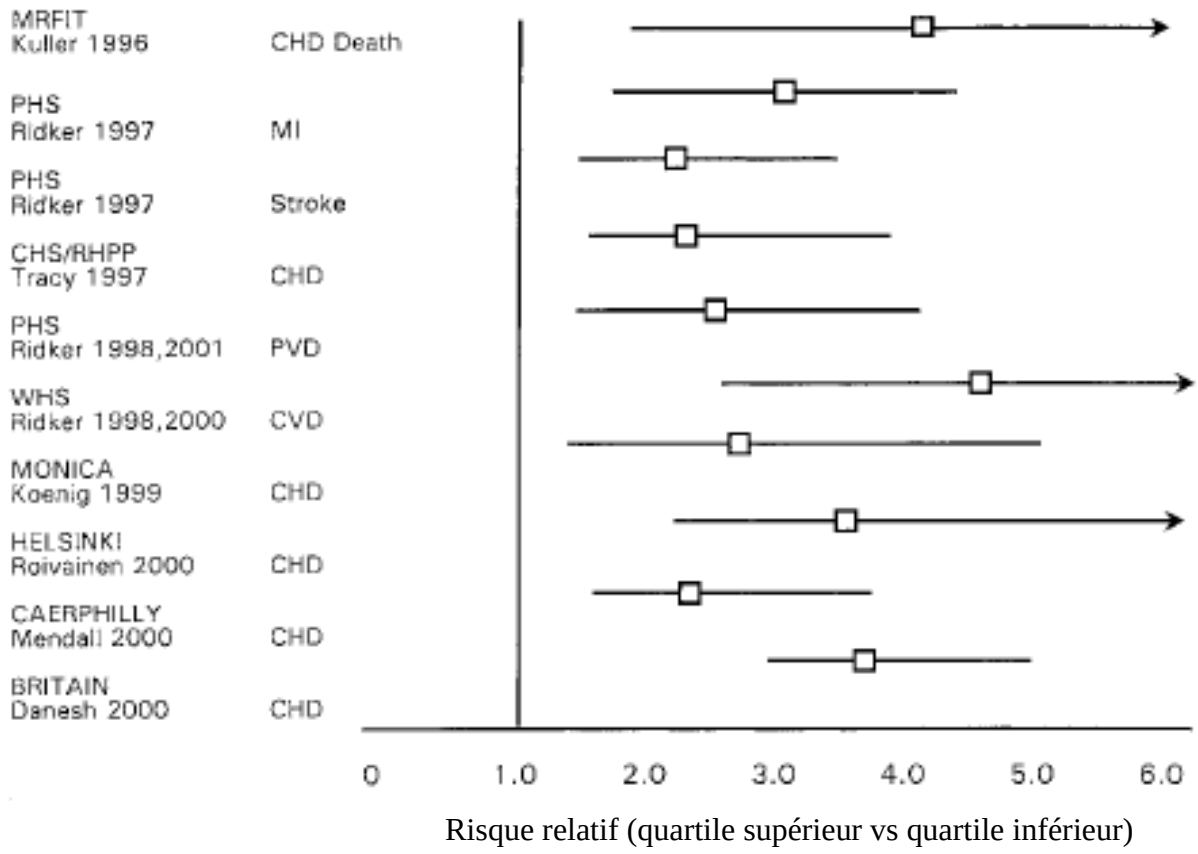


Figure 14 : *Etudes prospectives des taux de CRP comme facteur de risque de développer des maladies vasculaires*

Plusieurs pathologies cardiovasculaires ont été prises en compte, dont le CHD (maladies cardiaques coronariennes), athérome diffus des artères des membres inférieurs ou PVD (maladie vasculaire périphérique), CVD (maladies cardiovasculaires), MI (infarctus du myocarde) et accident vasculaire cérébral ischémique (Libby P. *et al.*2002).

2.8 Lien causal entre la CRP et l'athérosclérose

Des preuves évidentes soulignant le rôle de la CRP dans l'athérogenèse ne cessent de s'accumuler depuis quelques années, mais il est encore difficile d'attribuer des fonctions spécifiques à la CRP car son action va dépendre aussi bien du type cellulaire avec lequel elle va interagir que la forme ou la structure sous laquelle elle se présentera.

2.8.1 La CRP et la plaque athéroscléreuse

En 1985 et pour la première fois, a été mis en évidence la présence de la CRP dans les lésions athéroscléreuses (Vlaicu R. *et al.* 1985). En effet, elle a été extraite et quantifiée à partir de l'intima aortique humain athéroscléreux. Mais, lors de la tentative par Rowe et al. (Rowe I.F. *et al.* 1985) de localiser la CRP dans des lésions athéroscléreuses, aucune CRP n'a pu être mise en évidence. Au contraire, deux autres équipes ont montré la présence de CRP dans des lésions athéroscléreuses d'aortes humaines et localisé la CRP autour de cellules graisseuses, dans la couche fibroélastique et la couche fibromusculaire adjacent à la média (Hatanaka K. *et al.* 1995; Reynolds G.D. and Vance R.P. 1987).

L'équipe de Jan Torzewski a mis en évidence pour la première fois en 1998 la colocalisation de la CRP avec le fragment C5b-9 du complément par marquage immunohistochimique dans une quinzaine de lésions athéroscléreuses précoces (lésions initiales) et plus tardives, présentes dans des artères coronaires humaines. Un dépôt diffus plutôt que focal de la CRP était détecté dans la couche fibroélastique et fibromusculaire de l'intima adjacent à la média. La colocalisation de la CRP avec le complexe terminal du complément soutenait l'hypothèse que la CRP pouvait induire un processus inflammatoire chronique en activant le complément dans la paroi artérielle (Torzewski J. *et al.* 1998). D'autre part, la majorité des cellules graisseuses sous la paroi endothéliale montrait un marquage positif de la CRP mais aucune colocalisation avec les protéines du complément n'a été mise en évidence. Ces données suggèrent que la CRP peut promouvoir la formation de lésions athéroscléreuses en activant le système du complément et être impliqué dans la formation des cellules graisseuses.

Le rôle potentiel de la CRP dans le recrutement du monocyte vers la paroi artérielle a également été étudié (Torzewski M. *et al.* 2000). L'analyse immunohistochimique de lésions athéroscléreuses naissantes a montré que le dépôt de la CRP dans la paroi artérielle précédait l'infiltration monocytaire et que la CRP était chimiotactique pour les monocytes humains. Les récepteurs spécifiques de la CRP (CRP-R) ont été également mis en évidence dans les monocytes infiltrants et les cellules graisseuses. Puisque les cellules graisseuses marquent positivement en fluorescence aussi bien pour la CRP que son récepteur spécifique (CRP-R), la CRP pourrait participer à la formation des cellules spumeuses en opsonisant les particules lipidiques. La colocalisation de la CRP avec des LDL dégradés de manière enzymatique (E-LDL) (Bhakdi S. *et al.* 1995; Seifert P.S. *et al.* 1990; Torzewski M. *et al.* 1998) a été démontrée dans des lésions athéroscléreuses précoces (Bhakdi S. *et al.* 2004).

Récemment, l'analyse quantitative de l'ARNm en RT-PCR a révélé l'augmentation de la CRP de 10 fois dans le tissus artériel aortique athéromateux par rapport à un tissus artériel normal (Yasojima K. *et al.* 2001). L'hybridation *in situ* avec une amorce anti-sens pour la CRP et le fragment C4 a permis d'identifier les cellules musculaires lisses et les macrophages tissulaires comme la source de cette production.

Les études *in-vivo* effectuées sur des souris déficientes en apolipoprotéines E (Apo E-/-) (qui développent spontanément une hypercholestérolémie et des lésions artérielles (Zhang S.H. *et al.* 1992) et surexprimant la CRP humaine transgénique ont montré que la CRP humaine accélérait la progression des lésions athéroscléreuses aortiques (Paul A. *et al.* 2004). Cette progression était accompagnée d'une augmentation de la CRP et du fragment C3 du complément dans les lésions athéroscléreuses suggérant une activation du complément par la CRP.

La formation de la plaque athéroscléreuse fait intervenir une multitude de partenaires cellulaires et moléculaires. De nombreuses études axées sur les effets de la CRP avec les cellules de la paroi vasculaire, ont été menées ces dernières années aboutissant à de nouvelles hypothèses sur le rôle de la CRP.

2.8.2 Interaction avec les cellules et les composants de la paroi artérielle

2.8.2.1 Les cellules musculaires lisses

Le rôle des cellules musculaires lisses (CML) dans l'athérogenèse est de mieux en mieux documenté. La fonction majeure des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle est d'assurer le tonus vasculaire grâce à leurs propriétés contractiles et élastiques. Les cellules musculaires humaines exposées à la CRP voient l'expression génique et protéique pour le récepteur à l'angiotensine 1 augmentée ainsi que leurs prolifération et migration (Wang C.H. *et al.* 2003). En effet, les effets *in-vivo* de la CRP sur les CML après un dommage vasculaire passent par une prolifération et une migration accrues des CML, accompagnés de la production de protéines matricielles dans le neo-intima. En accord avec ces données, la CRP peut activer des protéines kinases intra-cellulaires responsables du processus de prolifération. D'autre part, la CRP augmente l'expression de la NO synthase inductible (NOS2) conduisant à l'augmentation locale du NO, du stress oxydatif et par conséquent de l'inflammation (Hattori Y. *et al.* 2003). Enfin, dans un plan plus intégratif, Sternik *et al*. ont démontré que la CRP pouvait induire la relaxation de vaisseaux humains indépendamment de l'endothélium (Sternik L. *et al.* 2002). Cette vasorelaxation induite par la CRP est atténuée lorsque des inhibiteurs des canaux ioniques au potassium sont utilisés. Ceci suggère donc, que la CRP peut exercer un effet relaxant sur les CML via les canaux ioniques K. Il est à noter qu'à ce jour, aucun récepteur de la CRP n'a été retrouvé sur les CML.

Une autre caractéristique émergente de la biologie liée à la CRP est la production locale de la CRP dans la paroi artérielle. En effet, les données *in-vitro* indiquent que la combinaison des cytokines pro inflammatoires IL-1β et IL-6 stimule la production de la CRP dans les cellules musculaires lisses. Il faut noter que le LPS et le TNFα ont des effets similaires (Calabro P. *et al.* 2003). Longtemps considéré comme de simples éléments contractiles et structurants de la paroi artérielle, les CML peuvent être responsables du développement de l'inflammation par leur prolifération et migration dans l'espace sous-endothélial. Ces cellules, probablement l'une des sources les plus importantes de cytokines pro-inflammatoires, sont critiques au processus complexe de l'athérogenèse.

2.8.2.2 Les LDL

Les LDL sont des lipoprotéines, qui à fortes concentrations, jouent un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose. Les données thérapeutiques issues des essais effectués avec ou sans statines ont démontré le lien causal direct existant entre les LDL et l'athérosclérose. Cependant, les mécanismes grâce auxquels les LDL provoquent ces effets restent encore en étude. L'interaction de la CRP avec les LDL peut partiellement éclairer ces mécanismes d'action qui induisent cette pathologie cardiovasculaire.

Les LDL n'existent pas seulement sous leur forme native dans la paroi vasculaire. En effet, des enzymes présentes dans la paroi vasculaire peuvent modifier la structure des LDL (E-LDL), telles que la trypsine, le cholestérol estérase et la neuraminidase. Les E-LDL sont présents en grandes quantités avec les LDL oxydés, dans les plaques athérosclérotiques. La modification enzymatique des LDL donne aux E-LDL la capacité de fixer la CRP. Le complexe E-LDL-CRP voit alors sa capacité augmentée de convertir le facteur C3 et d'activer le complément. Dans des conditions acides retrouvées au sein des plaques, la capacité du complexe E-LDL-CRP à convertir C3 est largement accrue (Bhakdi S. *et al.*1999).

D'autre part, la pré incubation de la CRP avec la phosphatidylcholine empêche la fixation des E-LDL sur la CRP, ce qui suggère que les E-LDL interagissent avec la CRP au niveau du même site de reconnaissance que les ligands provenant des microorganismes. Une des caractéristiques importantes de cette interaction est que l'avidité de fixation des E-LDL est proportionnelle à la quantité de cholestérol non estérifié à la surface des particules de LDL (Taskinen S. *et al.*2002). Ceci est la première démonstration que le cholestérol peut se fixer à la CRP, ce qui fournit un mécanisme expliquant la rétention de la CRP au sein de la plaque athéroscléreuse et dans l'interaction avec les LDL.

2.8.2.3 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales, considérées comme des «gardiens» de la paroi vasculaire artérielle, sont à la base de la plupart des événements précoces de l'athérosclérose. Le développement des plaques athéroscléreuses fait suite à plusieurs perturbations de l'endothélium, au niveau du futur site de développement de la plaque, incluant la perte de

vasoréactivité, l'expression de molécules d'adhésion et la sécrétion de molécules chémoattractantes. Les modèles de cultures tissulaires utilisant des monocouches endothéliales suggèrent que la CRP entraîne exactement les mêmes types de perturbations.
La capacité vasodilatatrice d'une artère est un outil clinique utilisé pour évaluer « la santé vasculaire ». Il est probable que l'un des changements les plus précoces détectable dans une artère avant la formation de la plaque est la perte de la vasodilatation médiée par le NO (Ikonomidis I. *et al.* 1999). Or, les données *in vitro* montrent que la CRP diminue l'expression de eNOS dans les cellules endothéliales ainsi que la production du NO et de la cGMP (Venugopal S.K. *et al.* 2002). D'un point de vue clinique, les concentrations de CRP mesurés chez les patients corrèlent étroitement avec la perte de vasodilatation médiée par le NO ce qui appuie les résultats expérimentaux obtenus *in-vitro* (Cleland S.J. *et al.* 2000). D'autre part, la CRP *in-vitro* inhibe la fonction endothéliale à participer à l'angiogenèse (Verma S. *et al.* 2002).

Le traitement des cellules endothéliales par la CRP à des concentrations variant de 5 à 50 mg/L augmente l'expression des molécules d'adhésion E-selectin, ICAM-1 et VCAM-1. L'incubation à long terme (>24 heures) induit l'expression aux niveaux les plus élevés de ces molécules. Cette observation était sérum dépendante et non médiée par les LDL (Pasceri V. *et al.* 2000), même si le cofacteur sérique n'a pas encore été identifié.

Quand les monocytes activés par la CRP interagissent avec une monocouche endothéliale, l'expression de molécules d'adhésion au monocyte augmente sur la cellule endothéliale, en particulier CD31 et CD11b. Alors que cet effet conduit à une augmentation de l'adhérence, il n'est pas suivi d'une augmentation de la migration à travers la couche endothéliale (Woollard K.J. *et al.*. 2002). Le traitement des cellules endothéliales à la CRP induit également un phénotype pro-thrombotique avec l'augmentation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) qui est l'inhibiteur principal de la fibrinolyse. Cet effet est indépendant de l'endothéline, du NO ou de l'IL-6 (Venugopal S.K. *et al.* 2002). D'autre part, la CRP diminue le relarguage de la prostacycline (PGI_2) en inactivant la prostaglandine I synthase. L'absence du récepteur à la prostacycline accélère l'athérosclérose et la thrombose (Smyth E.M. and FitzGerald G.A. 2002). Enfin, cette activité procoagulante attribuable à la CRP est confirmée chez la souris transgénique pour la CRP humaine. En effet, les auteurs ont

mis en évidence une corrélation étroite entre les concentrations de CRP élevées et un phénotype prothrombotique après lésion artérielle (Danenberg H.D. *et al.* 2003).

L'une des étapes clés lors de l'athérogenèse reste le recrutement du monocyte à l'intérieur de la paroi vasculaire. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), un puissant chémoattractant monocytaire, est le médiateur clé de cette étape dans l'athérogenèse. La déficience en MCP-1 ou de son récepteur CCR-2 inhibe le développement des plaques athéroscléreuses chez les souris hypercholestérolémiques (Gosling J. *et al.* 1999; Guo J. *et al.* 2003) alors que les cellules endothéliales exposées à la CRP augmentent leur production de MCP-1 d'un facteur 5 à 10 (Pasceri V *et al.* 2001).

L'étroite relation entre la CRP et l'IL-6 est confirmée par les données cliniques qui suggèrent que les concentrations sériques d'IL-6 et de la CRP sont liées et associées à l'athérogenèse (Ridker P.M. *et al.* 2000; Ridker P.M. *et al.* 2000). Chez les souris atteintes d'hypercholestérolémie responsable de l'athérosclérose, le traitement par l'IL-6 augmente de manière dramatique son développement (Huber S.A. *et al.* 1999). Cependant, les cellules endothéliales exposées à 25 mg/L de CRP augmentent leur sécrétion d'IL-6 et de l'endothéline-1 plus de 5 fois. Un antagoniste du récepteur à l'IL-6 inhibe la production de MCP-1 et l'expression de molécules d'adhésion (Verma S. *et al.* 2002). Ainsi, ces données suggèrent fortement que la CRP circulante ou locale peut induire la sécrétion d'IL-6 dans les cellules endothéliales. L'IL-6 et la CRP collaborent pour induire des changements locaux au sein de l'endothélium et mener un rétrocontrôle positif qui amplifie la production hépatique de la CRP et l'inflammation systémique.

Une étude récente démontre que la CRP exerce un effet délétère sur la survie, la différentiation et la fonction des cellules pro-génitrices des cellules endothéliales, ayant pour conséquence des effets négatifs sur la réparation des vaisseaux et sur la néo vascularisation des tissus ischémiques (Verma S. *et al.* 2004).

Bien que de nombreuses études soulignent un rôle plutôt pro athérogénique de la CRP sur la cellule endothéliale, Verma et son équipe ont mis en évidence une sur-expression de la protéine DAF (decay accelerating factor) qui est inhibitrice du complément. En effet, elle se

fixe aux fragments C3b et C4b du complément et facilite leur dégradation. Or, la voie classique du complément peut-être activée par la CRP fixée aux E-LDL (Bhakdi S. *et al.* 1999). Il semble donc que les effets de la CRP sont à la fois pro- et anti-athérogéniques.

Afin d'éclaircir les fonctions potentielles de la CRP sur la cellule endothéliale, et par conséquent émettre de nouvelles hypothèses, l'analyse du transcriptome de cellules endothéliales exposées à la CRP recombinante a été effectuée. La plupart des gènes surexprimés sont impliqués dans le remodelage vasculaire et l'athérogenèse alors que la majorité des gènes sous-exprimés sont impliqués dans la croissance tumorale et l'invasion tissulaire. Le gène le plus exprimé est celui codant pour l'IL-8, précédemment détecté dans les lésions athéroscléreuses humaines (Koch A.E. *et al.* 1993). L'IL-8 est essentiel au roulement et à l'adhésion définitive du monocyte sanguin circulant sur la cellule endothéliale qui est une étape clé de l'athérogenèse (Gerszten R.E. *et al.* 1999). L'effet exercé par la CRP recombinante sur l'expression génique endothéliale passe par la voie de signalisation MEK/ERK.

La CRP humaine recombinante, à des concentrations connues pour prédire une maladie cardiovasculaire, est responsable d'une multitude d'effets sur la biologie endothéliale favorisant alors un phénotype pro-inflammatoire et pro-atherosclérotique. Cependant, il a été montré également que la CRP pouvait réguler des protéines inhibitrices du complément et protéger les cellules endothéliales d'un endommagement cellulaire médié par le complément (Li S.H. *et al.* 2004). Cela suggère donc qu'une balance proathérogénique et antiathérogénique des effets de la CRP sur la paroi vasculaire joue sur le développement de l'athérosclérose.

2.8.3 Interactions avec les cellules circulantes et les composants du sang périphérique

2.8.3.1 Les monocytes

Alors que les cellules endothéliales sont considérées comme les « gardiennes » de l'intégrité de la paroi artérielle en régulant le trafic cellulaire à travers l'espace sous endothélial, les monocytes sanguins sont les premières cellules requises dans le développement de la plaque

athéroscléreuse. En effet, après activation de l'endothélium, les monocytes circulants ralentissent aux abords de la cellule endothéliale pour venir « rouler » sur elle. Par un processus de diapédèse, le monocyte migre à travers l'endothélium dans la région sous endothéliale de l'artère. Le monocyte se différencie alors en macrophage tissulaire.
Mieux comprendre l'interaction de la CRP avec ces deux types cellulaires est essentiel afin de montrer que la CRP est une cause première de l'athérosclérose. Alors que la CRP entraîne indirectement l'accumulation des monocytes en sur-exprimant des récepteurs d'adhésion aux cellules endothéliales ainsi que la molécule chimioattractante MCP-1, la CRP agit aussi directement sur les monocytes à chaque stade de la formation de la plaque athéroscléreuse (Pasceri V. *et al.* 2001).

L'examen histologique d'artères coronaires humaines a confirmé la présence de la CRP dans la couche fibro-élastique de l'artère à la fois dans des plaques athéroscléreuses précoces et d'autres à des stades plus avancés. Le marquage de la CRP, permet de la localiser avec les monocytes-macrophages surtout dans les lésions avancées (Torzewski M. *et al.* 2000). Les études *in vitro* suggèrent que cette colocalisation n'est pas qu'une coincidence. Alors que la fixation de la CRP sur les récepteurs Fc aux immunoglobulines est assez bien acceptée, des données récentes ont montré l'existence d'un récepteur de surface unique pour la CRP (Zhong W. *et al.* 1998).

Dans les monocytes humains fraîchement isolés, la CRP soluble induit une migration chimiotactique importante. Cette migration est bloquée si les monocytes sont préincubés auparavant avec la CRP ou des anticorps anti CRP-R. Ces mêmes monocytes sanguins périphériques, qui présentent alors à leur surface la CRP, circulent à l'intérieur de la paroi vasculaire (Torzewski M. *et al.* 2000).

En conditions inflammatoires aigues, au niveau du site de l'infection, la fixation de la CRP sur des ligands bactériens entraîne l'opsonisation du pathogène, le « cross-link » des cellules phagocytaires répondantes et le développement de la phagocytose (Mold C. *et al.* 2001). *In vitro*, les ligands de la CRP peuvent être de différentes natures, des lipoprotéines contenant l'apoB, LDL, VLDL ou des sites de fixation à la PCh Ca^{2+} dépendant (Cabana V.G. *et al.*1982; de Beer F.C. *et al.* 1982). Il est fortement probable que la préincubation des LDL *in vitro* avec la CRP induise les macrophages dérivés des monocytes à phagocyter les LDL et à

devenir des cellules graisseuses (Zwaka T.P. *et al.*2001). Il s'agit du lien critique entre le monocyte circulant en cours d'adhésion et la cellule phagocytaire mature (macrophage) retrouvée dans l'espace sous-endothélial.

Comme angiogenèse et monocyte sont impliqués dans la pathophysiologie de l'athérosclérose, notre équipe a étudiée si les cellules THP1 exposées à la CRP pouvaient augmenter la production de VEGF-A, un facteur angogiénique puissant, souvent retrouvé au niveau des lésions athéroscléreuses. Nos résultats ont montré que la CRP pouvait être pro-angiogénique puisqu'elle stimule l'expression de l'ARNm et l'excrétion de VEGF-A chez les cellules THP-1. Cette sur-régulation est dépendante des voies d'activation PI3-kinase et ERK 1/2 (Bello G. *et al.* 2008).

Au moment de la rupture de la plaque, la coagulation est un facteur critique. Dans la phase aigue, si le rôle des plaquettes et du système de coagulation humoral est essentiel, les monocytes circulants, cependant, jouent un rôle critique dans l'athérothrombose. Les monocytes qui adhèrent à un caillot sanguin en développement inhibent la fibrinolyse, secrètent le facteur tissulaire et fournissent la surface lipidique pour l'activation de la cascade de la coagulation. Le facteur tissulaire dérivé du monocyte et le PAI-1 sont des facteurs centraux dans ce processus. Les monocytes sanguins périphériques humains traités avec la CRP augmentent leur expression du facteur tissulaire d'environ 35 fois et l'addition de l'IFN γ double cette réponse (Cermak J. *et al.* 1993; Nakagomi A. *et al. et al.*2000). Ces données peuvent expliquer l'association des concentrations élevées de la CRP et l'état clinique instable de patients souffrant entre autre de maladies vasculaires, lors de la phase aigue.

2.8.3.2 Les neutrophiles

Parmi les composants cellulaires de la phase aigue de l'inflammation, les neutrophiles sont parmi les premières cellules leucocytaires à migrer dans les tissus envahis par des pathogènes ou initiateurs du traumatisme inflammatoire. Il a été démontré que la CRP native inhibe la chimiotaxie des neutrophiles (Ahmed N. *et al.* 1996; Heuertz R.M. *et al.* 1994). Si la CRP native semble interagir avec le récepteur CD32 à la surface des neutrophiles (Stein M.P. *et al.* 2000), les formes altérées ou modifiées de la CRP interagiraient avec le récepteur CD16 conduisant à la désensibilisation du récepteur fMLP, responsable de la chimiotaxie des

neutrophiles vers le site inflammatoire (Heuertz R.M. *et al.* 2005). Ces données sont confirmées par l'étude de Khreiss et al. effectuée sur des plaquettes sanguines et neutrophiles en présence de différentes isoformes de la CRP (Khreiss T. *et al.* 2004b). La CRP native inhibe l'activation plaquettaire et empêche la capture plaquettaire par les neutrophiles, alors que la CRP monomérique présente des activités pro thrombotiques puissantes. La perte de la symétrie pentamérique de la CRP, résultant en la formation de CRP monomérique, conduit à la sécrétion d'IL-8 chez les neutrophiles via l'activation de NFkB et de AP-1 (Khreiss T. *et al.* 2005).

2.8.3.3 Le complément

Alors que l'activation du complément est reconnue aujourd'hui pour jouer un rôle important dans les dommages aigus tissulaires, son rôle dans l'état inflammatoire chronique observé dans l'athérosclérose est moins clair. Des facteurs de la cascade du complément, dans sa phase initiale, ont été en premier identifiés dans des lésions athéroscléreuses vasculaires avancées (pour la plupart une vingtaine d'années) (Hansson G.K. *et al.* 1984). Plus récemment, des composants tardifs de la cascade du complément, responsables des dommages tissulaires, ont été identifiés dans des plaques athéroscléreuses précoces (Torzewski M. *et al.* 1998). Ces composants co-existaient avec la CRP. Les cellules inflammatoires, en présence de chaque composant de la voie classique d'activation du complément et de la CRP, reflètent la présence d'une maladie artérielle localisée (Yasojima K. *et al.* 2001).

L'un des premiers rôles physiologiques identifiés pour la CRP est sa capacité à activer la voie du complément. Quand un ligand se fixe à une sous-unité de la CRP, cela induit un changement structural de la CRP, révélant une fente dans le côté opposé de cette sous-unité (Agrawal A. *et al.* 2001). Cette fissure fixe efficacement le C1q, l'active directement ainsi que la cascade classique du complément. Cette capacité de la CRP à activer le complément est accrue en présence de membrane cellulaire modifiée par des radicaux libres *in vitro* (Klegeris A. *et al.* 2002). Ces données suggèrent qu'au niveau de sites inflammatoires dans les tissus, ce mécanisme soit essentiel dans l'activation du complément.

3. Le monocyte, cellule clé de l'immunité et de l'athérogenèse

Les monocytes font partis du système des phagocytes mononuclées: ils proviennent de progéniteurs et de précurseurs médullaires, sont présents dans le sang pendant 1 à 2 jours, puis migrent dans les tissus où ils vont vivre plusieurs mois après s'être transformés en histiocytes à fonction macrophagique et immunitaire.

3.1 La monocytopoïese

Elle débute par des progéniteurs très indifférenciés nommés CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocytaire, Erythroblastique, Mégacaryocytaire et Monocytaire) qui, sous l'influence de diverses cytokines (SCF, FLT3-L, GM-CSF, IL-3), vont donner naissance à des progéniteurs plus différenciés (Fogg D.K. *et al*. 2006). Ces progéniteurs myéloïdes plus différenciés appelés CFU-GM (Granulocytaire et monocytaire), vont proliférer en présence d'IL-3 et de GM-CSF (Granulocyte Monocyte - CSF). Ensuite, la présence supplémentaire de G-CSF stimule l'orientation vers les CFU-G donnant ainsi naissance à la lignée neutrophile, alors que la présence supplémentaire de M-CSF favorise la différenciation vers les progéniteurs CFU-M puis vers les précurseurs monocytaires. Le temps de différenciation des CFU-GEMM en monocytes médullaires est d'environ 4 à 5 jours.

Le monocyte médullaire réside dans la moelle osseuse 1 journée puis migre dans le sang périphérique où il circule 1 à 4 jours avant de quitter les capillaires (diapédèse active) pour se localiser dans les tissus de l'organisme. Il se transforme en histiocyte, à fonction macrophage et immune, et a une durée de vie de 3 mois à 3 ans. A la différence des polynucléaires neutrophiles, les monocytes et histiocytes sont encore capables de proliférer (bien que faiblement), mais surtout de synthétiser de nombreux composants (cytokines, autres).

3.2 Propriétés fonctionnelles du monocyte dans l'immunité

Les monocytes représentent environ 2 à 10% des leucocytes sanguins périphériques chez les humains et la souris. La demi-vie des monocytes est relativement courte, environ 1 jour chez la souris (van Furth R. and Cohn Z.A. 1968) et 3 jours chez les humains (Whitelaw D.M. 1972). Cette demi-vie très courte permet de renouveler de manière continue les populations de macrophages et/ou de cellules dendritiques afin de maintenir l'homéostasie cellulaire d'une

part, et d'assurer pleinement l'immunité innée et adaptative lors de l'inflammation d'autre part (Ziegler-Heitbrock H.W. 2000). Cependant, plusieurs observations suggèrent que les macrophages, dans différents organes, se renouvellent d'eux-mêmes sans l'aide de précurseurs sanguins (Gordon S. and Taylor P.R. 2005). C'est le cas des macrophages pulmonaires qui ne sont pas remplacés par les monocytes sanguins, après leur irradiation (Tarling J.D. *et al.* 1987), mais par des précurseurs locaux qui auront été protégés auparavant. D'autre part, une déplétion de monocytes sanguins n'affecte pas le nombre de macrophages alvéolaires (Sawyer R.T. *et al.* 1982). En effet, le renouvellement de macrophages pulmonaires à partir de monocytes sanguins est seulement observé si le corps entier est irradié, éliminant alors le précurseur cellulaire local (Gordon S. and Taylor P.R. 2005). Néanmoins, il est bien établi que les monocytes donnent naissance aux macrophages au niveau de la plupart des organes dans un contexte inflammatoire.

De récentes recherches ont focalisé sur les mécanismes et les molécules impliqués dans le recrutement des monocytes aussi bien que leur différentiation dans plusieurs tissus (Imhof B.A. and Aurrand-Lions M. 2004; Gordon S. and Taylor P.R. 2005). Deux voies principales de différentiation ont été identifiées : de nombreux monocytes se développent en macrophages et d'autres deviennent des cellules dendritiques (Leon B. *et al.* 2005). Les macrophages dégradent le matériel qu'ils phagocytent (Delamarre L. *et al.* 2005), présentent à leurs surface cellulaire les antigènes dégradés et initient la réponse immunitaire acquise des lymphocytes T (Albert M.L. *et al.* 1998; Jung S. *et al.* 2002; Zammit D.J. *et al.* 2005), relarguent une variété de cytokines après activation cellulaire et semblent être des facteurs essentiels dans la clairance locale des cellules mortes au niveau des tissus inflammés et non inflammés (Savill J. *et al.* 2002). Par contre, les cellules dendritiques à faible capacité protéolytique (Delamarre L. *et al*. 2005) sont capables de phagocyter du matériel d'autres cellules, de transformer et retenir les peptides/antigènes intracellulaires qui seront alors présentés via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T. Cette présentation antigénique conduit à une co-stimulation pour le priming des cellules T (Trombetta E.S. *et al.* 2003). Après maturation des cellules dendritiques, la membrane plasmatique subit un turn-over très lent permettant alors aux complexes CMH/peptides d'être présents plus longtemps à la surface cellulaire. Ce processus facilite les interactions avec les cellules T (Cella M. *et al.* 1997). Les macrophages activés renouvellent très rapidement les protéines membranaires plasmatiques dont le CMH de type II *(*Baron C. *et al.* 2001). En outre, les macrophages et les cellules dendritiques ont des propriétés migratoires

différentes. En effet, tandis que les macrophages restent largement dans les tissus, les cellules dendritiques sont capables de migrer des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes afin d'interagir avec les cellules T et induirent la réponse immunitaire (Randolph G.J. *et al.* 2005).

3.3 Propriétés fonctionnelles du monocyte dans l'athérogenèse

3.3.1 Rôles des molécules d'adhésion

Le recrutement des monocytes et des lymphocytes du sang périphérique au niveau de l'intima artériel est l'une des étapes les plus importantes de l'athérogenèse. L'accumulation de LDL subissant une oxydation et une glycation, est interprétée comme un signe de danger par le corps humain qui active les systèmes de défense. Ces évènements entraînent la sur expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, en particulier VCAM-1 et ICAM-1. Les études sur un modèle de souris transgénique déficiente en ApoE montrent que le roulement leucocytaire dépendant des molécules d'adhésion P-sélectine/VCAM-1 est une étape cruciale dans l'initiation de l'athérosclérose. En effet, l'adhérence et le roulement de cellules issues de la lignée mononucléaire U937 à la surface de l'endothélium des carotides isolées de souris ApoE-/- et sauvages, soumises à un régime alimentaire riche en cholestérol, sont significativement réduits lorsque la molécule P-sélectine ou son ligand PSGL-1 (P-selectin glycopotein-1 ligand) sont bloqués par des anticorps spécifiques (Rajavashisth T.B. *et al.* 1995). Des rats sujets à une hypercholestérolémie induite par la diète, présentent une sur-expression d'ICAM-1, principalement dans des zones sensibles aortiques lors des phases précoces de l'athérogenèse. Ces évènements sont associés avec un recrutement prononcé des monocytes et des lymphocytes T au niveau de l'intima (Watanabe T. and Fan J. 1998). Enfin, d'autres facteurs impliqués dans l'adhésion monocytaire sont suggérés comme pro-athérogénique tels que le facteur de Willebrand (vWF). En effet, des souris déficientes à la fois en vWF et en LDLR (récepteur au LDL) ont une réduction de 50% du roulement leucocytaire comparés aux souris déficientes seulement en LDLR. Cette baisse du roulement leucocytaire est associée avec une réduction de la taille des lésions aortiques de 50% (MethiaN. *et al.* 2001).

3.3.2 Rôles des chimioattractants

Les molécules chimioattractantes sont nécessaires à l'orchestration du processus de l'athérogenèse. Ainsi, la forte expression de MCP-1 est retrouvée dans des lésions athéroscléreuses chez l'homme (Reape T.J. and Groot P.H. 1999). Elle médie l'augmentation du nombre de macrophages aussi bien que l'accumulation des lipides oxydés. La fonction de MCP-1 est totalement dépendante de ses récepteurs. Chez le monocyte, trois récepteurs ont été identifiés, à savoir CCR-1, CCR-2 et CCR-5 (Boisvert W.A. *et al.* 1998), CCR-2 étant le principal récepteur de MCP-1. D'autres chimioattractants tels que la lysophosphatidylcholine formée par l'oxydation des particules LDL, est responsable de la sur expression d'une série de produits pro-inflammatoires chez les monocytes / macrophages (Chen Y. *et al.* 1995). MIP-1α, MIP-1β et RANTES, molécules produites dans les plaques athéroscléreuses, sont également de puissants chimioattractants directement impliqués dans l'infiltration monocytaire (Uguccioni M. *et al.* 1995).

3.3.3 Rôles des cytokines secrétées par les monocytes activés

Les monocytes et macrophages produisent une variété de cytokines qui régulent ou modulent l'inflammation et jouent des rôles essentiels dans l'athérogenèse. Avec le TNF-α, IL-1β est l'un des principaux produits pro inflammatoires générés par les monocytes / macrophages. IL-1β agit comme chimioattractant pour les neutrophiles (Loppnow H. *et al.* 1998), induit le relargage des neutrophiles de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (Annema A. et *al.* 1992) et accélère l'adhésion leucocytaire à l'endothélium. L'IL-6 est une cytokine pleïotropique impliquée dans la pathologie de nombreuses maladies dont l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde (Hirano T. *et al.* 1988) et le sarcome de Kaposi (Miles S.A. *et al.* 1990). Elle joue un rôle central dans le mécanisme de défense de l'hôte, telle que la réponse immunitaire et l'hématopoïese (Akira S. *et al.* 1990). D'ailleurs, des souris ApoE -/- exprimant de l'IL-6 recombinante développent d'importantes lésions athéroscléreuses précoces (Huber S.A. *et al.* 1999). Enfin, les monocytes peuvent exprimer des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 qui inhibe l'interaction leucocyte / cellule endothéliale ainsi que la production de chimiokines et cytokines pro inflammatoires chez les monocytes et les lymphocytes (Mallat Z. *et al.* 1999).

L'un des événements premiers de l'activation monocytaire est lié au LPS lorsque celui-ci sert d'agoniste. En tenant compte de la notion émergente que les maladies infectieuses chroniques puissent entraîner des mécanismes qui favorisent l'athérogenèse, les signaux cellulaires menant à une réponse inflammatoire systémique au LPS sont multiples. Le LPS plasmatique se fixe à la LBP (LPS-binding protein), formant alors un complexe qui interagit avec le récepteur CD14 (Hatada E.N. *et al.* 2000). Une fois le complexe formé, celui-ci se fixe à TLR4 (Toll-like receptor 4) qui sert de médiateur aux voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation de NFκB.

3.3.4 Rôle du polymorphisme du gène CD14

Deux groupes de recherche européens ont rapporté que le polymorphisme du promoteur du gène CD14 (mieux connu comme récepteur au LPS) était associé à un risque élevé d'athérosclérose (Hubacek J.A. *et al.* 1999; Unkelbach K. *et al.* 1999). Parce que ce polymorphisme conduit à une sur régulation du récepteur CD14 à la surface des monocytes, ces observations corroborent l'hypothèse que les infections chroniques (*Chlamydia pneumonia, Helicobacter pylori…*) peuvent être des facteurs de risque importants dans le développement de l'athérosclérose et l'apparition d'infarctus du myocarde.

3.3.5 Interactions monocyte – autres types cellulaires

Les interactions intercellulaires sont critiques dans l'inflammation et l'athérosclérose car elles impliquent des signaux paracrines, juxtacrines et autocrines (McIntyre T.M. *et al.* 2003). Parmi ces interactions, celles entre les monocytes circulants et les plaquettes sont essentielles (McIntyre T.M. *et al.* 2003; Weyrich A.S. *et al.* 2003; Weyrich A.S. and Zimmerman G.A. 2004). Les monocytes humains adhèrent aux plaquettes déposées au niveau de sites vasculaires lésés, et les agrégats monocytes-plaquettes entraînent une variété de syndromes inflammatoires (Sarma J. *et al.* 2002; Irving P.M. *et al.* 2004; Freedman J.E. and Loscalzo J. 2002). L'athérosclérose et ses complications aigues en sont les premiers exemples. Les recherches expérimentales démontrent que les interactions des plaquettes avec les monocytes circulants médient la progression de l'athérosclérose (Huo Y. *et al.* 2003). D'autre part, les études cliniques indiquent que les agrégats monocytes-plaquettes hétérotypiques influencent le développement naturel de l'athérosclérose et ses complications, et sont augmentés chez les patients atteints de maladie artérielle coronarienne (Freedman J.E. and Loscalzo J. 2002;

Furman M.I. *et al.* 2001; Sarma J. *et al.* 2002). L'interaction entre les leucocytes myéloïdes et les plaquettes activées implique des molécules d'adhésion spécifique et coordonne l'activation de récepteurs de surface par les ligands présentés sur les plaquettes (Mahoney T.S. *et al.* 2001; Weyrich A.S. *et al.* 1995; Weyrich A.S. *et al.* 1996). Une de ces étapes clé est la fixation de la molécule P-sélectine des plaquettes activées sur le ligand PSGL-1 des leucocytes circulants (McEver R.P. and Cummings R.D. 1997).

Parmi les autres interactions cellulaires, celles entre les monocytes et les lymphocytes T jouent également un rôle important dans le processus athérogénique. En effet, les cellules T participent dans la formation des lésions athéroscléreuses aussi précocement que les monocytes. Plusieurs molécules d'adhésion et chimiokines impliquées dans le recrutement monocytaire stimulent également les cellules T à pénétrer dans les lésions (sélectines, VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1). Au sein des plaques athéroscléreuses humaines avancées, les cellules T constituent environ 10 à 20% de la population cellulaire (Jonasson L. *et al.* 1986), forment des agrégats au niveau des sites sensibles à une rupture de la plaque et entraînent alors une thrombose fatale (van der Wal A.C. *et al.* 1994). La plupart des cellules T des lésions athéroscléreuses portent les marqueurs CD3 et CD4 ainsi que le récepteur antigénique de surface TCR (T-cell antigen receptor). L'expression de cette molécule de surface implique que ces cellules reconnaissent les antigènes protéiques qui leurs sont présentés par les macrophages ou les cellules dendritiques. De telles cellules représentent environ deux tiers de toutes les cellules T CD3 au sein des lésions humaines athéroscléreuses avancées (Jonasson L. *et al.* 1986; Stemme S. *et al.* 1992) et plus de 90 % au sein des lésions chez des souris ApoE-/- (Zhou X. *et al.* 1996).

3.4 Régulation de l'activation et désactivation monocytaire

Les monocytes jouent un rôle central dans la physiopathologie de plusieurs maladies, caractérisées par des processus inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou le psoriasis. Le potentiel pro-inflammatoire des monocytes est « débloqué » par leur activation/différentiation et la sécrétion de leurs produits d'activation (facteurs du complément, facteurs de coagulation, prostaglandines, leukotriènes, facteurs de croissance, cytokines, metalloprotéinases…). Plus de 100 molécules biologiquement actives sont produites par les monocytes/macrophages. La plupart requièrent des facteurs

transcriptionnels similaires pour leur synthèse, tels que NFκB et AP-1 (Diaz B. and Lopez-Berestein G. 2000).

Les monocytes sont activés en fonction de leur environnement et donc d'agonistes variés. Les agents qui induisent ou accélèrent l'activation monocytaire, et qui sont associés au développement de l'athérosclérose, sont nombreux à savoir certains agents stimulant le système immunitaire (LPS, les facteurs du complément, virus…), des facteurs de croissance (PDGF, MCSF, GCSF…), ou des cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8…).

Les activations autocrine et paracrine sont des processus régulateurs essentiels dans l'activation monocytaire. L'un des activateurs autocrines le plus important est le TNF-α, produit par les monocytes et connu pour sur réguler la synthèse d'autres cytokines (Philip and Epstein 1986) et le facteur tissulaire (Eliassen L.T. *et al.* 2000). Cet effet autocrine est médié par l'activation de NFκB (Callaghan M.M. *et al.* 1996).

Cependant, le monocyte subit un équilibre complexe entre facteurs activateurs et désactivateurs. En effet, une même molécule est capable d'activer et désactiver une cellule par des voies différentes. Pour exemple, la voie de transduction du signal phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / protéine kinase B (Akt) joue un rôle essentiel en régulant de manière négative les réponses inflammatoires aigues induites par le LPS *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'inhibition de cette voie de signalisation accélère l'activation induite par le LPS des facteurs de transcription NF-κB, AP-1 et Egr-1, ainsi que l'expression des gène du TNF-α et du facteur tissulaire chez des cellules monocytaires mis en culture (Guha M. and Mackman N. 2002). D'autre part, la surexpression transgénique de Akt protège de la mort dans un modèle de choc septique chez des souris qui ont subi une ligature-ponction cécale (Williams D.L. *et al.* 2004) aussi bien que des souris infectées par la bactérie *Francisella* (Rajaram M.V. *et al.* 2006). Enfin, de récentes études ont montré que Akt pouvait atténuer l'activation de la voie NF-κB induite par le LPS via la phosphorylation et l'inactivation de la glycogène synthase kinase 3β (GSK), ce qui régule négativement sa cible NF-κB, et supprime potentiellement les réponses pro-inflammatoires induites par le LPS et le choc endotoxique (Guha M. and Mackman N. 2002; Martin M. *et al.* 2005). Toutefois, si la voie PI3K/Akt activée par certaines molécules comme l'acide lipoïque α est capable d'inhiber la sur expression de médiateurs pro-inflammatoires dépendante de la voie NF-κB chez les monocytes (Zhang W.J. *et al.* 2007), il est important de noter qu'il existe des différences de réponses à propos du rôle anti-

inflammatoire PI3K/Akt. Ces différences de réponse dépendent du type cellulaire et de la nature du stimulus. En effet, la voie de transduction du signal PI3K/Akt peut agir soit comme régulateur positif (Thomas K.W. *et al.* 2002; Ozes O.N. *et al.* 1999; Madrid L.V. *et al.* 2001) ou régulateur négatif (Bommhardt U. *et al.* 2004; Guha M. and Mackman N. 2002; Kim I. *et al.* 2002) de l'activation de NF-κB et par conséquent, de la production de cytokines.

4. Apport du profilage d'expression génique dans l'athérosclérose

Les avancées rapides en génomique ces dernières années pourraient transformer la pratique de la médecine cardiovasculaire. Les ressources incluant le projet du génome humain et le projet international HapMap, les avancées technologiques majeures dans le génotypage à haute cadence et dans les méthodes de mesure d'expression génique, mais aussi le profilage de petites molécules vont apporter des réponses rapides dans la prévention, le diagnostic et la thérapie à suivre (Miller D.T. *et al.* 2007).

Les études génomiques, protéomiques et métaboliques des maladies complexes cardiovasculaires telles que l'athérosclérose vont apporter une meilleure compréhension des processus déclencheurs. Ainsi, les approches génétiques axées sur l'athérosclérose continueront à identifier les gènes et les voies impliquées dans la prédisposition et la pathophysiologie de cette maladie, alors que le profilage d'expression génique conduit à mieux comprendre la nature dynamique de la paroi vasculaire et promet la découverte et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques.

Valider de nouvelles découvertes reliées à l'athérosclérose requiert des approches complémentaires telles que le profilage d'expression génique (**Figure 15**). En effet, les études d'associations SNP (single nucleotide polymorphisme) ne peuvent pas déterminer quel polymorphisme affecte l'expression ou la fonction de ce gène.

Les techniques de mesure d'expression de gène que sont les micropuces géniques (Cook S.A. and Rosenzweig A. 2002) fournissent un outil puissant pour analyser rapidement des tissus spécifiques pour des profils d'expression couvrant des milliers de gènes à travers le génome. Plusieurs études à la fois chez des modèles humains et animaux ont été effectuées pour établir des profils d'expression génique reliés à l'athérosclérose. Une approche générale est celle de conduite par Ma et Liew (Ma J. and Liew C.C. 2003). Ils ont travaillé sur des leucocytes sanguins périphériques issus de sujets atteints de maladie caradiaque coronarienne (80 à 90% de sténose) versus des sujets contrôle en bonne santé et ont identifié 108 gènes dont l'expression était différemment régulée, ceci grâce au profilage génique.

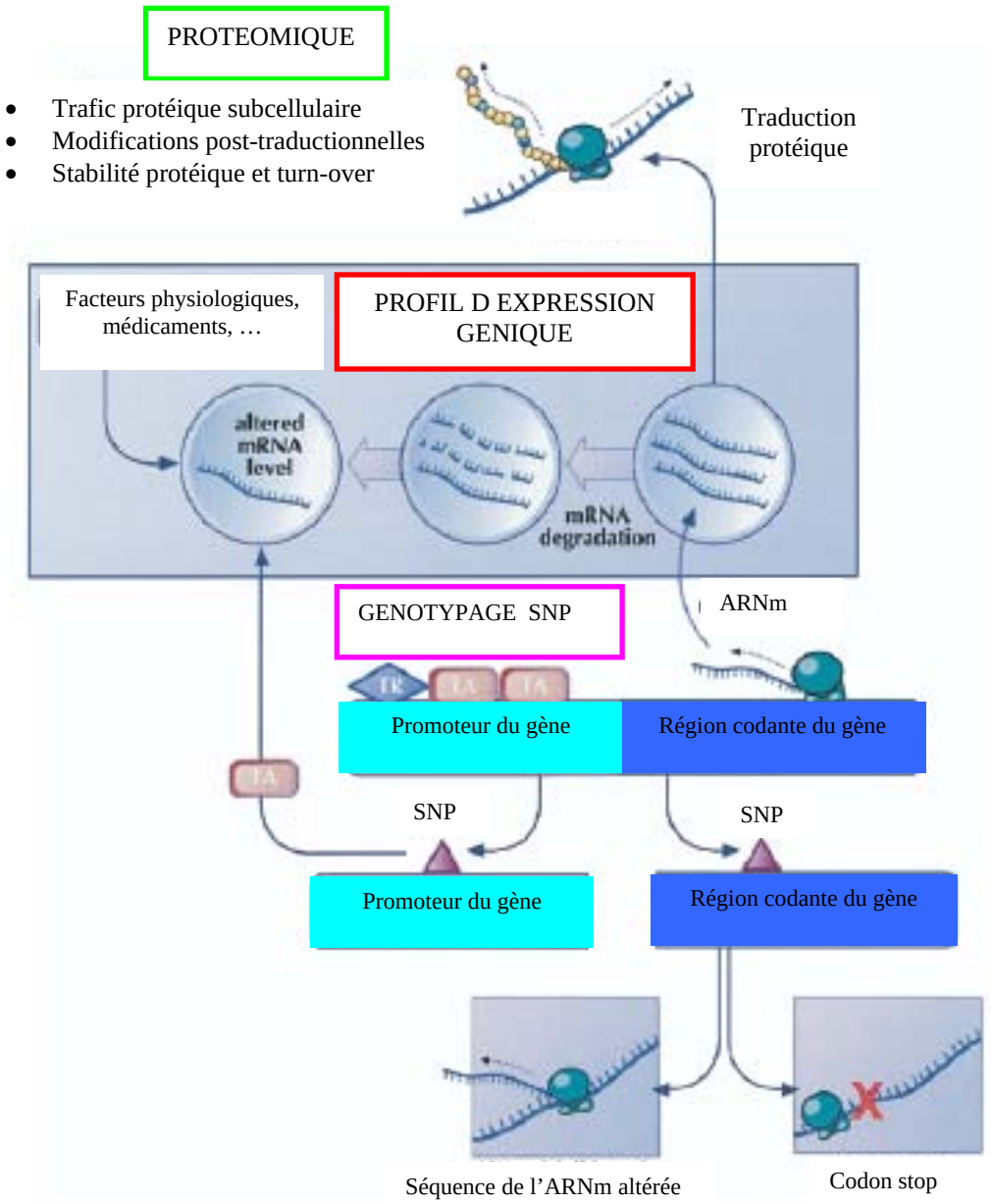


Figure 15 : *Les différents niveaux de régulation génomique et protéomique*

Capter toutes les informations requiert une approche combinée qui cible l'ADN, l'ARN et les protéines. Les SNPs peuvent influencer l'expression génique ou la fonction du gène. Les activateurs transcriptionnels (TA), répresseurs (TR) et le turn-over de l'ARNm influencent, indépendemment des génotypes SNP, les niveaux d'ARNm. Ces mécanismes sont seulement détectés par profilage génique. Bien que les niveaux d'ARNm varient à l'intérieur des cellules et entre les cellules, la régulation de la synthèse protéique, le turn-over ou la structure peuvent affecter la quantité de protéines ou la fonction, indépendemment du génotype ou de la régulation de l'ARNm (Miller D.T. *et al.* 2007).

Si les SNP mis en évidence représentent une information statique (le génome), les profils d'expression génique sont dynamiques (transcriptome) et peuvent montrer des fluctuations physiologiques (**Figure 15**). Ainsi, le profil d'expression de tissus aortique humain atteint d'athérosclérose collecté chez 63 cœurs de donneurs a indiqué des différences significatives d'expression pour 212 gènes, en fonction de la gravité de la maladie et de la localisation de la plaque d'athérome dans l'aorte thoracique (Seo D. *et al.* 2004). Après comparaison de l'expression génique et de résultats obtenus avec des méthodes histologiques plus traditionnelles, le profilage d'expression génique classait de manière correcte la sévérité de la maladie et sa localisation dans 93% des échantillons étudiés.

Les études de Karra et al. (Karra R. *et al.* 2005) ont porté sur l'expression génique lors de la progression des lésions athéroscléreuses. Ces études ont comparé l'état de la pathologie déterminé histologiquement avec les profils d'expression génique de tissus aortiques de souris sauvages et Apo E -/- . Les souris d'âge varié étaient exposées à une alimentation différente. Les profils obtenus variaient bien en fonction de l'avancée de la maladie :

- stade non malade à stade précoce : 197 gènes modifiés dont beaucoup impliqués dans le métabolisme lipidique
- stade précoce à stade intermédiaire : 146 gènes dont beaucoup impliqués dans l'inflammation
- stade intermédiaire à avancé : 110 gènes
- stade très avancé : 650 gènes

Ces études, ainsi que celles de Tabibiazar et al. (Tabibiazar R. *et al.* 2005) valident les profils de comparaison génique inter-espèces tout à fait similaires. En effet, plus de 40 gènes parmi les 650 mis en évidence chez la souris ($p<0.0001$) corrèlent de manière significative avec la progression de la maladie aussi bien chez la souris que chez l'humain.

Le profil transcriptionnel prend toute sa place dans les études génomiques où un stimulus environnemental intervient. L'extension de ce concept à la culture cellulaire a permis d'investir l'influence de la dynamique vasculaire sur les transcrits lors de l'athérosclérose. Ainsi, des cellules endothéliales vasculaires humaines mises en culture et exposées à des stress de flux variés, de gradient d'oxygène et à des LDL oxydés ont montré une expression différentielle de plusieurs gènes reliés à Nrf2 en réponse au flux laminaire (Warabi E. *et al.* 2004).

La détection des transcrits dans les cellules circulantes offre une application clinique du profilage transcriptionnel, mais ne peut pas refléter l'expression des gènes dans les lésions athéroscléreuses. Une fois encore, une telle stratégie peut néanmoins offrir de nouvelles découvertes dans les mécanismes de la thrombose coronarienne. L'analyse du profil transcriptionnel de plaquettes prélevées chez des patients atteints de syndromes coronariens aigus a offert la possibilité d'examiner les transcriptions de gènes qui sont apparus chez des megakaryocytes quelques semaines avant le déclenchement des symptômes. Cette approche a permis d'identifier la protéine 14 reliée à la myeloide (myeloid-related protein-14) comme un nouveau marqueur de risque coronarien (Healy A.M. *et al.* 2006).

Comment les expériences de profilage transcriptionnel impactent sur les thérapeutiques cardiovasculaires ? Les marqueurs validés qui émergent de ces profilages améliorent la stratification du risque et la personnalisation des traitements thérapeutiques. Le profilage aide à l'identification et à la mise au point de nouveaux médicaments qui ciblent l'athérosclérose. Ainsi, Tuomisto et al. (Tuomisto T.T. *et al.* 2003) ont montré que la réductase HMG-CoA (cible des médicaments comme les statines) augmente dans la plaque athéroscléreuse. En étudiant le profil transcriptionnel de monocytes exposés aux statines, Waehre et al. (Waehre T. *et al.* 2004) ont montré que les statines inhibent l'expression de la cytokine inflammatoire IL-1β normalement présente en grande quantité chez les sujets atteints de maladie artérielle coronarienne.

Dans une autre étude de profilage transcriptionnel, la CRP augmente l'expression des metalloprotéinase MMP-1 et MMP-10 dans les cellules endothéliales (Montero I. *et al.* 2006). Les MMPs participent directement dans la rupture de la plaque d'athérome et la thrombose. D'autre part, la CRP purifiée (CRPp) est capable d'augmenter l'expression des gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée tels que GADD153 dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Blaschke F. *et al.* 2004). Or, l'apoptose des CML apparaît bien au niveau de la plaque d'athérome (Geng Y.J. and Libby P. 2002).

En conclusion, le profilage d'expression génique décrit un lien moléculaire entre l'inflammation et les lésions athéroscléreuses. Il fournit un moyen puissant pour tester les effets des statines ou autres drogues et développer de nouvelles approches thérapeutiques contre l'athérosclérose.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel

1.1 Cellules, lignées cellulaires et milieux de culture

Les PBMC sont isolées du sang de donneurs sains (hommes et femmes âgés entre 25 et 35 ans), prélevé sur des tubes citratés. Le choix du citrate comme anticoagulant a été fait après avoir mis en évidence que le prélèvement sur EDTA ou sur héparine atténuait la réponse des cellules à un stimulus pro inflammatoire comme le LPS.

Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640, avec du tampon Hepes 25 mM, supplémenté en L-Glutamine, (Invitrogen Corporation, Baisley, Royaume-Uni), en présence ou non de sérum autologue 1%. Elles sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO2.

Les monocytes sont isolés du sang de donneurs sains (6 hommes et 6 femmes âgés entre 25 et 35 ans) prélevés sur des tubes citratés. Les critères de sélection sont les suivants :

- un bilan lipidique normal (cholestérol total, LDL, HDL, triglycérides)
- un taux de CRP inférieur à 5 mg/mL

Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture Serum Free Macrophage (SFM) (Invitrogen Corporation) supplémenté en sérum AB 1% (BioValley, Marne la Vallée, France). Elles sont incubées dans une étuve à 37° sous une atmosphère humide de 5% de CO2.

Les cellules de la lignée monocytaire THP-1 sont cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640 (Sigma) supplémenté en sérum de veau fœtal inactif 10%, L-glutamine 2 mM/L, pénicilline 50 U/mL, streptomycine 50 mg/ml, Hepes 10 mM, pyruvate de sodium 1 mM et acides aminés non essentiels (Invitrogen Corporation).

1.2 Protéine C-réactive

Deux types de CRP sont utilisés lors de cette étude :

- la CRPp, qui est une CRP purifiée à partir de plasma humain. Sa pureté est supérieure à 99% (Sigma cat n° C-4063, St Louis, Etats-Unis).

- la CRPr, qui est une CRP recombinante produite à partir d'E. Coli (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, Etats-Unis).

1.2.1 Purification des contaminants potentiels de la CRP

Afin de s'affranchir des effets de contaminants potentiels issus des préparations de CRPp et CRPr, tels que des contaminants bactériens (PepysM.B. *et al.* 2005) ou la présence d'azide de sodium (LiuC. *et al.* 2005), plusieurs expériences contrôle ont été réalisées.

Pour écarter une réponse artéfactuelle liée à l'interaction avec le lipopolysaccharide (LPS) présent dans les préparations de CRP commerciales utilisées, les cellules sont pré-incubées avec de la polymyxine B (50 µg/ml) (Sigma) pendant 30 mn. Cette concentration de polymyxine B a été choisie dans les expèriences préliminaires car elle est capable d'abolir les effets pro-inflammatoires du LPS à des concentrations maximales de 100 ng/ml.

D'autre part, les préparations de CRP (CRPp et CRPr), qui contiennent de l'azide de sodium, sont purifiées à l'aide de la colonne Bio Spin (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Les niveaux d'entotoxine dans les préparations de CRP sont détectés et mesurés à l'aide du kit « Limulus Amebocyte Lysate assay » (E-Toxate kit, Sigma). Les échantillons de CRP sont dilués (1/10) dans de l'eau sans pyrogène, et alors testés selon les instructions du kit « Limulus Amebocyte Lysate assay ». La limite de sensibilité du kit est de 0.05 à 0.1 unités d'endotoxine. La concentration finale de LPS détectées dans le milieu de culture est inférieure à 0.5 pg/ml en présence de CRPp (25 µg/ml) et la concentration de LPS dans la préparation de CRPp est inférieure à 0.02 pg de LPS par µg de CRPp.

1.2.2 Identification des isoformes de la CRP

Afin d'analyser les proportions d'isoformes monomériques versus pentamériques dans les préparations de CRPp et CRPr, montrées pour avoir des effets opposés (pro-inflammatoires versus anti-inflammatoires) (Khreiss, Jozsef, Potempa, and Filep 2004b; Khreiss, Jozsef, Potempa, and Filep 2005), une électrophorèse des préparations est effectuée sur gel de polyacrylamide non dénaturant (12%) dans du tampon Tris-glycine. Des quantités de 2 à 4 µg de CRPp et CRPr sont utilisées.

1.3 Anticorps

Les Anticorps monoclonaux humains anti-CD14 conjugués à des microbilles magnétiques (Miltenyi Biotech, Paris, France) sont utilisés lors de la purification des monocytes.

Les anticorps humains anti-CD14 couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (UCHT1, Dako, Glostrup, Danemark) et les anticorps anti-CD3 couplés à la phycoérythrine (PE) (RM052, Immunotech, Marseille, France) sont utilisés lors de la cytométrie en flux afin d'évaluer la pureté des monocytes.

Les anticorps suivants sont utilisés lors des Western Blot effectués sur les extraits de protéines nucléaires ou totales des monocytes humains et des cellules THP-1 :

- Ac de lapins anti-LXRα (Santa Cruz, Santa Cruz, USA)
- Ac de chèvre anti-NFκBp65 (Santa Cruz)
- Ac de lapin anti-phospho AKT (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)
- Ac de lapin anti-AKT (Cell Signaling)
- Ac de souris anti-phospho ERK (Cell Signaling)
- Ac de lapin anti-ERK (Cell Signaling)
- Ac de lapin anti-phospho p38 (Cell Signaling)
- Ac de souris anti-p38 (Cell Signaling)

Les anticorps suivants sont utilisés lors de l'analyse des récepteurs potentiels utilisés par la CRP dans la voie d'activation du LXRα sur les cellules THP-1 :

- Ac de souris anti-CD64 (clone 10.1) (Calbiochem, La Jolla, Californie)
- Ac de souris anti-CD32 (clone IV.3) (StemCell technologies, Vancouver, Colombie Britannique)

1.4 Inhibiteurs de la transduction du signal

Les inhibiteurs spécifiques de différentes voies de transduction du signal sont utilisés dans l'exploration des voies d'activation de la CRP :

- PD98059 (Calbiochem) inhibiteur de ERK MAP Kinase
- SB203580 (Calbiochem) inhibiteur de p38 MAP Kinase
- Ly294002 (Calbiochem) inhibiteur de PI3 Kinase

2. Méthodes

2.1 Séparation des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC)

Quarante mL de sang dilué au demi avec du PBS (tampon phosphate pH 7,4, Gibco, Royaume-Uni) sont centrifugés à volume égal de Ficoll (Ficoll de densité 1,077 ± 0,001, Amersham Bioscioences) à 2500 g pendant 20 minutes. Les PBMC concentrées dans un anneau à l'interface plasma / Ficoll (**Figure 16**) sont lavées 2 fois dans du PBS, centrifugées à 1500 g pendant 8 minutes puis éluées dans 10 mL de PBS.
La densité et la viabilité cellulaire sont mesurées dans du bleu Trypan à 0,4% (Sigma) et à l'aide d'une cellule de Thoma à partir de la formule suivante :

$$N = n \times Fd \times 10000$$

N = nombre de cellules par ml
n = nombre de cellules comptées sur la lame
Fd = facteur de dilution au bleu Trypan

La distinction entre cellules vivantes et cellules mortes se fait grâce au bleu trypan, colorant non toxique, qui a tendance à s'accumuler dans les cellules mortes devenues perméables mais qui est exclu des cellules viables.

- les cellules bleues correspondent aux cellules mortes : leur numération permet de déterminer la viabilité des cellules
- les cellules blanchâtres de taille moyenne sont les cellules mononucléaires
- les petites cellules sont les plaquettes

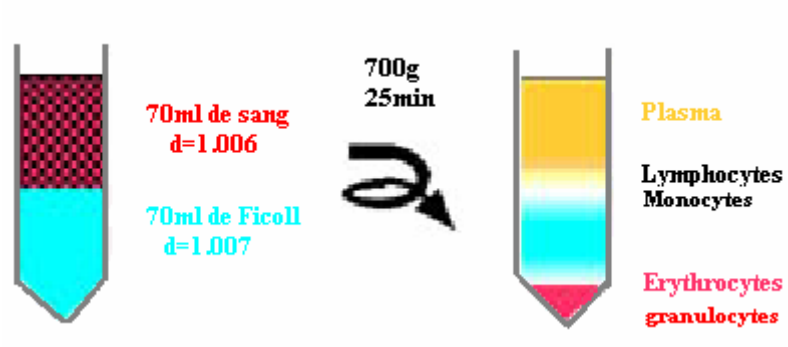


Figure 16 : *Principe de la séparation des PBMC sur gradient de Ficoll*

Après centrifugation du sang total, les érythrocytes et granulocytes sédimentent au fond du tube. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (lymphocytes et monocytes) sont isolées sous la forme d'une monocouche au niveau de l'interface plasma / Ficoll.

2.2 Purification des monocytes par tri magnétique

Le monocyte est une grande cellule dont le diamètre est compris entre 15 et 25 µm, arrondie ou quadrangulaire, avec un rapport noyau/cytoplasme de 0,5 à 0,6. Le noyau est irrégulièrement contourné, parfois "serpentiforme" ou réniforme. La chromatine a un aspect violacé et apparaît plus finement dessinée que dans le polynucléaire neutrophile. Le cytoplasme est gris-bleu avec une texture floconneuse et contient quelques granulations azurophiles très fines. Leur nombre dans le sang est de 0,2 à 0,8 10^9/L (adulte) et s'élève jusqu'à 1,2 10^9/L chez le nouveau né et le nourrisson.

La technique de séparation cellulaire immunomagnétique (Human CD14 Miltenyi Biotech) permet d'isoler les monocytes à partir des PBMC par sélection positive. Elle est réalisée en utilisant des microbilles magnétiques conjuguées à des anticorps monoclonaux anti-CD14 et une colonne de séparation LS (MACS, Miltenyi) (**Figure 17**). Les PBMC sont diluées dans 10 ml de tampon Miltenyi Biotech (PBS pH 7.4, 2mM EDTA, 0.5% BSA) (MB). La densité et viabilité cellulaire sont mesurées dans du bleu Trypan à 0.4% (Sigma) et à l'aide d'une cellule de Thoma. La viabilité des cellules est estimée en calculant le pourcentage de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes.

Après centrifugation à 300 g pendant 5 minutes, les PBMC sont diluées à une densité de 125000 cellules / µl de tampon MB puis incubées avec des 2 µl d'Ac anti–CD14 (MACS CD14 MicroBeads) / million de cellules entre 6 et 12°C pendant 15 minutes.

Les PBMC sont lavées dans un volume de tampon MB 10 à 20 fois supérieur au volume de cellules, centrifugées à 300g pendant 6 minutes et diluées dans 500µl de tampon MB.
Les cellules couplées à l'Ac sont déposées sur une colonne aimantée, équilibrée et soumise à un champ magnétique. La colonne est lavée trois fois avec 3 ml de tampon MB, puis, hors champ magnétique, les monocytes sont élués avec 5 ml de tampon MB. La quantité de monocytes est alors mesurée en cellule de Thoma, et la pureté évaluée en cytométrie en flux.

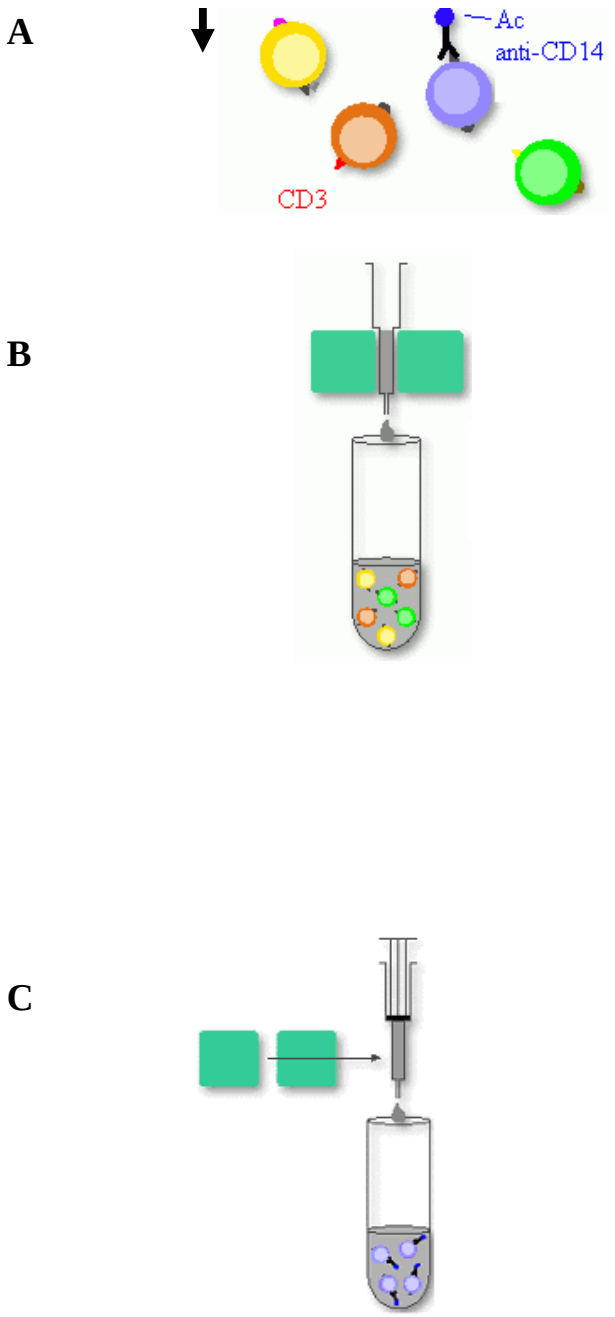


Figure 17 : *Principe de la purification des monocytes par tri magnétique*

A : Les PBMC sont incubées en présence d'Ac anti-CD14 couplés à des billes magnétiques

B : Les PBMC sont déposées sur une colonne aimantée soumise à un champ magnétique

Les cellules CD14+ (monocytes) couplées aux billes magnétiques se fixent alors sur la colonne

C : Les monocytes sont élués hors du champ magnétique

2.3 Mesure de la pureté des monocytes par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'étudier simultanément différentes caractéristiques physiques et biologiques de cellules isolées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres, défilent à grande vitesse devant un faisceau laser. Chaque cellule va diffracter la lumière soit dans l'axe du laser (le capteur correspondant est le FSC forward scatter) soit à 90° de l'incidence du laser (le capteur est le SSC side scatter). Ces deux signaux nous donnent respectivement des informations sur la taille et la structure (granulosité) de chacune des cellules. Le laser permet également d'exciter des fluorophores présents sur la cellule tels que FITC ou PE excitables à la même longueur d'onde mais qui émettent à des longueurs d'ondes différentes. Les signaux sont visualisés, après traitement informatique sous forme de graphiques bidimensionnels (nuages de points).

La pureté des cellules CD14+ est déterminée par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-CD3 humains couplés à la FITC (Dako) et des anticorps anti-CD14 humains couplés à la PE. L'analyse en cytométrie en flux est effectuée sur un total de 5000 évènements à l'aide de l'automate FACScalibur (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France). Les monocytes sont caractérisés par leur phénotype CD3-/CD14+ et sont différentiés des lymphocytes caractérisés par leur phénotype CD3+/CD14-.

2.4 Mise en culture des PBMC et traitement avec la protéine C-réactive

Cinq millions de PBMC sont ensemencés dans une flasque de 25 cm^2 à une densité de 1.5 millions / ml de milieu de culture (RPMI 1640 avec 25 mM MOPS et L-glutamine, Gibco, Royaume-Uni) supplémenté ou non de sérum autologue 1%. Les PBMC sont maintenues à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO2 pendant 20h. Ce laps de temps est nécessaire afin que les monocytes retrouvent un état quiescent. En effet, l'isolement des cellules mononucléaires induit une augmentation de l'expression de certains ARNm tels que TNFα et IL6, marqueurs du monocyte activé (Barth S. *et al.*. 2000).

Les PBMC sont traitées (échantillon) ou non (témoin) avec la CRPp humaine (Sigma) à une concentration de 25 µg/ml pendant 24 h.

2.5 Mise en culture des monocytes, exposition à la CRP et investigation des voies de transduction du signal

Cinq millions de monocytes humains purifiés sont ensemencés dans une flasque de 25 cm^2 à une densité de 1.5 millions / ml de milieu de culture Serum Free Macrophage (SFM) (Invitrogen) supplémenté en sérum AB 1% (Invitrogen). Les monocytes sont maintenus à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO2 pendant 20h.

Afin de déterminer le temps d'exposition idéal des monocytes humains purifiés à la CRPp dans le cadre de l'expression du transcriptome monocytaire, une cinétique d'expression génique, ciblée sur quelques gènes pro inflammatoire, a été établie. Les monocytes ont été exposés ou non à la CRPp à une concentration de 25 µg/ml pendant 0h, 3h, 6h, 12h et 24h.

Les monocytes de la lignée THP-1 sont exposés à la CRPp (2.5 ou 25 µg/ml) ou à la CRPr (2.5 µg/ml) pendant 8h, 12h ou 24h. Les cellules THP-1 sont issues d'une lignée leucémique myélomonocytaire humaine.

Afin d'établir un contrôle positif de l'expression de l'ARNm et de la protéine LXRα, les cellules de la lignée THP-1 sont différenciées en macrophages dérivés THP-1 par l'exposition à la PMA (phorbol-12-myristate-13-aceate)(160 nM) pendant 48h. Pour déterminer l'induction spécifique par la CRP de l'expression du LXRα, les THP-1 sont stimulées par le LPS (100 ng/ml) et l'expression génique du LXRα est mesuré 1h30, 3h, 6h, 12h et 24h après administration du LPS.

Pour étudier le rôle des MAP Kinases et PI3 Kinases dans les voies de la transcription du LXRα induites par la CRP, des inhibiteurs spécifiques de ERK MAP Kinase (PD98059), p38 MAP Kinase (SB203580) et de PI3 Kinase (Ly294002) sont administrés aux cellules THP-1 à une concentration de 10 µM. Lors de ces expériences, les inhibiteurs sont ajoutés 30 minutes avant l'administration de la CRPp ou CRPr et l'expression de l'ARNm du LXRα est quantifiée 12h plus tard.

Enfin, afin de mieux comprendre la réceptorologie de la CRP et d'identifier les mécanismes d'action de la CRP sur le LXRα, les cellules THP-1 sont stimulées avec de la CRPr, purifiée de toutes traces d'endotoxines à l'aide de colonne detoxigel (Pierce Biochemicals, Rockfordn

Illinois) et coincubées avec de la polymyxine B (10 µg/ml) pour s'assurer que les effets induits par la CRPr purifiée sont bien distincts de ceux médiés par le LPS. Pour bloquer la fixation de la CRPr au récepteur FcγRI (CD64) ou au récepteur FcγRII (CD32), les cellules THP-1 sont préincubées pendant 30 mn avec un anticorps monoclonal anti-CD64 (2µg/ml) ou anti-CD32 (2µg/ml) avant l'ajout de la CRPr purifiée. L'expression de l'ARNm du LXRα est alors mesurée 12 heures plus tard.

2.6 Mesure de l'expression des gènes par la méthode des puces à oligonucléotides

2.6.1 Conception de la puce à oligonucléotides

La conception de la puce à oligonucléotides a été effectuée par notre groupe (Ketsia Hess, Didier Hanriot et Dan Longrois) en collaboration avec la société MWG Biotech (Ebersberg, Allemagne). Nous avons, après analyse de la littérature, identifié 250 gènes dont l'expression est modifiée dans les monocytes dans plusieurs situations physiopathologiques caractérisées par une activation de l'inflammation. Nous avons délibérément choisi de travailler avec un nombre restreint de gènes pour plusieurs raisons :

(i) le faible pourcentage (2-5 %) de gènes dont l'expression est modifiée dans la plupart des publications qui ont analysé les monocytes ;

(ii) les difficultés d'analyse statistique lorsque l'on travaille avec plusieurs milliers de gènes ;

(iii) le temps nécessaire à l'analyse de plusieurs milliers de gènes dont certains ont des fonctions encore inconnues ;

(iv) la nécessité de corréler les modifications de l'expression génique avec celles des protéines ainsi que des modifications des fonctions cellulaires.

Le **tableau 5** présente l'ensemble des 250 gènes sélectionnés et classés par ordre alphabétique. Chaque gène est représenté par un pool d'oligonucléotides d'une longueur de 50 mers qui lui est spécifique. En effet, l'approche de MWG qui assure une haute qualité des puces fabriquées est basée sur les outils bioinformatiques puissants tels que le logiciel Oligos4Array et la base de données CodeSeq non redondante dont MWG est propriétaire. Les oligonucléotides sont sélectionnés à partir de la base de donnée CodeSeq. Les séquences redondantes et partielles sont éliminées pour chaque transcrit de gène par un processus d'assemblage. La séquence codant pour la protéine du gène avec les isoformes alternatives est définie pour chaque transcrit. A l'aide du logiciel Oligos4Array, les oligonucléotides d'une longueur de 50 mers sont désignés à l'intérieur des régions codantes définies. Tous les oligonucléotides sont analysés pour leurs contenus en base nucléiques GC, leur température d'hybridation Tm et leurs structures secondaires. Oligos4Array compare les séquences définies par BLAST et Smith-Waterman avec celles de toutes les régions codantes connues de l'espèce étudiée.

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
G	24	mwghuman30K#A:00415	SELPLG	Adhesion Molecule	NM_003006
B	14	mwghuman30K#A:08273	a- 2-macroglobulin	inflammation	M36501
D	24	mwghuman30K#A:00168	Activin RIA	TGF-beta Superfamily	NM_001105
I	14	mwghuman30K#A:08507	Activin RIB	TGF-beta Superfamily	NM_004302
J	10	mwghuman30K#B:7987	ADM	autre	NM_001124
D	10	mwghuman30K#B:5802	AIB1	Nuclear receptor coact	AF010227
P	14	mwghuman30K#A:09378	ALOX12	inflammation	NM_000697
H	9	mwghuman30K#C:1704	ALOX15	inflammation	NM_001140
F	13	mwghuman30K#A:09872	ALOX5	inflammation	NM_000698
M	22	mwghuman30K#A:02070	ALOX5AP	inflammation	NM_001629
B	12	mwghuman30K#A:10430	ALOXE3	inflammation	NM_021628
N	12	mwghuman30K#B:0994	antitrypsine	secreted protein	NM_000295
L	12	mwghuman30K#B:0659	apo c	Apoliprotein	NM_001645
M	15	mwghuman30K#A:08039	APO E	Enzyme	NM_000041
P	24	mwgaracontrol#002	Arabidopsis control oligonucleotide	Contrôle négatif	
A	23	mwgaracontrol#001	Arabidopsis control oligonucleotide	Contrôle négatif	
P	15	mwgaracontrol#001_r	Arabidopsis control oligonucleotide	Contrôle négatif	
A	14	mwgaracontrol#002_r	Arabidopsis control oligonucleotide	Contrôle négatif	
O	24	mwghuman30K#A:00690	ARP	other molecules	NM_006010
O	13	mwghuman30K#A:10258	ARPC1A	Signal Transduction	NM_006409
A	21	mwghuman30K#A:02268	Aryl hydrocarbon receptor	transcription factor	NM_001621
G	21	mwghuman30K#A:02726	ATF-2 (creb-2)	transcription factor	NM_001880
E	23	mwghuman30K#A:00770	ATF4	nuclear protein	NM_001675
H	23	mwghuman30K#A:05626	B2 microglobuline	House keeping	NM_004048
P	10	mwghuman30K#A:03728	B-actine	House keeping	NM_014183
L	16	mwghuman30K#A:07209	bax	apoptose	NM_004324
K	21	mwghuman30K#A:02989	Bcl-2	Apoptosis-Related	NM_000633
L	9	mwghuman30K#C:2674	BMP-3	TGF-beta Superfamily	NM_001201
P	16	mwghuman30K#A:07425	C5R1	Cell Surface Protein	NM_001736
F	17	mwghuman30K#A:06249	CAPN2	Enzyme	NM_001748
E	10	mwghuman30K#B:5980	CARM1	coactivator	XM_032719
F	16	mwghuman30K#A:06999	caspase 3	apoptose	NM_032991

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
B	17	mwghuman30K#A:06111	cathepsin K	secreted protein	NM_000396
P	12	mwghuman30K#B:2097	CBF-C ou NFYC	nuclear protein	NM_014223
E	17	mwghuman30K#A:06184	CBP ou PCAF	transcription factor	NM_003884
A	12	mwghuman30K#A:10335	CCR1	Chemokine Receptor	NM_001295
N	23	mwghuman30K#A:01457	CCR2	Chemokine Receptor	NM_000648
J	12	mwghuman30K#B:0450	CCR-4	Chemokine Receptor	NM_005508
C	9	mwghuman30K#B:9350	CCR-5	Chemokine Receptor	NM_000579
K	24	mwghuman30K#A:00535	CCR-6	Chemokine Receptor	Z79784_
O	23	mwghuman30K#A:01470	CCR-7	Chemokine Receptor	NM_001838
A	11	mwghuman30K#B:3469	CCR-8	Chemokine Receptor	NM_005201
K	17	mwghuman30K#A:06445	CCRL1	Chemokine Receptor	NM_016557
B	24	mwghuman30K#A:00121	CD14	Cell Surface Protein	NM_000591
G	10	mwghuman30K#B:7538	CD163	Cell Surface Protein	NM_004244
K	16	mwghuman30K#A:07208	CD166	Cell Surface Protein	NM_001627
N	21	mwghuman30K#A:03244	CD36	Cell Surface Protein	NM_000072
N	16	mwghuman30K#A:07352	CD44	Cell Surface Protein	L05424
K	22	mwghuman30K#A:02065	CD64	Cell Surface Protein	NM_000566
H	24	mwghuman30K#A:00455	CD97 type 2	Cell Surface Protein	NM_001784
P	18	mwghuman30K#A:05941	CD99	Cell Surface Protein	NM_002414
G	15	mwghuman30K#A:07779	CEBPA	nuclear protein	NM_004364
O	19	mwghuman30K#A:05120	CEBPB	Signal Transduction	NM_005194
P	19	mwghuman30K#A:05281	c-fos	Signal Transduction	NM_005252
K	23	mwghuman30K#A:01126	CFR-1	FGF Family	NM_012201
I	15	mwghuman30K#A:07795	Cholesteryl ester hydrolase	Enzyme	NM_000235
H	13	mwghuman30K#A:09892	CISH	Signal Transduction	NM_013324
E	20	mwghuman30K#A:03643	c-jun	transcription factor	NM_005043
C	21	mwghuman30K#A:02498	c-myc	Cell Cycle Regulators	NM_002467
N	14	mwghuman30K#A:08967	Cox-1	Apoptosis-Related	NM_000962
H	22	mwghuman30K#A:02001	Cox-2	Apoptosis-Related	NM_000963
J	17	mwghuman30K#A:06383	CREB	transcription factor	NM_004379
J	22	mwghuman30K#A:02049	c-rel	Signal Transduction	NM_002908
A	17	mwghuman30K#A:06034	CTLA-4	Cell Surface Protein	NM_005214

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
B	11	mwghuman30K#B:3470	CX3CR-1	Chemokine Receptor	NM_001337
D	13	mwghuman30K#A:09808	CXCR-1	Chemokine Receptor	NM_005283
N	10	mwghuman30K#B:9037	CXCR-2	Chemokine Receptor	NM_001557
H	12	mwghuman30K#A:10810	CXCR-4	Chemokine Receptor	NM_003467
G	18	mwghuman30K#A:05522	CXCR-5	Chemokine Receptor	NM_001716
A	9	mwghuman30K#A:04717	Cyclophilline A	House keeping	XM_060833_
M	19	mwghuman30K#A:04998	CYP1B1	Enzyme	NM_000104
L	22	mwghuman30K#A:02066	CYP3	Enzyme	NM_005729
D	9	mwghuman30K#C:0081	Cytochrome p450	Apoptosis-Related	AF258341
J	23	mwghuman30K#A:01114	DUSP1	Signal transduction	NM_004417
H	18	mwghuman30K#A:05640	E2F	transcription factor	U47677
P	23	mwghuman30K#A:01498	Egr-1	transcription factor	NM_001964
C	17	mwghuman30K#A:06140	elk-1	transcription factor	NM_005229
M	13	mwghuman30K#A:10220	EMMPRIN	inflammation	AF042854
P	13	mwghuman30K#A:10267	EMP-1	Cell Surface Protein	NM_001423
E	24	mwghuman30K#A:00184	EP2R	Signal Transduction	NM_000956
A	15	mwghuman30K#A:07446	EP2R1	Signal Transduction	NM_000955
D	15	mwghuman30K#A:07652	EP2R3	Signal Transduction	NM_000957
J	11	mwghuman30K#B:4759	EP2R4	Signal Transduction	NM_000958
I	24	mwghuman30K#A:00465	EphB1	Eph Family	NM_004441
B	10	mwghuman30K#B:5471	ERK1	Signal Transduction	X60188
J	13	mwghuman30K#A:10110	ERK2 (MAPK1)	Signal Transduction	NM_002745
N	19	mwghuman30K#A:05071	ESR1	transcription factor	NM_000125
M	12	mwghuman30K#B:0730	ESR2	transcription factor	NM_001437
D	20	mwghuman30K#A:03571	ETR101	nuclear protein	NM_004907
G	12	mwghuman30K#A:10780	FABP5	other molecules	NM_001444
H	16	mwghuman30K#A:07077	FASTK	Signal Transduction	NM_006712
F	20	mwghuman30K#A:03701	FCGR3B	inflammation	NM_000570
N	18	mwghuman30K#A:05872	fibrinogen like 2	secreted protein	NM_006682
A	24	mwghuman30K#A:09550	GAPDH	House keeping	X01677_
B	15	mwghuman30K#A:07530	GBP1	Signal Transduction	NM_002053
J	19	mwghuman30K#A:04920	G-CSF (3)	Cytokines and Receptors	NM_000759

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
O	14	mwghuman30K#A:09027	GM-CSF	Cytokines and Receptors	NM_000758
D	11	mwghuman30K#B:3768	GM-CSF Ralpha	Cytokines and Receptors	NM_006140
B	21	mwghuman30K#A:02435	gp130	Interleukin Receptor	NM_002184
F	19	mwghuman30K#A:04681	GRO-alpha	Chemokine	NM_001511
G	19	mwghuman30K#A:04681	GRO-beta	Chemokine	NM_002089
F	21	mwghuman30K#A:02653	GSR	Enzyme	NM_000637
B	20	mwghuman30K#A:03413	HMG1(Y)	nuclear protein	NM_002131
L	14	mwghuman30K#A:08900	IFN-gamma R2	Cytokines and Receptors	NM_005534
H	14	mwghuman30K#A:08503	IFNGR1	inflammation	NM_000416
N	22	mwghuman30K#A:02137	IkB1a (mad3)	Signal Transduction	NM_020529
E	9	mwghuman30K#C:0315	IKK-alpha	Signal Transduction	U22512_
F	9	mwghuman30K#C:0402	IKK-beta	Signal Transduction	AF080158
L	15	mwghuman30K#A:07901	IKK-gamma	Signal Transduction	NM_003639
F	15	mwghuman30K#A:07761	IL-1 alpha	Interleukin	NM_000575
G	14	mwghuman30K#A:08500	IL-1 beta	Interleukin	NM_000576
I	16	mwghuman30K#A:07100	IL-1 RI	Interleukin Receptor	NM_000877
K	13	mwghuman30K#A:10141	IL-1 RL2	Interleukin Receptor	XM_002685_
O	16	mwghuman30K#A:07424	IL-10	Interleukin	NM_000572
L	21	mwghuman30K#A:03181	IL-10 Ra	Cytokines and Receptors	NM_001558
E	14	mwghuman30K#A:08414	IL-10 Rbeta	Interleukin Receptor	NM_000628
L	23	mwghuman30K#A:01248	IL-12 p40	Interleukin	NM_002187
H	21	mwghuman30K#A:02885	IL12 Rb1	Cytokines and Receptors	NM_005535
N	11	mwghuman30K#B:4956	IL-12 Rb2	Cytokines and Receptors	NM_001559
O	22	mwghuman30K#A:02144	IL-13 Ralpha2	Interleukin Receptor	NM_000640
L	18	mwghuman30K#A:05823	IL-15	Interleukin	NM_000585
F	18	mwghuman30K#A:05507	IL-15 Ra	Cytokines and Receptors	NM_002189
F	22	mwghuman30K#A:01751	IL-18	Interleukin	NM_001562
H	17	mwghuman30K#A:06317	IL-18 R	Interleukin Receptor	NM_003855
L	13	mwghuman30K#A:10211	IL-19	Interleukin	NM_013371
I	20	mwghuman30K#A:03791	IL-2 R alpha	Interleukin Receptor	NM_000417
C	22	mwghuman30K#A:01627	IL-22	Interleukin	NM_020525
M	16	mwghuman30K#A:07260	IL-4 Ralpha	Interleukin Receptor	NM_000418

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
B	23	mwghuman30K#A:00705	IL-6	Interleukin	NM_000600
O	11	mwghuman30K#B:5065	IL-6 Ralpha	Interleukin Receptor	NM_000565
G	17	mwghuman30K#A:06269	IL8	Chemokine	NM_000584
M	23	mwghuman30K#A:01417	IL-8 Ra	Cytokines and Receptors	NM_000634
M	17	mwghuman30K#A:06560	ILK	Signal Transduction	NM_004517
M	20	mwghuman30K#A:04041	iNOS	NO Metabolism	NM_000625
F	10	mwghuman30K#B:5993	Integrin a1	Integrin	XM_032902
M	14	mwghuman30K#A:08950	Integrin a4	Integrin	NM_000885
P	17	mwghuman30K#A:06632	Integrin-alpha5	Integrin	NM_002205
B	19	mwghuman30K#A:04507	Integrin-alpha6	Integrin	NM_000210
L	20	mwghuman30K#A:04027	Integrin-alphaL	Integrin	NM_002209
C	20	mwghuman30K#A:03459	Integrin-alphaV	Integrin	NM_002210
M	9	mwghuman30K#C:2693	Integrin-alphaX	Integrin	M81695
C	12	mwghuman30K#A:10465	Integrin-beta2	Integrin	NM_000211
E	19	mwghuman30K#A:04561	IRAK1	Signal Transduction	NM_001569
N	24	mwghuman30K#A:00676	IRAK2	Signal Transduction	NM_001570
D	14	mwghuman30K#A:08413	IRF 7A	nuclear protein	NM_001572
J	21	mwghuman30K#A:02981	IRF1	Signal Transduction	NM_002198
K	9	mwghuman30K#C:2517	IRLB	transcription factor	Hs.135202
O	20	mwghuman30K#A:04116	ITGB1	Cell surface Protein	NM_002211
P	11	mwghuman30K#B:5205	JNK2 ou MAPK9	Signal Transduction	NM_002752
K	14	mwghuman30K#A:08792	LAMB3	Cell Surface Protein	U17760
M	10	mwghuman30K#B:8214	LHFPL2	other molecules	XM_046054
E	21	mwghuman30K#A:02572	LIF	Cytokines and Receptors	NM_002309
I	11	mwghuman30K#B:4622	LPLase	Enzyme	NM_000237
E	16	mwghuman30K#A:06922	L-Selectin	Adhesion Molecule	NM_000655
A	22	mwghuman30K#A:01528	LXRa	nuclear receptor	NM_005693
E	18	mwghuman30K#A:05493	M6PR	Enzyme	NM_002355
B	16	mwghuman30K#A:06747	MAP2K6	Signal Transduction	NM_002758
G	11	mwghuman30K#B:4355	MAP4	Signal Transduction	M64571
L	17	mwghuman30K#A:06518	MAPK4	Signal Transduction	XM_008806
O	17	mwghuman30K#A:06627	MAPK8	Signal Transduction	NM_002750

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
I	9	mwghuman30K#C:2331	MCP-1	Cytokines and Receptors	NM_002982
N	20	mwghuman30K#A:04094	MCP-2	Chemokine	NM_005623
P	22	mwghuman30K#A:02181	MCP-3	Chemokine	NM_006273
F	12	mwghuman30K#A:10730	M-CSF	Cytokines and Receptors	NM_000757
I	18	mwghuman30K#A:05665	MD-2	Cell Surface Protein	NM_015364
K	10	mwghuman30K#B:8034	MEK1	Signal Transduction	NM_002755
C	11	mwghuman30K#B:3586	MEK2	Signal Transduction	NM_030662
L	10	mwghuman30K#B:8175	Metallothionein	other molecules	XM_091368
G	23	mwghuman30K#A:00985	MIP-1alpha	Chemokine	NM_002983
O	21	mwghuman30K#A:03322	MIP-1beta	Chemokine	NM_002984
I	12	mwghuman30K#B:0206	MKP3 PYST 1	Signal transduction	NM_001946
J	9	mwghuman30K#C:2370	MMP-1	Protease or Related Factor	XM_006270_
G	22	mwghuman30K#A:01762	MMP12	Protease or Related Factor	NM_002426
E	22	mwghuman30K#A:01692	MMP-13	Protease or Related Factor	NM_002427
C	16	mwghuman30K#A:06749	MMP-2	Protease or Related Factor	NM_004530
I	21	mwghuman30K#A:02964	MMP-9	Protease or Related Factor	NM_004994
J	24	mwghuman30K#A:00472	MPO	Apoptosis-Related	NM_000250
M	24	mwghuman30K#A:00566	MyD88	Signal Transduction	NM_002468
E	15	mwghuman30K#A:07711	NCOR2	nuclear protein	NM_006312
F	23	mwghuman30K#A:00814	NFKB p50 (vREL)	Signal Transduction	NM_006509
A	19	mwghuman30K#A:04362	NFKB1	Signal Transduction	NM_003998
C	10	mwghuman30K#B:5472	NFKB2	Signal Transduction	NM_002502
D	17	mwghuman30K#A:06168	NFKB3 (p65)	Signal Transduction	NM_021975
H	20	mwghuman30K#A:03730	NIK	signal Transduction	NM_003954
A	16	mwghuman30K#A:06659	nNOS	NO Metabolism	NM_000620
C	23	mwghuman30K#A:00706	Nucleosome assembly protein2 NAP1L4	nuclear protein	NM_005969
K	15	mwghuman30K#A:07869	N-WASP	Signal Transduction	NM_003941
A	13	mwghuman30K#A:09441	osteopontin	secreted protein	NM_000582
I	22	mwghuman30K#A:02011	ox LDLR	Cell Surface Protein	NM_002543
J	16	mwghuman30K#A:07172	p38 MAPK	Signal Transduction	NM_001315
K	20	mwghuman30K#A:03882	PAFR	inflammation	NM_000952
I	13	mwghuman30K#A:10076	PAI-2 OU SERPINB2	regulator of tissue invasion	NM_002575

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
B	22	mwghuman30K#A:01561	PAK1	Signal Transduction	NM_002576
K	11	mwghuman30K#B:4820	PBEF	cytokine	NM_005746
G	20	mwghuman30K#A:03715	PCNA	nuclear protein	NM_002592
J	18	mwghuman30K#A:05693	PGES	inflammation	NM_004878
M	11	mwghuman30K#B:4951	PI3K 110	signal Transduction	NM_006218
O	10	mwghuman30K#B:9242	PI3K 110b	Signal Transduction	NM_006219
L	11	mwghuman30K#B:4942	PI3Kp85A	Signal Transduction	XM_043865
P	20	mwghuman30K#A:04261	PI3Kp85B	Signal Transduction	NM_005027
A	18	mwghuman30K#A:05341	pim1	Signal Transduction	NM_002648
D	22	mwghuman30K#A:01655	PINCH LIMS1	Signal transduction	NM_004987
F	11	mwghuman30K#B:4285	PKC zeta	Signal Transduction	NM_002744
J	15	mwghuman30K#A:07848	PKCd	Signal Transduction	NM_006254
D	12	mwghuman30K#A:10617	PKCe	Signal Transduction	XM_010814
E	11	mwghuman30K#B:4206	PKR? Ou PLCG2	Signal Transduction	NM_002661
G	9	mwghuman30K#C:0885	PLA2G4A	Other Factors	M72393
I	19	mwghuman30K#A:04908	PLAU	Protease or Related Factor	NM_002658
H	10	mwghuman30K#B:7566	PLEC1	cytoskeleton-related protein	NM_000445
J	14	mwghuman30K#A:08661	PPARG(4)	nuclear receptor	NM_005037
F	14	mwghuman30K#A:08486	PPARGc1	nuclear receptor	NM_013261
N	13	mwghuman30K#A:10233	PRKCB1	Signal Transduction	NM_002738
N	17	mwghuman30K#A:06591	PTGFR	Signal Transduction	NM_000959.1
F	24	mwghuman30K#A:00268	PTGIR	Signal Transduction	NM_000960
I	17	mwghuman30K#A:06321	PTK2	Signal Transduction	NM_005607
B	18	mwghuman30K#A:05416	PXN	cytoskeleton-related protein	NM_002859
C	14	mwghuman30K#A:08370	Rantes	Chemokine	NM_002985
H	11	mwghuman30K#B:4601	SCYB10	Chemokine	NM_001565
A	10	mwghuman30K#B:5275	SCYB11	chemokine	NM_005409
O	12	mwghuman30K#B:1274	serine protease	Protease or Related Factor	NM_002775
C	19	mwghuman30K#A:04524	SGK	Signal transduction	NM_005627
D	21	mwghuman30K#A:02507	SOD2	Enzyme	NM_000636
M	18	mwghuman30K#A:05871	Squalene epoxidase	Enzyme	
G	13	mwghuman30K#A:09886	SRC1	transcription factor	NM_003743

Coordonnées sur la lame		Identification du gène MWG	Nom du gène	Fonction du gène	ID du gène (GenBank)
C	18	mwghuman30K#A:05418	SRF	transcription factor	NM_003131
A	20	mwghuman30K#A:03398	STAT1	Signal Transduction	NM_007315.1
L	24	mwghuman30K#A:00563	STAT3	Signal Transduction	NM_003150
J	20	mwghuman30K#A:03851	STAT5A	Signal Transduction	NM_003152
B	13	mwghuman30K#A:09594	TANK	Signal Transduction	NM_004180
O	18	mwghuman30K#A:05891	TBXA2R	inflammation	NM_001060
G	16	mwghuman30K#A:07050	TGF-b1	TGF-beta Superfamily	NM_000660
L	19	mwghuman30K#A:04995	Thiopurine MT	Enzyme	NM_000367
O	15	mwghuman30K#A:08048	TIMP-1	Protease or Related Factor	NM_003254
I	10	mwghuman30K#B:7599	TIMP-2	Protease or Related Factor	NM_003255
P	21	mwghuman30K#A:03360	TLR2	Cell Surface Protein	NM_003264
I	23	mwghuman30K#A:01091	TLR4	Cell Surface Protein	NM_003266
H	15	mwghuman30K#A:07784	TNFAIP3	Apoptosis-Related	NM_006290
K	12	mwghuman30K#B:0637	TNFSF13/APRIL	TNF Superfamily	NM_003808
C	24	mwghuman30K#A:00144	TNFSF14/LIGHT	TNF Superfamily	NM_003807
N	15	mwghuman30K#A:08043	TNFSF2/TNF-alpha	TNF Superfamily	NM_000594
D	23	mwghuman30K#A:00711	TNFSF5/CD40L	TNF Superfamily	NM_000074
K	18	mwghuman30K#A:05726	TNFSF6/FasL	TNF Superfamily	NM_000639
K	19	mwghuman30K#A:04929	TOLLIP	Signal Transduction	
C	15	mwghuman30K#A:07597	TP53	Cell Cycle Regulators	NM_000546
M	21	mwghuman30K#A:03211	TPM4	cytoskeleton-related protein	NM_003290

Tableau 5 : *Illustration des 250 gènes présents sur une puce à oligonucléotides*

Stratégie expérimentale

La répartition des 250 gènes sur une puce à oligonucléotides est représentée dans le **tableau 6**.

Les oligonucléotides « Arabidopsis » servent de contrôle négatif et permettent d'évaluer le bruit de fond. Seules les intensités des gènes > 2 X le bruit de fond sont analysées.

Les oligonucléotides « gènes de ménage » servent de contrôle positif et permettent de normaliser les intensités brutes issues de la fluorescence mesurées par le scanner (paragraphe 2.6.3).

Afin d'évaluer, d'une part les effets de la CRPp sur le transcriptome du monocyte humain fraîchement purifié, et d'autre part, établir les différences de réponses à la CRPp entre les hommes et les femmes, nous avons entrepris différents types de répétitions.

- *Les répétitions techniques* :

- Dépôts : les oligonucléotides sont déposés en double (répliquât) pour assurer la bonne reproductibilité des résultats. Cela permet d'évaluer la variabilité dans le dépôt d'ADRNa et la non-homogénéité du support.

- Hybridations : chaque hybridation est effectuée en double (2 puces pour 1 échantillon). Cela permet d'évaluer la variabilité entre les hybridations.

- Dye-swaps : chaque ARNa amino allylé est marqué avec un fluorophore distinct Cy3 ou Cy5 en fonction du groupe auquel ils appartiennent (monocytes exposés ou non à la CRPp). Cette étape est répétée mais en inversant le marquage des groupes. Cela permet de diminuer le biais systématique entre les fluorophores (marquage, émission fluorescence…).

- *Les répétitions biologiques* :

- ARN issu de différents individus (6 femmes et 6 hommes)

Limité par le nombre de puces à oligonucléotides à notre disposition (n=25), nous avons travaillé principalement en dye-swaps avec une seule hybridation (2 lames par individus). Les expériences en double hybridation ont été réalisées lors de la mise au point du système sur 1 échantillon (4 lames). Les résultats étant concluants (peu de variabilité entre 2 hybridations identiques), une seule hybridation était suffisante.

Tableau 6 : *Distribution des 250 gènes sur une puce à oligonucléotides*

A24	C24	E24	G24	I24	K24	M24	O24	A23	C23	E23	G23
I23	K23	M23	O23	A22	C22	E22	G22	I22	K22	M22	O22
A21	C21	E21	G21	I21	K21	M21	O21	A20	C20	E20	G20
I20	K20	M20	O20	A19	C19	E19	G19	I19	K19	M19	O19
A18	C18	E18	G18	I18	K18	M18	O18	A17	C17	E17	G17
I17	K17	M17	O17	A16	C16	E16	G16	I16	K16	M16	O16
A15	C15	E15	G15	I15	K15	M15	O15	A14	C14	E14	G14
I14	K14	M14	O14	A13	C13	E13	G13	I13	K13	M13	O13
A12	C12	E12	G12	I12	K12	M12	O12	A11	C11	E11	G11
I11	K11	M11	O11	A10	C10	E10	G10	I10	K10	M10	O10
A9	C9	E9	G9	I9	K9	M9					

B24	D24	F24	H24	J24	L24	N24	P24	B23	D23	F23	H23
J23	L23	N23	P23	B22	D22	F22	H22	J22	L22	N22	P22
B21	D21	F21	H21	J21	L21	N21	P21	B20	D20	F20	H20
J20	L20	N20	P20	B19	D19	F19	H19	J19	L19	N19	P19
B18	D18	F18	H18	J18	L18	N18	P18	B17	D17	F17	H17
J17	L17	N17	P17	B16	D16	F16	H16	J16	L16	N16	P16
B15	D15	F15	H15	J15	L15	N15	P15	B14	D14	F14	H14
J14	L14	N14	P14	B13	D13	F13	H13	J13	L13	N13	P13
B12	D12	F12	H12	J12	L12	N12	P12	B11	D11	F11	H11
J11	L11	N11	P11	B10	D10	F10	H10	J10	L10	N10	P10
B9	D9	F9	H9	J9	L9						

Original

A24	C24	E24	G24	I24	K24	M24	O24	A23	C23	E23	G23
I23	K23	M23	O23	A22	C22	E22	G22	I22	K22	M22	O22
A21	C21	E21	G21	I21	K21	M21	O21	A20	C20	E20	G20
I20	K20	M20	O20	A19	C19	E19	G19	I19	K19	M19	O19
A18	C18	E18	G18	I18	K18	M18	O18	A17	C17	E17	G17
I17	K17	M17	O17	A16	C16	E16	G16	I16	K16	M16	O16
A15	C15	E15	G15	I15	K15	M15	O15	A14	C14	E14	G14
I14	K14	M14	O14	A13	C13	E13	G13	I13	K13	M13	O13
A12	C12	E12	G12	I12	K12	M12	O12	A11	C11	E11	G11
I11	K11	M11	O11	A10	C10	E10	G10	I10	K10	M10	O10
A9	C9	E9	G9	I9	K9	M9					

B24	D24	F24	H24	J24	L24	N24	P24	B23	D23	F23	H23
J23	L23	N23	P23	B22	D22	F22	H22	J22	L22	N22	P22
B21	D21	F21	H21	J21	L21	N21	P21	B20	D20	F20	H20
J20	L20	N20	P20	B19	D19	F19	H19	J19	L19	N19	P19
B18	D18	F18	H18	J18	L18	N18	P18	B17	D17	F17	H17
J17	L17	N17	P17	B16	D16	F16	H16	J16	L16	N16	P16
B15	D15	F15	H15	J15	L15	N15	P15	B14	D14	F14	H14
J14	L14	N14	P14	B13	D13	F13	H13	J13	L13	N13	P13
B12	D12	F12	H12	J12	L12	N12	P12	B11	D11	F11	H11
J11	L11	N11	P11	B10	D10	F10	H10	J10	L10	N10	P10
B9	D9	F9	H9	J9	L9						

Réplicat

Sous-grille de la puce à oligonucléotides
Arabidopsis - contrôle négatif
Gène de ménage - contrôle positif

2.6.2 Préparations des ARN totaux

2.6.2.1 Extraction des ARN totaux au Trizol

Une méthode dérivée de la technique de Chomczynski et al. (Chomczynski P. and Sacchi N. 2006) permet d'isoler à la fois les ARN totaux, l'ADN et les protéines. L'agent de lyse cellulaire employé est le Trizol® Reagent (GibcoBRL), solution de phénol et d'isothiocyanate, qui permet de détruire les membranes et dissoudre les composants cellulaires tout en maintenant l'intégrité des ARN.
Après lyse des monocytes avec 1 ml de Trizol et ajout de 0.2 ml de chloroforme (Sigma), le mélange est centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes. Les ARN totaux issus de la phase aqueuse sont précipités avec 0.5 ml d'isopropanol (Sigma) en présence de 20 µg de glycogène (Roche). Après incubation à température ambiante pendant 10 minutes et centrifugation à 12000g à 4°C pendant 10 minutes, les ARN totaux sous forme de culot sont lavés dans 1 ml d'éthanol 75%, centrifugés à 7500g à 4°C pendant 5 minutes, séchés à l'air libre quelques minutes puis dissous dans 7 µl d'eau traitée DEPC.

6.6.2.2 Digestion de l'ADN contaminant à la DNase I

Un traitement des ARN totaux à la DNase I permet d'éliminer toutes traces d'ADN contaminant.

Les ARN totaux sont digérés par un mélange réactionnel (4.5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) en présence de 2 U de DNase I RNase free (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne) et dans un volume final de 10 µl. Le tout est incubé à 30°C pendant 30 minutes. Les ARN totaux sont purifiés par une première étape de centrifugation à 5200 g pendant 2 minutes en présence de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1) (Invitrogen) à volume égal. Les ARN totaux, issus de la phase aqueuse, sont ensuite lavés par une seconde étape de centrifugation à 5200 g pendant 1 minute en présence du mélange chloroforme/isoamylalcool (24:1). Les ARN totaux de la nouvelle phase aqueuse sont alors précipités en présence d'1/10 de volume de NaCl (3 M) et deux volumes d'éthanol 100% à – 20°C pendant 12 heures. Après centrifugation à 14000 g à 4°C pendant 10minutes, le culot d'ARN est lavé dans 500 µl d'éthanol 70% puis centrifugé à nouveau dans les mêmes

conditions. Le culot d'ARN est alors séché à l'air libre puis dissous dans 10µl d'eau traitée DEPC.

2.6.2.3. Mesure de la concentration et vérification de l'intégrité des ARN totaux

La concentration des ARN totaux est mesurée en double après dilution dans une solution du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 7.5). A l'aide du biophotomètre (Ependorf), plusieurs mesures de densité optique (DO) sont effectuées:

-la DO à 260 nm détermine la concentration des ARN totaux à l'aide de la formule suivante :

[ARN totaux] = 40 x DO mesurée x Facteur de dilution

-la DO à 280 nm reflète la contamination protéique
-la DO à 230 nm reflète la contamination phénolique

Le rapport R = DO260/DO280 permet d'estimer la pureté des ARN. On estime que les ARN totaux sont purs si $1.8 \leq R \leq 2.1$

Afin de vérifier l'intégrité des ARN totaux, ceux ci sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.38% préparé avec un mélange de tampon MOPS 1X (40 mM MOPS pH 7.0, 10mM acétate de sodium, 1 mM EDTA) et de formaldéhyde (2.2 mM). Un µg d'ARN total dissous avec une solution dénaturante (1X MOPS, 1.94 M formaldéhyde, 43 % formamide) dans un volume final de 14.25 µl est dénaturé à 55°C pendant 15 min. Après ajout de 0.75µl de solution de migration (1 mM EDTA, 0.25 % bleu de bromophenol, 0.25 % xylène cyanol, 50 % glycérol, 60 µg/ml bromure d'éthidium), les ARN totaux migrent à 40V pendant 3h. Le gel est décoloré dans deux bains successifs d'eau traitée DEPC, l'un pendant 30 min, l'autre pendant 12 h afin de visualiser sous les UV les ARN totaux. Ces derniers, de bonne intégrité, apparaissent sous la forme de trois bandes principales correspondant aux ARN ribosomaux (ARNr) 28S, 18S et 5S ; la bande 28S étant environ deux fois plus intense que celle d'ARN 18S. La présence d'une bande 5S intense ou de bandes intermédiaires est le signe d'une dégradation des ARN totaux **(Figures 18 et 19)**.

Echantillons	1	1	2	2
CRP 25 µg/ml	-	+	-	+

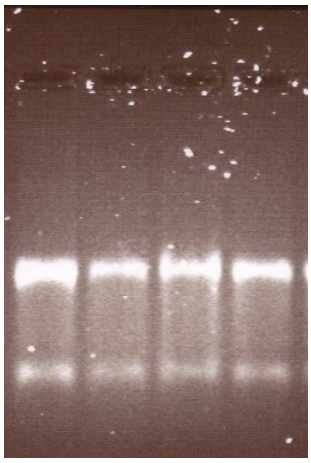


Figure 18: *Profil des ARN totaux des monocytes mis en culture et traités ou non avec la CRP (25 µg/ml) pendant 24 h*

Un µg d'ARN total a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose-formaldéhyde puis visualisé sous UV avec le Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Les bandes les plus intenses correspondent successivement aux ARNr 28S et 18S.

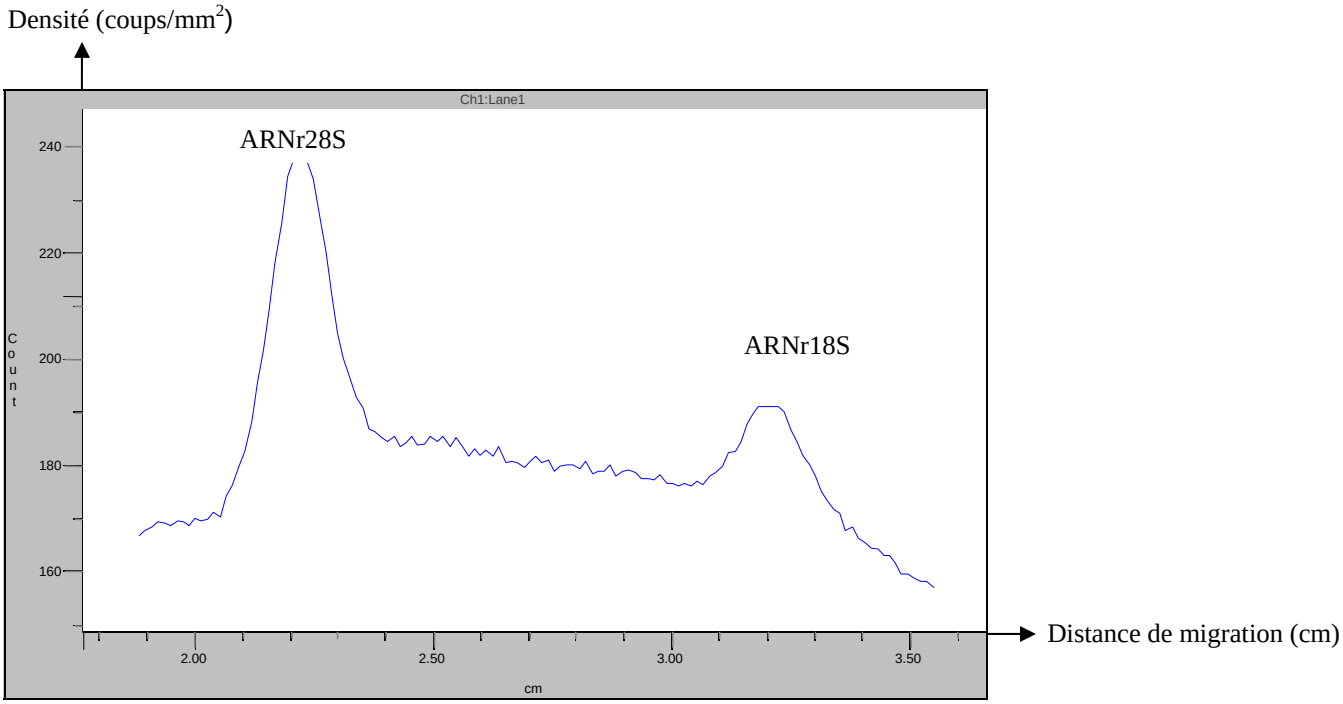


Figure 19 : *Profil de la densité des ARN totaux de monocytes mis en culture et non traités avec la CRPp*

La densité des ARN totaux est mesurée en fonction de leur distance de migration à l'aide du logiciel Multi Analyst (Bio-Rad).

2.6.2.4 Amplification des ARNm en ARN amplifié amino allylé (ARNa amino allylé)

Une étape d'amplification spécifique des ARNm en ARNa amino allylé est nécessaire pour deux raisons. La première concerne la quantité importante d'ARNm à hybrider sur la puce à ADN, c'est à dire 10 µg. La deuxième est liée au type de marquage aux fluorophores Cy3 / Cy5, que nous avons choisi, indirect pour des raisons de sensibilité et de reproductibilité. L'amplification est réalisée à l'aide du kit Amino Allyl Message Amp aRNA Kit (Ambion) **(figure 20)**.

Le 1er brin d'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir de 3 µg d'ARN total en présence d'1 µl d'oligonucléotides T7 oligo(dT) et incubé dans un thermocycleur (iCycler BioRad) à 70°C pendant 10 mn dans un volume final de 12µl. La transcription inverse des ARN totaux en ADNc s'effectue à l'aide d'une solution de transcription inverse (10X tampon 1er brin 2µl, dNTP mix 4µl, inhibiteur de RNase 1µl) en présence d'1 µl de transcriptase inverse à 42°C pendant 2 h.

Le second brin d'ADNc est synthétisé à partir du premier brin d'ADNc à l'aide d'une solution de polymérisation (10X tampon 2ème brin 10 µl, dNTP Mix 4 µl, RNase H 1 µl) en présence de 2 µl d'ADN polymérase et dans un volume final de 100 µl à 16°C pendant 2h. L'ADNc double brin est purifié à l'aide d'une cartouche à filtre ADNc conformément aux instructions du fournisseur. Il est alors concentré à un volume final de 14 µl à l'aide d'un concentrateur (Eppendorf Concentrator 5301).

La transcription *in vitro* de l'ADNc double brin en ARNa amino allylé est réalisée à l'aide d'une solution de transcription (3.75 mM aaUTP, 7.5 mM ATP CTP GTP Mix, 3.75 mM UTP, 1X tampon réactionnel) en présence de 4 µl de mélange enzymatique T7 dans un volume final de 40 µl à 37°C pendant 14 h. L'ADNc est digéré en présence de 2 µl de DNase I à 37°C pendant 30 min. L'ARNa amino allylé est purifié à l'aide d'une cartouche à filtre ARNa conformément aux instructions du fournisseur.

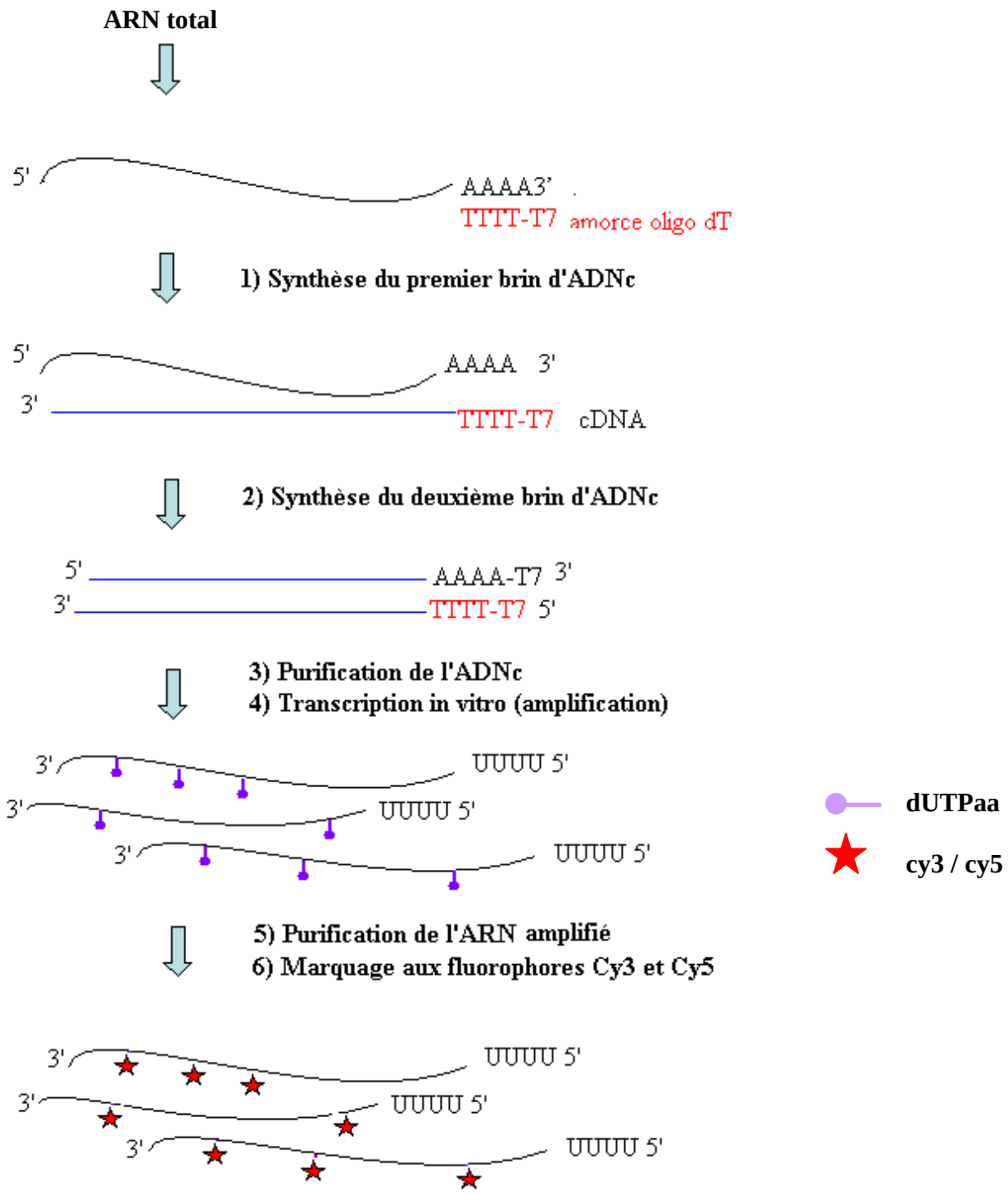


Figure 20 : *Amplification des ARNm et marquage aux fluorophores Cy3 / Cy5*

Les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc par la reverse transcriptase avec une amorce oligo(dT), puis polymérisés sous forme d'ADN double brin. Les ADNc obtenus sont purifiés puis transcrits en ARN amplifié par l'ADN polymérase T7 qui reconnaît le promoteur T7 ajouté à l'amorce oligo(dT). L'ARN amplifié est amino allylé (aa) par l'incorporation de dUTPaa puis marqué par aux fluorophores cy3/cy5 par une réaction de couplage.

2.6.2.5 Marquage de l'ARNa amino allylé aux fluorophores cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5)

Les groupements amino allylés réagissent avec les groupements succinamides ester des fluorophores Cy3 et Cy5. Ceci permet d'obtenir un marquage plus uniforme des ARN amplifiés qu'avec un marquage direct. Vingt µg d'ARNa amino allylé sont concentrés à un volume final de 7 µl. Quatre µl de fluorophores Cy3 ou Cy5 (Amersham Biosciences) dilués dans du DMSO (0.6 mM) sont couplés aux ARNa amino allylés en présence du tampon de couplage (0.09 mM bicarbonate de sodium pH 8.0) dans un volume final de 20 µl et sont incubés à l'obscurité pendant 30 min (**Figure 21**). La réaction de couplage est arrêtée par l'hydroxylamine (0.73 M) dans un volume final de 24.5 µl suivie d'une incubation dans le noir pendant 15min. La purification de l'ARNa amino allylé couplé Cy3 / Cy5 est réalisée en utilisant le kit High Pure RNA Tissue Kit (Roche) afin d'éliminer les fluorophores non couplés, ceci conformément aux instructions du fournisseur. La concentration de l'ARNa amino allylé couplé Cy3 / Cy5 est mesurée à l'aide du biophotomètre après dilution au 1/20ème dans du tampon TE.

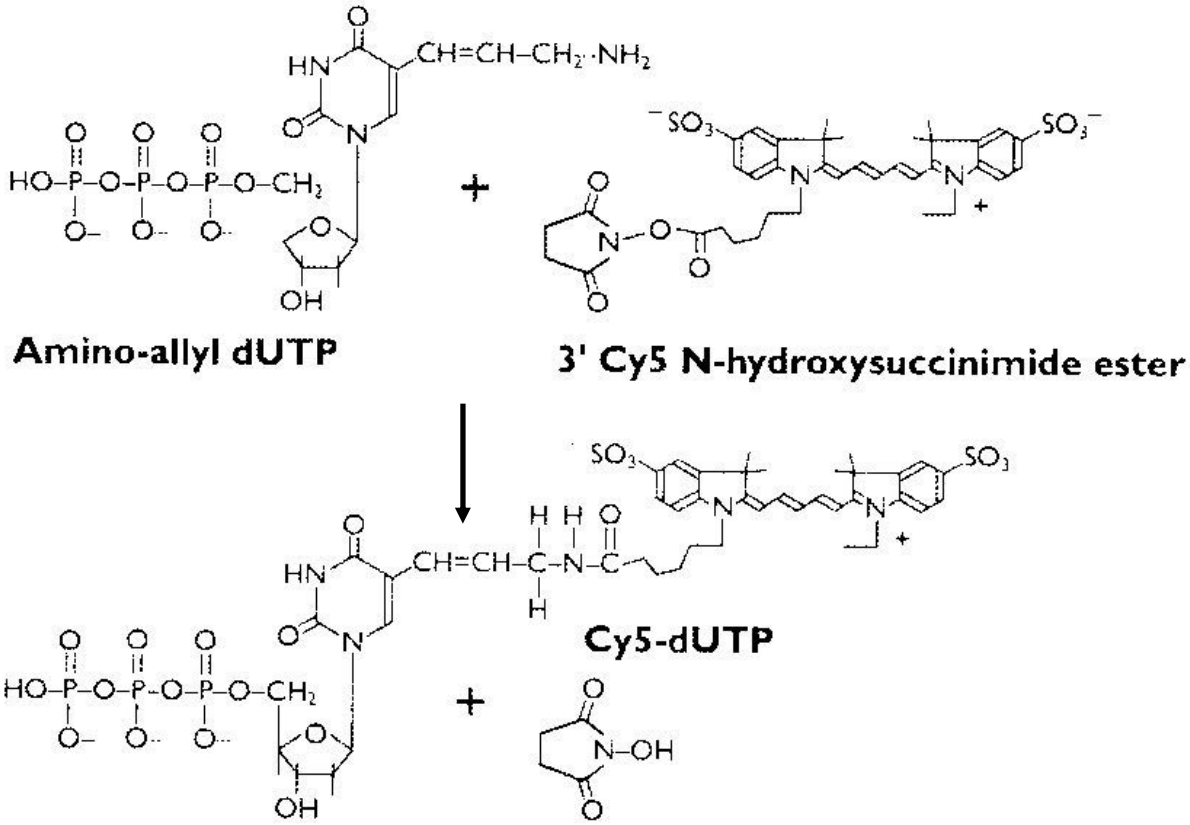


Figure 21: *Réaction de couplage entre le fluorophore cyanine 5 et le dUTP amino allylé*

Les groupements amino allylés réagissent avec les groupements succinamides esters de la Cy5.

2.6.2.6 Fragmentation de l'ARNa amino allylé couplé Cy3 ou Cy5

Dix µg d'ARNa amino allylé couplés Cy3 (témoin) sont incubés avec 10 µg d'ARNa amino allylé couplés Cy5 (échantillon) en présence d'un tampon de fragmentation (5 mM Tris-acétate pH 8.1, 10 mM acétate de potassium, 3 mM acétate de magnésium) dans un volume final de 40 µl à 94° pendant 15 mn à l'aide du thermocycleur. Les sels sont éliminés en purifiant l'ARNa amino allylé couplé Cy3 / Cy5 fragmenté sur un concentrateur Microcon avec une première étape de centrifugation à 8600 g pendant 15 min suivie d'une deuxième étape de centrifugation du Microcon retourné à l'envers à 600 g pendant 3 min. L'éluât est concentré à l'abri de la lumière pendant 30 min à 30°C à l'aide du concentrateur (Ependorf), puis dissous dans un volume final de 120 µl de milieu d'hybridation (2.5 mM tampon phosphate pH 8, 25 % formamide, 1.8x SSC (27 mM citrate de sodium, 0.27 M chloride de sodium pH 7.0), et 1X Denhardt, 0.025% SDS).

2.6.2.7 Hybridation de l'ARNa amino-allylé couplé Cy3 / Cy5 et lavages

Le mélange réactionnel est incubé à 95°C pendant 3 min à l'aide du thermocycleur puis déposé sur la puce à ADN. La zone de dépôt est localisée à l'aide d'un modèle (Array-Finder), puis délimitée sur la lame par un cadre de polyester adhésif. Les ARNa amino allylés couplés Cy3 / Cy5 s'hybrident alors sur les oligonucléotides sous une membrane plastifiée adhérente au cadre de polyester. La puce à ADN est incubée dans une chambre d'hybridation humide plongée dans un bain-marie à 42°C pendant 24h. La lame est lavée pendant 5 min dans trois milieux de lavage préchauffés à 30°C, successivement dans le milieu de lavage A (2x SSC, 0.1% SDS), B (1x SSC) et C (0.5x SSC). La puce à ADN est enfin séchée par centrifugation à 500 g pendant 3 min.

2.6.3 Lecture de la puce à oligonucléotides, analyse d'images et normalisations

La détection au laser de la fluorescence émise par les fluorophores Cy3 et Cy5 est effectuée par la société MWG-Biotech en Allemagne à l'aide du scanner à micropuce « Affymetrix 428 Array Scanner » (Affymetrix Bedford USA, MWG-Biotech). L'analyse d'images et l'obtention des données brutes sont réalisées également par la société MWG-Biotech à l'aide du logiciel de lecture Imagene™ (BioDiscovery, El Segundo, USA) et du logiciel de préanalyse des données MAVI Pro 2.6.0. (MWG). L'intensité des signaux émis par les fluorophores Cy3 et Cy5 est analysée avec le logiciel Imagene™. La **figure 22** représente l'image d'une puce à oligonucléotides analysée à 2 canaux de lecture différents Cy3 et Cy5.

Une procédure de prénormalisation des données brutes des puces scannées avec une gamme de gains d'amplification différente est effectuée par le logiciel MAVI Pro 2.6.0. En effet, bien que les profils d'expression des puces puissent apparaître similaires, il y a toujours de légères différences au niveau de la luminosité des 2 images. Par exemple, la moyenne des intensités émises par la puce dans le canal de lecture Cy3 peut être plus forte que dans le canal de lecture Cy5. Ceci n'est pas lié au fait que tous les gènes de l'échantillon marqué Cy3 sont surexprimés, mais à l'existence de facteurs de biais qui peuvent être multiples et dépendants d'une part du support (variations constatées, pour une même sonde, entre plusieurs puces, ou à l'intérieur d'une même puce) et d'autre part, des marqueurs (biais apporté par le marqueur (Cy3, Cy5) associé aux cibles cDNA).

Parmi les facteurs de biais qui touchent le support, certains peuvent affecter :

- l'hybridation : quantité de sonde présente à chaque spot (efficacité de liaison au support, matériel de spotting…), conditions d'hybridation (température, hygrométrie…).
- le signal : forme du spot (ex : acquisition par optique confocale, affectée par la courbure de chaque spot), le bruit de fonc, artéfacts (poussières…)

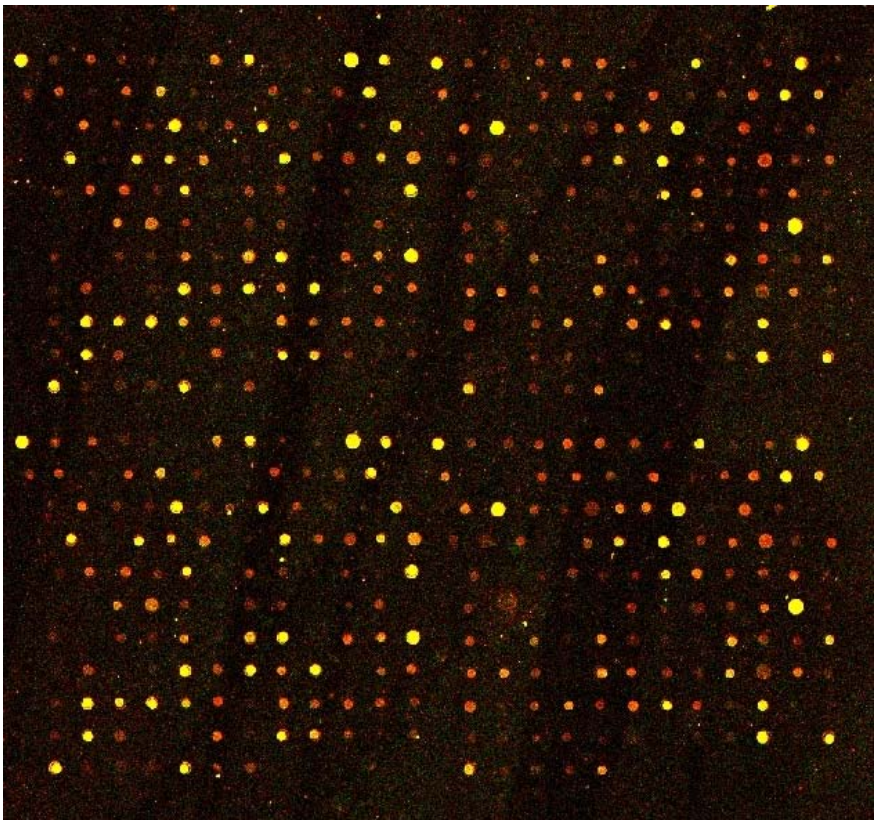


Figure 22 : *Lecture d'une puce à oligonucléotides par le scanner à micropuce « Affymetrix 428 Array Scanner »*

La détection laser de la fluorescence émise par la cyanine-3 et la cyanine-5 est effectuée à l'aide d'un scanner confocal qui excite les marqueurs cyanine aux longueurs d'onde appropriées. La cyanine-3 est de couleur verte alors que la cyanine-5 est de couleur rouge.

Parmi les facteurs de biais qui touchent les marqueurs, certains peuvent affecter :

- l'intensité du signal : intrinsèque (énergie de désintégration), mesurée (efficacité du matériel de détection).
- interactions entre le marqueur et la sonde : incorporation préférentielle de l'un des deux marqueurs lors de la rétro-transcription.

Le but de la normalisation est de s'affranchir de ces facteurs de biais, et ainsi s'assurer de la qualité des données pour une puce en particulier et pouvoir comparer plusieurs puces utilisant le même ensemble de gènes et partageant une même condition expérimentale en double-marquage.

Le logiciel MAVI® élimine ces artéfacts à travers la normalisation afin de rendre les intensités comparables entre elles. Plusieurs méthodes de normalisation existent, et elles peuvent être utilisées sur tous les spots d'intensité de la puce à oligonucléotide ou bien seulement sur un groupe spécifié de spots appartenant à la famille des gènes dits « gènes de ménage ».

L'intensité des spots issue d'une amplification spécifique est calculée par régression linéaire du logarithme népérien des signaux émis. L'algorithme utilisé par le logiciel MAVI conduit à rendre symétrique la distribution des ratios (CRP / T) en se basant sur le logarithme naturel des ratios. Puis la moyenne est calculée et l'exposant de la valeur résultante est pris comme paramètre de normalisation. Cette normalisation par décalage de la moyenne entraîne un racadrage de la moyenne des ratios à 0 par addition d'un facteur. Ceci en se basant sur l'hypothèse d'une distribution normale parfaite.

Dans le contexte de notre étude, puisque nous avons fait le choix de travailler avec une puce à oligonucléotides faite à façon (gènes choisis en fonction de la littérature), nous n'avons pas normalisé en utilisant le logarithme naturel de l'ensemble des ratios calculés, mais en restreignant notre calcul de normalisation à travers un sous-groupe de gènes. Ainsi, l'expression des ratios mesurés pour un gène spécifique sur une puce est normalisée via la moyenne des ratios d'expression génique de 3 gènes de ménages (GAPDH X01677, Tubuline NM_004389 et Beta actine NM_014183). Ainsi, au lieu de baser la normalisation sur les propriétés (hypothétiques) de la distribution des données, on les compare à un même étalon interne.

Les gènes de ménage ou « House-keeping genes » sont des gènes connus pour leur absence de modulation (ou présumés comme tels) dans les conditions expérimentales testées.

Seuls les gènes avec des intensités pré normalisées supérieures à 2X ou plus celles du bruit de fond (déterminé par l'intensité des spots « Arabidopsis ») et détectées en duplicate sur une puce à oligonucléotides sont étudiés.

Ensuite, le ratio d'expression génique de chaque échantillon est calculé en utilisant la moyenne des ratios normalisés de chaque puce à oligonucléotides (2, 4 ou 8 valeurs par expérience) pour un échantillon d'ARN spécifique (CRPp / T).

2.6.4 Exploitation statistique des données

Les analyses statistiques sont faites seulement sur les gènes dont les signaux d'hybridation sont détectables dans un minimum de 50% des expériences (N=3 valeurs au minimum sur 6).

Le but est de calculer pour chaque gène une statistique qui correspond à sa probabilité d'être différentiellement exprimée. Puisque seules deux conditions expérimentales sont analysées (monocytes exposés à la CRPp versus non exposés à la CRPp), et que l'identification des gènes impliqués se base sur le seuil des ratios, le test statistique t apparié de Student est utilisé.

Les résultats sont exprimés en moyenne des ratios de chaque gène issus de chaque expérience. Pour identifier les gènes surexprimés ou sous exprimés chez le monocyte humain exposé à la CRPp, les données sont mélangées pour les hommes et pour les femmes et sont soumises au test-t apparié (TMEV) à la fois pour le groupe des hommes et pour le groupe des femmes. Le risque d'erreur α est établi à 0.05. L'analyse de l'expression différentielle génique entre le groupe des monocytes hommes et femmes exposés à la CRP est effectuée à l'aide du test-t non apparié.

2.7 Mesure de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel

2.7.1 Préparation des ARN totaux

Les ARN totaux sont préparés de la même manière que précédemment (paragraphe 5.1).

2.7.2 Transcription inverse ou reverse transcription des ARN totaux en ADNc

La transcription inverse est effectuée à l'aide du kit « Omniscript » (Quiagen).
Deux µg d'ARN totaux sont incubés avec une solution de transcription inverse (1X tampon RT, 0,5 µM dNTP, 1 µM oligo$(dT)_{15}$) (Roche, Allemagne), en présence de 10 U d'inhibiteur de RNase (Fermentas) et de 4 U de transcriptase inverse « Omniscript » dans un volume final de 20 µl, à 37°C, pendant 60 min à l'aide du thermocycleur « iCycler » (BioRad, Etats-Unis). La transcriptase inverse est alors dénaturée à 93°C pendant 5 min.

2.7.3 PCR quantitative en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel est fondé sur la détection et la quantification d'un « reporter fluorescent ». L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons (produits d'amplification) générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction de PCR durant sa phase exponentielle, où la première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Poitras E. and Houde A. 2002).

La PCR quantitative en temps réel est réalisée sur le Light Cycler (Roche). Cet instrument permet à la fois d'amplifier le gène cible afin de le quantifier et de contrôler la spécificité du gène cible amplifié grâce à la température de fusion des amplicons formés. Le principe de détection utilisée est basée sur les propriétés du SYBR Green I (Morrison T.B. *et al.*. 1998), agent se liant à l'ADN double brin. En effet, lors de la PCR, le colorant libre en solution émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence observée est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Cette augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation, alors

qu'il décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Par conséquent, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles, par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel, qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction **(figure 23)** (Bustin S.A. 2000).

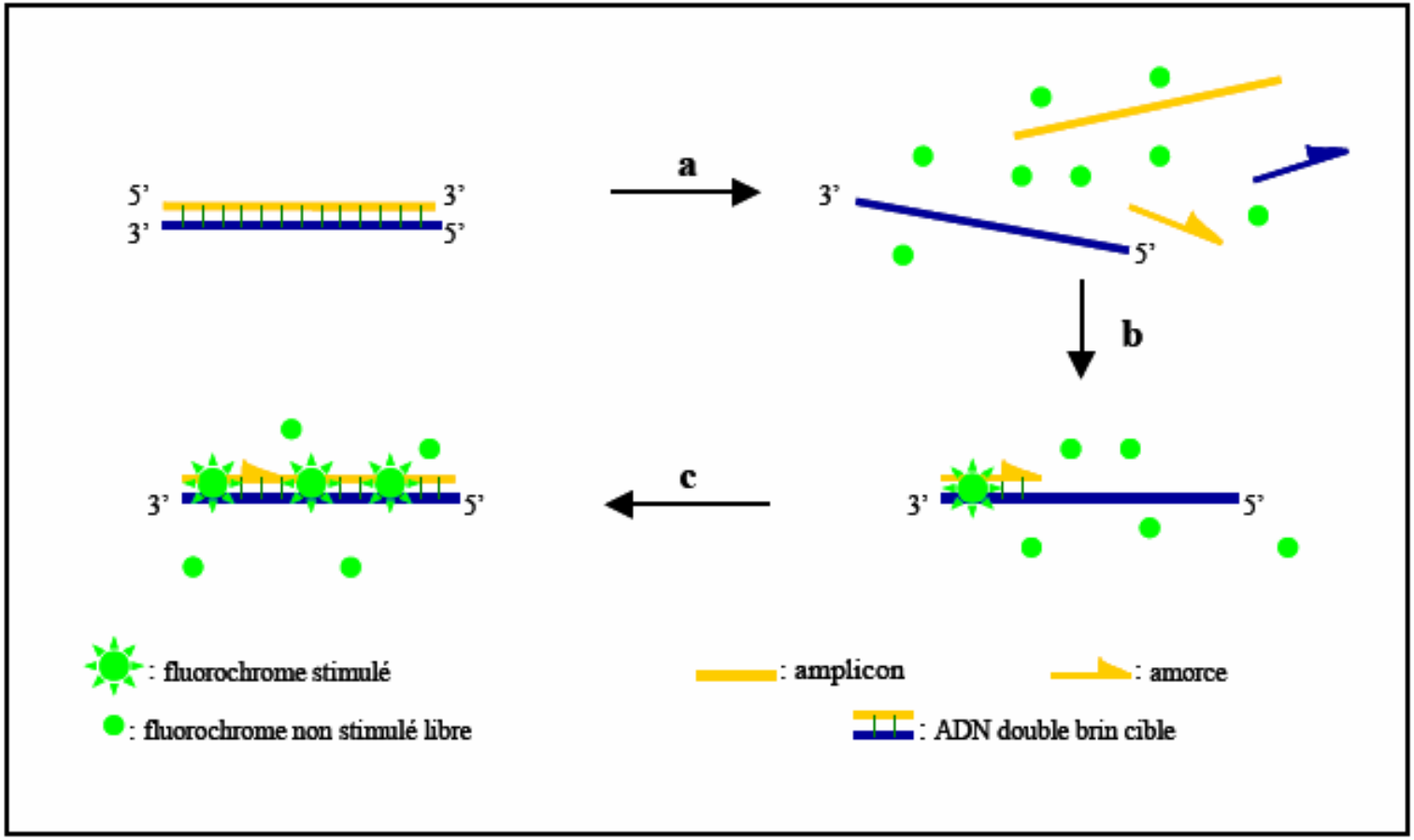


Figure 23 : *Principe d'incorporation du SYBR Green I à l'ADNc double brin*

(**a**) Durant la dénaturation, le SYBR Green I émet peu de fluorescence. (**b**) À la température de fusion, quelques molécules se lient à l'ADN double brin naissant produisant ainsi de la fluorescence lors de l'excitation. (**c**) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être ainsi suivi en temps réel.

2.7.4 Choix des amorces

La conception ou « design » des amorces a été réalisée à l'aide des logiciels « Primer 3 » (www.web.umassmed.edu/bioapps/primer3) et « Eclipse-MGB Design System » (www.eclipse.epochbio.com/eclipse) en fonction de différents critères :

- la taille de l'amplicon doit être comprise entre 100 et 200 paires de base (pb).
- le pourcentage des bases GC doit être supérieur à 40%.
- les amorces doivent être strictement complémentaires et spécifiques de la séquence cible, et ne pas former d'hetéroduplex ou de mésappariement ou « mismatch » entre elles.
- la température de fusion (Tm) de l'amorce doit être environ égale à 60°C.

La liste des amorces utilisées en PCRq en temps réel est présentée dans le **tableau 7**.

2.7.5 Mise au point de l'efficacité de la PCR et quantification des échantillons

Il est nécessaire d'obtenir une efficacité de la PCR comprise entre 85 et 100 % afin de comparer l'expression des gènes entre les différents échantillons. Cette efficacité se détermine à l'aide d'une courbe étalon de quantité décroissante d'ADNc et des valeurs de « cycle seuil » (Ct). Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits à un point précis durant la réaction **(Figure 24)**. Plus il y a de matrices à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification.

La pente (slope) de la droite étalon (Ct = slope x log [ADNc]) renseigne sur l'efficacité de la PCR qui est déterminée par la formule $E = 10^{-1/slope}$ et doit être comprise entre 1.7 (85 % d'efficacité) et 2 (100 %).

Les Ct mesurés pour un gène cible spécifique sont normalisés à l'aide d'un gène de ménage (à expression constitutive stable) en raison des quantités variables d'ARN totaux rétro transcrit en ADNc.

Tableau 7 : *Paire d'amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel*

Nom de l'amorce et N° d'accession	Sequence (5'-3')	Efficacité de PCR
HS RPS29, NM 001032	f: AAGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG	1.83
	r: AGACACGACAAGTCGGAGAA	
HS Alpha 2 macroglobuline, NM 000014	f: TTCAGGAGCTCTGGGTCACT	1.92
	r: CTGTCTTCCAGGCTGACTCC	
HS IL-1alpha, NM 000575	f: TGCCTGAGATACCCAAAACC	1.89
	r: GATGGGCAACTGATGTGAAA	
HS IL-1beta, NM 000576	f: GTCAGCTCTCTCCTTTCA	1.77
	r: AATGTGGCCGTGGTTTCT	
HS IL-6, NM 000600	F: CCACACAGACAGCCACTCAC	1.84
	r: AGGTTGTTTTCTGCCAGTGC	
HS TNFalpha, NM 000594	f: AGGCGGTGCTTGTTCCTCA	1.89
	r: GTTCGAGAAGATGATCTGACTGCC	
HS Gro beta, NM 002089	f: CCCAAACCGAAGTCATAG	1.9
	r: CAGGAACAGCCACCAATAAG	
HS IL-8, NM 000584	f: CTCCCAGTCTTGTCATTG	1.86
	r: CTGTGGAGTTTTGGCTGTTTT	
HS MIP-1 alpha, NM 002983	f: TGCTCAGAATCATGCAGGTC	1.86
	r: GGGAGGTGTAGCTGAAGCAG	
HS MIP-1 beta, NM 002984	f: AGCAAGCAAGTCTGTGCTGA	1.81
	r: CAGGTGACCTTCCCTGAAGA	
HS Adrenomedullin, NM 001124	f: ACTTCGGAGTTTTGCCATTG	2.06
	r: AGCGAACCCAGGTACATCAG	
HS PAI-2, NM 002575	r: CAGACAGCAACTCAGAGAA	2.03
	f: TGCCACACAAAGATCCTCCA	
HS LXR alpha, NM 005693	f: CCGCCTGAAGAAACTGAA	1.93
	r: CGAAGCCGGTCAGAAAAG	
HS LXR beta, NM 007121	f: CGCTACAACCACGAGACAGA	1.92
	r: GTGGAAGTCGTCCTTGCTGT	
HS ABCA1, NM005502	f: CAACAGTTTGTGGCCCTTTT	1.87
	r: GACAAACACAGCTGGCAAGA	

L'index d'accumulation des transcrits (TAI en unité arbitraire) ou ratio détermine l'expression relative d'un échantillon par rapport à un témoin. Ce dernier représente la valeur d'expression de chaque gène.

Le TAI est calculé d'après la formule $TAI = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ où :

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gene de ménage) échantillon}} - (Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de ménage) témoin}}$.

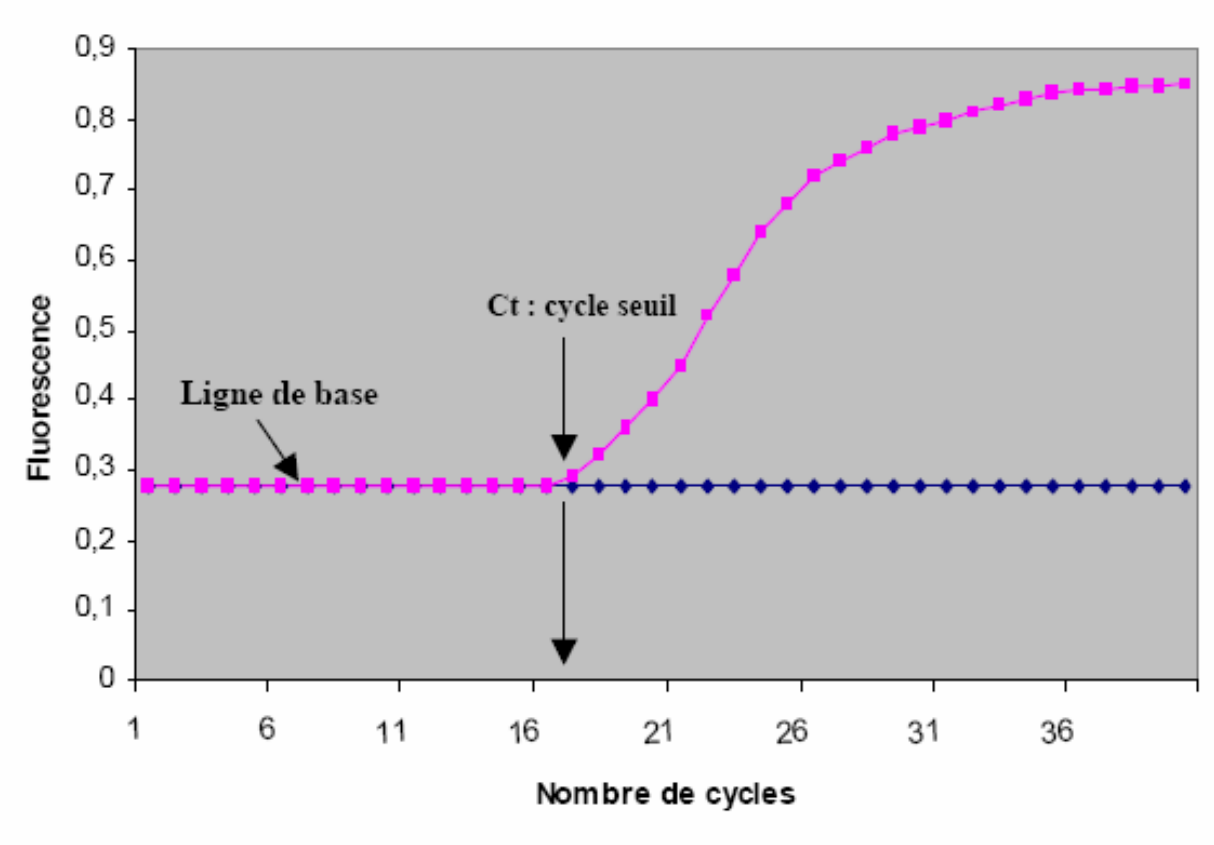


Figure 24 : *Modèle graphique de la PCR quantitative en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles*

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est significativement plus élevé que la ligne de base (Poitras E. and Houde A. 2002).

En raison des différences d'efficacité de la PCR entre le gène cible et le gène de ménage, un coefficient correcteur d'efficacité est pris en compte dans la mesure de l'expression relative à l'aide du logiciel « Relative Quantification Software » (Roche, Allemagne).
A l'aide du kit « QuantiTect SYBR Green PCR » (Quiagen, Allemagne), 1 µl d'ADNc est amplifié avec une solution de PCR quantitative en temps réel (1X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 µM oligonucléotide sens, 0,5 µM oligonucléotide antisens) dans un volume final de 20 µl à l'aide du thermocycleur Light Cycler (Roche). Les conditions d'amplification sont celles indiquées par le fournisseur (Quiagen), avec une température d'hybridation = Tm – 5°C.

2.7.6 Spécificité des produits de la PCR

La spécificité des amplicons est déterminée par leur Tm, température à laquelle 50 % de l'ADNc est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Le Tm est mesuré lors de l'étape de fusion des amplicons, et correspond à la valeur la plus élevée de la dérivée de la fluorescence / dérivée de la température. Le Tm mesuré doit être équivalent au Tm attendu par le calcul. La taille du fragment amplifié est contrôlée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire. 10 µl de produit de la PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 2 % (agarose (Sigma), 1X tampon TAE, 60 µg/ml bromure d'ethidium) sous un champ électrique de 75 V pendant 60 mn. Les amplicons sont visualisés sous UV à l'aide de l'appareil Gel Doc 1000 (BioRad, Etats-Unis).

2.8. Immunotransfert des protéines nucléaires et totales par Western Blotting

Les protéines totales des monocytes humains obtenues sous forme de culot sec suite à l'extraction au Trizol (Invitrogen Corporation) sont resuspendues dans du tampon Laemmli. L'extrait des protéines totales des THP-1 est obtenu en utilisant un tampon de lyse cellulaire (Cell Signalling) contenant une mixture d'inhibiteurs de protéases (Roche Molecualr Biochemicals) durant 15 min dans la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 16000 g pendant 15 min.

Les extraits nucléaires sont préparés à partir de $9x10^4$ monocytes humains (24 h) ou $6x10^4$ THP-1 (4h, 8h et 24h). Ces cellules sont lavées dans du PBS puis incubées dans la glace pendant 10 min avec 200 µl de tampon contenant 10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl, 10

mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), et 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). 1% Nonidet P-40 (0.1 volume) est ensuite ajouté à ces cellules, suivi d'une centrifugation à 350x g à 4 °C pendant 2 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse (20 mM Hepes, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM PMSF, et 0.5 mM DTT). Après 15 min d'incubation sous agitation à 4 °C, le lysat est centrifugé à 16000 g durant 10 min. Les concentrations protéiques sont mesurées par le Kit DC protein Assay (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France).

Des quantités égales de protéines sont mélangées dans le tampon Laemmli, chauffées à 100°C pendant 5 min, déposées sur un gel de polyacrylamide-SDS (10%) et transférées sur des membranes en PVDF (Millipore).

Pour déterminer la présence de LXRα, les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-LXRα de lapin (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), suivi par l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxidase (Jackson Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, USA).

Pour établir un contrôle positif de détection de la protéine LXRα, les protéines totales de foie de rat sont également préparées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, les résultats sont présentés sous forme de deux parties avec, d'une part, l'analyse des effets de la CRPp sur l'expression génique des monocytes humains, et d'autre part, les effets de la CRPp sur l'expression et l'activation du LXRα.

ETUDE 1 : Analyse des effets de la Protéine C – Réactive sur la biologie des monocytes dans l'athérosclérose à travers une approche de puces à oligonucléotides et de PCR quantitative en temps réel

1. Conditions expérimentales

1.1 Effets de la sélection positive CD14+ sur l'activation des monocytes

A cause de l'activation possible des monocytes suite à l'isolement des cellules par sélection positive CD14+, nous avons évalué le degré d'activation en quantifiant de manière relative l'expression des ARNm des gènes pro inflammatoires IL-1α, IL-6 et TNF-α immédiatement après l'isolement des monocytes et 20h après la mise en culture.

L'expression des ARNm de ces cytokines diminue de manière significative au bout de 20h de mise en culture (**Figure 25**) et reste inchangée jusqu'à 48h (données non montrées). Nos résultats sont en accord avec ceux de Barth et al., qui ont montré que l'isolement des cellules mononucléaires induit une augmentation de l'expression de certains ARNm tels que celui du TNFα et IL6, marqueurs du monocyte activé (Barth S. *et al.* 2000).

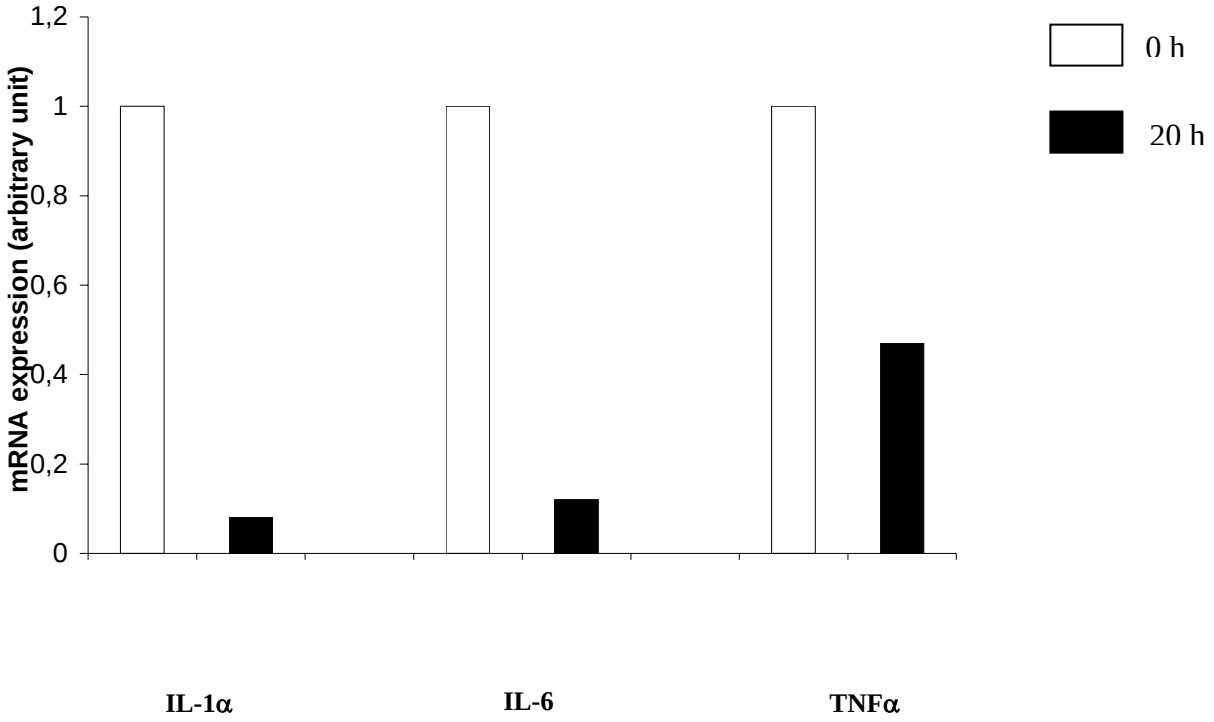


Figure 25 : *Différence d'expression relative des ARNm d'IL-1α, IL-6 et TNFα entre l'isolement des monocytes (0h) et la mise en culture pendant 20h*

Les monocytes fraîchement isolés (0h) sont suspendus dans un milieu de culture standard en présence de sérum AB 1% et incubés comme décrit dans le matériel et méthodes pendant 20h. Aux temps indiqués (0h et 20h), le niveau d'expression d'ARNm de cytokines pro inflammatoires est analysé par PCR quantitative en temps réel (n=3).

1.2 Interactions entre la CRP et des contaminants potentiels

Des études préliminaires ont été effectuées sur les préparations de CRPp et CRPr afin de s'assurer que les effets observés de la CRP ne soient pas imputés à des contaminants potentiels. Au moins 3 sont décrits dans la littérature :

- les immunoglobulines (Hundt M. *et al.* 2001; Stein M.P. *et al.* 2000).
- le LPS (Taylor K.E. *et al.* 2005).
- l'azide de sodium (Liu C. *et al.* 2005).

Les effets potentiels d'immunoglobulines contaminantes ont été analysés en étudiant si les effets de la CRPp pouvaient être reproduits par la CRPr chez les monocytes humains et les cellules THP-1. La CRPr a des effets plus importants sur l'expression de l'ARNm de cytokines pro-inflammatoires que la CRPp chez les deux types cellulaires (données non montrées). Ces résultats suggèrent que les effets de la CRPp peuvent être reproduits par la CRPr et par conséquent, que les effets de la CRPp ne sont pas dus à des immunoglobulines contaminantes.

Les cellules THP-1 incubées avec la CRPr (25µg/ml) pendant 24h, en l'absence de polymyxine B, sont caractérisées par une expression de leur ARNm de la cytokine pro-inflammatoire IL-1α augmentée de 24 fois comparée aux cellules non exposées ($p<0.01$). Dans les mêmes conditions, mais en présence de polymyxine B, l'expression du transcrit d'IL-1α est de 1.56 fois ($p<0.01$). A contrario, la présence ou l'absence de polymyxine B n'a aucun effet sur l'expression de la cytokine quand les cellules sont exposées à la CRPr en plus faible concentration (2.5 µg/ml). En effet, l'expression de l'ARNm est augmentée de 2.6 fois en l'absence de polymyxine B et de 2.3 fois en présence de polymyxine B.

Les cellules THP-1 incubées avec la CRPp (25µg/ml) pendant 24h, ont l'expression de leur ARNm IL-1α augmentée de 4.6 fois en l'absence de polymyxine B et de 4.9 fois en présence de polymyxine B. Des résultats similaires sont obtenus avec d'autres cytokines pro-inflammatoires (données non montrées). De manière similaire, la baisse de l'expression des transcrits de l'Alpha-2 Macroglobuline (A2M) et l'augmentation des transcrits du LXRα ne sont pas différents en l'absence ou la présence de polymyxine B (50 µg/ml) (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent donc qu'il y a une contamination de LPS dans les préparations de CRPr qui peut affecter de manière significative les résultats d'expression de

cytokines lorsque de fortes concentrations de CRPr sont utilisées. En revanche, les effets observés avec la CRPp ne sont pas liés à une contamination de LPS.

Quant aux effets potentiels liés à la présence d'azide de sodium, deux types d'expériences ont été réalisés. La première est de purifier « *de novo* » les préparations à la fois de CRPp et de CRPr. Les effets observés sur les cellules THP-1 incubées en présence de CRP « sans azide de sodium » sont identiques à ceux observés avec les préparations de CRP commerciales (résultats non montrés). D'autre part, lorsque les cellules THP-1 sont incubées en présence d'azide de sodium (0.05% ou 0.1%) (poids/volume), nous observons un effet transitoire de l'azide de sodium sur l'expression de l'ARNm de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1β et TNF-α (effet maximum après 1h30 d'exposition). L'effet de l'azide de sodium disparaît au cours du temps (après 3 heures d'incubation). Ces expériences démontrent que les effets de la CRP observés après 8 heures d'incubation sont indépendants d'effets potentiels liés à l'azide de sodium.

1.3 Analyse des isoformes de la CRPp et de la CRPr

Puisque les isoformes de la CRP confèrent des actions différentes (pro ou anti-inflammatoire) sur les cellules (paragraphe 2.3.1 de l'introduction), il était essentiel de déterminer les fractions de CRP monomérique vs CRP pentamérique présentes dans les préparations commerciales de CRP (CRPp et CRPr).

La séparation des constituants des préparations de CRPp et CRPr a été effectuée sur gel d'électrophorèse non dénaturant (**Figure 26**). Comme le montre la photo du gel, une seule isoforme de la CRP est détectable, quelle que soit la provenance de la CRP : l'isoforme pentamérique dont le poids moléculaire apparent est de 120 kDa.

Il faut noter que d'autres conditions *in vitro* peuvent affecter les isoformes monomériques par rapport aux isoformes pentamériques :

(i) le marquage au bleu brillant de coomassie versus argent ;

(ii) la présence ou l'absence de Ca^{2+} dans le milieu de conservation de la CRP (Dessein, Joffe, and Stanwix 2004).

Les effets décrits dans cette étude de la CRPp ou CRPr sont donc liés à la forme pentamérique de la CRP.

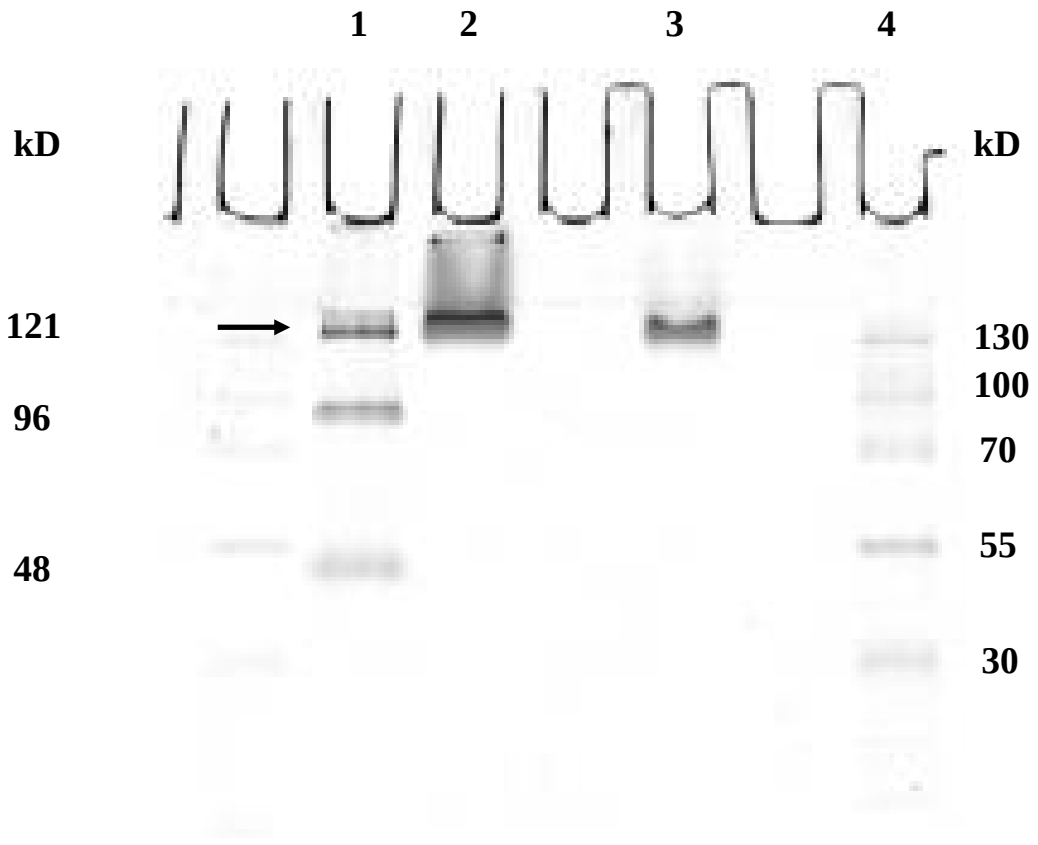


Figure 26 : *Isoformes de la CRPp analysées sur gel d'électrophorèse non dénaturant*
Seule l'isoforme pentamérique de la CRPp est détectée dans la CRPp commerciale (ligne 2) et la CRPr (ligne 3). Les lignes 1 et 4 sont des marqueurs de poids moléculaire.

1.4 Détermination du temps d'incubation des monocytes avec la CRPp à 12h

Limité par le nombre de puces à oligonucléotides à notre disposition (N=25), le choix du temps d'incubation optimal des monocytes purifiés en présence de CRPp a été évalué à l'aide d'une cinétique.

En effet, les monocytes humains ont été exposés ou non à la CRPp pendant 0h, 2h, 6h, 12h et 24h et l'expression relative de l'ARNm de certains gènes a été quantifiée en PCR quantitative en temps réel. Le choix des gènes s'est porté sur des cytokines pro inflammatoires et anti-inflammatoires dont la régulation d'expression était plus ou moins connue chez d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, …) exposés à la CRPp (comme décrit dans l'introduction).

La **figure 27** représente l'expression relative des ARNm des gènes IL-1α, IL-1β, IL-6, MCP1 et IL-8 dans le monocyte humain exposé à la CRPp. Le point d'incubation « 12h » correspond au niveau maximal d'expression de l'ARNm des cytokines étudiées.
L'interprétation de ces résultats est que les effets pro et anti-inflammatoires de la CRP ne sont pas séquentiels mais simultanés, du moins dans les conditions expérimentales de cette étude. D'autre part, les expériences de cinétique au-delà de 24h n'ont pas été entreprises pour la raison que le phénotype des monocytes en culture pouvait ne plus être stable et dériver vers un phénotype macrophagique ou dendritique.

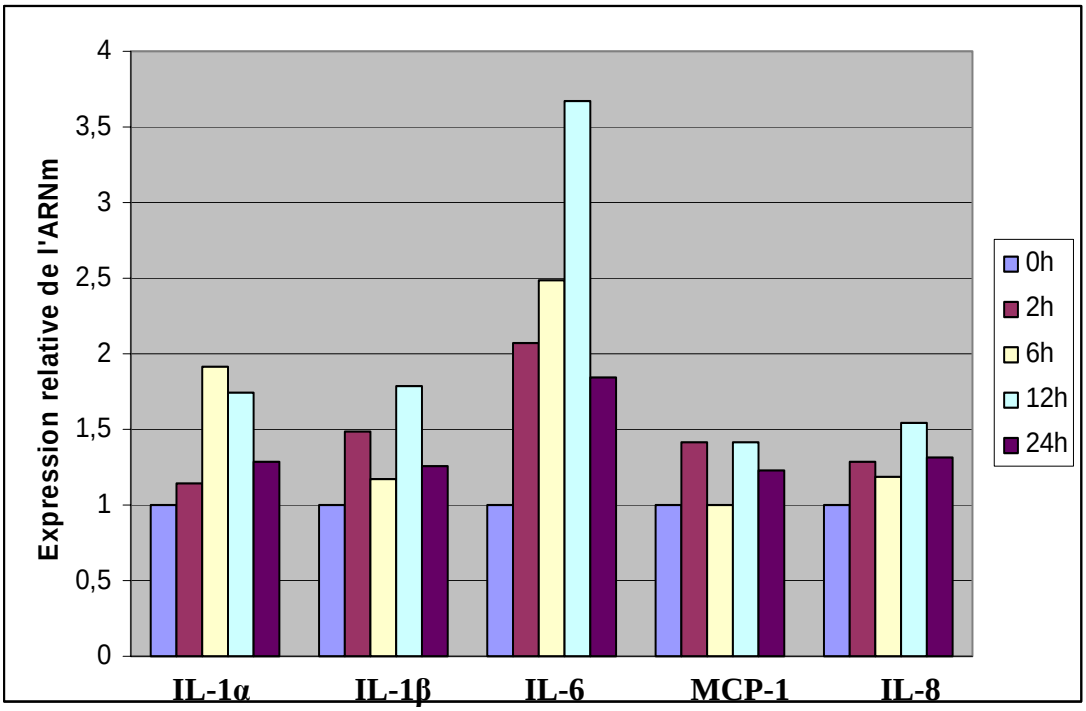


Figure 27 : *Cinétique représentative des effets de la CRPp sur l'expression des ARNm de cytokines pro ou anti-inflammatoire chez le monocyte humain ex-vivo (n=1) exposé à la CRPp (25µg/mL)*

2. Effets pro et anti-inflammatoires de la CRP sur la biologie du monocyte

2.1 Analyse des effets de la CRP sur l'expression globale des gènes *via* les puces à oligonucléotides

Les effets de la CRPp sur l'expression des ARNm des monocytes des groupes homme et femme ont été analysés de manière séparée.

Le **tableau 8** présente l'ensemble des gènes des monocytes humains du groupe « homme » exposés à la CRPp dont les résultats des signaux émis par les fluorophores Cy3 et Cy5 ont pu être exploités statistiquement (comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes). Sur 250 gènes, 171 ont répondu aux critères de sélection statistique.

De la même manière, le **tableau 9** contient l'ensemble des gènes des monocytes humains du groupe « homme » exposés à la CRPp dont les résultats des signaux émis par les fluorophores Cy3 et Cy5 ont pu être exploités statistiquement. Sur les 250 gènes présents sur la puce, 174 ont répondu aux critères de sélection statistiques.

Sur les 250 gènes représentés sur la puce à oligonucléotides, environ 10 % voient leur expression génique modifiée après exposition des monocytes humains à la CRPp (25µg/mL) pendant 12h**.**

Tableau 8 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes d'homme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides*)

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP+, a- 2-macroglobulin	0,70	0,0132
CRP+, Activin RIA	1,89	0,0438
CRP+, ALOX12	1,57	0,0184
CRP+, ALOX5	1,10	0,7182
CRP+, ALOX5AP	0,88	0,3289
CRP+, ALOXE3	0,99	0,9238
CRP+, antitrypsine	0,93	0,5929
CRP+, apo c	1,31	0,216
CRP+, APO E	0,95	0,6807
CRP+, ARP	0,99	0,8868
CRP+, ARPC1A	1,02	0,6902
CRP+, Aryl hydrocarbon receptor	1,95	0,1071
CRP+, ATF-2 (creb-2)	1,02	0,7174
CRP+, ATF4	1,02	0,7846
CRP+, B2 microglobuline	1,00	0,9801
CRP+, B-actine	1,02	0,6557
CRP+, bax	1,04	0,6304
CRP+, CAPN2	1,21	0,2004
CRP+, caspase 3	1,04	0,8293
CRP+, CBF-C ou NFYC	1,09	0,6573
CRP+, CCR1	1,60	0,3014
CRP+, CCR-7	1,19	0,0576
CRP+, CCR-8	1,67	0,0241
CRP+, CD14	1,05	0,7436
CRP+, CD163	0,79	0,3099
CRP+, CD36	1,01	0,8995
CRP+, CD44	1,05	0,367
CRP+, CD97 type 2	0,91	0,3203
CRP+, CD99	1,11	0,3139
CRP+, CEBPB	0,90	0,4585
CRP+, c-fos	1,05	0,3792
CRP+, CFR-1	0,99	0,595
CRP+, Cholesteryl ester hydrolase	1,13	0,3565
CRP+, CISH	1,06	0,6828
CRP+, c-myc	0,89	0,3582
CRP+, Cox-1	1,19	0,0347
CRP+, CREB	1,33	0,0048
CRP+, c-rel	1,29	0,0954
CRP+, CXCR-1	1,01	0,8862
CRP+, CXCR-4	1,76	0,0025
CRP+, Cyclophilline A	1,21	0,1795
CRP+, CYP1B1	1,08	0,5806
CRP+, CYP3	1,13	0,4404
CRP+, DUSP1	1,15	0,1332
CRP+, E2F	1,34	0,0068
CRP+, Egr-1	0,99	0,9044
CRP+, EMMPRIN	1,14	0,0239
CRP+, EMP-1	2,14	0,1906
CRP+, EP2R	1,16	0,0261
CRP+, EP2R1	1,43	0,1312
CRP+, ERK2 (MAPK1)	1,02	0,7551

Tableau 8 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes d'homme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides*)

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP+, ETR101	1,11	0,1902
CRP+, FABP5	0,98	0,7463
CRP+, FASTK	1,13	0,2012
CRP+, fibrinogen like 2	0,80	0,1451
CRP+, GAPDH	1,03	0,7085
CRP+, GBP1	1,16	0,1522
CRP+, G-CSF (3)	1,19	0,0671
CRP+, GM-CSF	1,47	0,0423
CRP+, GM-CSF Ralpha	1,25	0,0249
CRP+, gp130	1,30	0,0743
CRP+, GRO-alpha	1,81	0,0057
CRP+, GRO-beta	1,69	0,008
CRP+, GSR	1,34	0,109
CRP+, IFN-gamma R2	1,21	0,0461
CRP+, IFNGR1	1,33	0,0018
CRP+, IkB1a (mad3)	1,30	0,0971
CRP+, IKK-alpha	1,65	0,1318
CRP+, IKK-beta	1,29	0,189
CRP+, IL-1 alpha	1,78	0,0354
CRP+, IL-1 beta	1,85	0,002
CRP+, IL-10 Ra	0,94	0,3596
CRP+, IL-10 Rbeta	1,08	0,2114
CRP+, IL12 Rb1	1,43	0,0934
CRP+, IL-12 Rb2	1,01	0,9334
CRP+, IL-15	1,70	0,0717
CRP+, IL-18	0,91	0,153
CRP+, IL-19	1,54	0,0653
CRP+, IL-22	1,25	0,0009
CRP+, IL-4 Ralpha	1,13	0,0972
CRP+, IL-6	2,29	0,0053
CRP+, IL8	1,79	0,0058
CRP+, ILK	1,12	0,0544
CRP+, Integrin-alpha6	1,48	0,0062
CRP+, Integrin-alphaL	1,55	0,1284
CRP+, Integrin-alphaX	1,09	0,1482
CRP+, Integrin-beta2	1,03	0,8369
CRP+, IRF 7A	0,95	0,6061
CRP+, IRF1	1,33	0,0303
CRP+, IRLB	1,02	0,9606
CRP+, ITGB1	1,48	0,0168
CRP+, JNK2 ou MAPK9	1,11	0,3364
CRP+, LAMB3	1,12	0,4061
CRP+, LIF	1,15	0,0615
CRP+, LPLase	1,66	0,168
CRP+, LXRa	1,58	0,0024
CRP+, M6PR	1,09	0,3965
CRP+, MAPK4	1,23	0,0637
CRP+, MAPK8	1,73	0,0042
CRP+, MCP-1	1,32	0,0714
CRP+, MCP-3	0,95	0,7349
CRP+, M-CSF	1,48	0,0013
CRP+, MD-2	1,07	0,4662

Tableau 8 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes d'homme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides)*

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP+, MEK1	1,19	0,0756
CRP+, MEK2	0,97	0,3746
CRP+, Metallothionein	1,15	0,0554
CRP+, MIP-1alpha	0,93	0,2261
CRP+, MIP-1beta	0,73	0,0209
CRP+, MKP3 PYST 1	1,30	0,0853
CRP+, MMP-1	1,67	0,0157
CRP+, MMP12	0,95	0,4859
CRP+, MMP-9	1,09	0,4452
CRP+, MPO	0,93	0,291
CRP+, MyD88	0,98	0,8594
CRP+, NCOR2	1,06	0,5513
CRP+, NFKB p50 (vREL)	1,17	0,0833
CRP+, NFKB1	1,05	0,688
CRP+, NFKB2	0,98	0,7159
CRP+, NFKB3 (p65)	1,27	0,0636
CRP+, nNOS	1,26	0,0943
CRP+, osteopontin	1,06	0,7015
CRP+, ox LDLR	1,26	0,6012
CRP+, p38 MAPK	1,25	0,0752
CRP+, PAFR	1,22	0,2257
CRP+, PAI-2 OU SERPINB2	2,48	0,0043
CRP+, PAK1	0,96	0,5295
CRP+, PBEF	1,56	0,0022
CRP+, PCNA	0,87	0,1057
CRP+, PI3K 110	1,19	0,0471
CRP+, PI3K 110b	1,16	0,2986
CRP+, pim1	1,90	0,2117
CRP+, PINCH LIMS1	1,79	0,0028
CRP+, PKCd	1,04	0,4878
CRP+, PKR? Ou PLCG2	1,00	0,9714
CRP+, PLA2G4A	1,19	0,3401
CRP+, PLAU	1,11	0,0472
CRP+, PPARG(4)	1,04	0,4073
CRP+, PPARGc1	1,34	0,0556
CRP+, PRKCB1	1,19	0,2246
CRP+, PTGIR	1,21	0,1226
CRP+, PXN	1,10	0,1605
CRP+, Rantes	1,06	0,1627
CRP+, SELPLG	1,19	0,2789
CRP+, serine protease	1,00	0,9746
CRP+, SGK	1,62	0,0666
CRP+, SOD2	1,28	0,0721
CRP+, Squalene epoxidase	1,18	0,0586
CRP+, SRC1	1,10	0,1043
CRP+, SRF	0,83	0,0003
CRP+, STAT1	1,08	0,1871
CRP+, STAT3	1,17	0,0788
CRP+, STAT5A	1,31	0,0469
CRP+, TANK	1,19	0,0642
CRP+, TBXA2R	1,09	0,042
CRP+, TGF-b1	1,20	0,5127

Tableau 8 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes d'homme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides)*

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP+, Thiopurine MT	1,05	0,5562
CRP+, TIMP-1	1,09	0,2386
CRP+, TIMP-2	0,96	0,4057
CRP+, TLR2	1,12	0,3489
CRP+, TLR4	1,08	0,4047
CRP+, TNFSF13/APRIL	0,95	0,4936
CRP+, TNFSF14/LIGHT	0,98	0,8867
CRP+, TNFSF2/TNF-alpha	1,05	0,7612
CRP+, TOLLIP	1,11	0,0884
CRP+, TPM4	1,09	0,0811
CRP+, TRADD	1,68	0,1632
CRP+, TRAF3	1,23	0,0252
CRP+, TREM1	1,12	0,1446
CRP+, TUBB	0,97	0,6511
CRP+, Urokinase R	1,27	0,0201
CRP+, VASP	1,03	0,8536

Tableau 9 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes de femme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides)*

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP +, a- 2-macroglobulin	0,69	0,0011
CRP +, Activin RIA	1,08	0,4851
CRP +, Activin RIB	1,03	0,9335
CRP +, ALOX15	1,05	0,3893
CRP +, ALOX5	0,78	0,5036
CRP +, ALOX5AP	1,01	0,9438
CRP +, ALOXE3	1,11	0,2443
CRP +, antitrypsine	1,02	0,7134
CRP +, apo c	0,91	0,4623
CRP +, APO E	1,07	0,1916
CRP +, ARP	1,07	0,0898
CRP +, ARPC1A	1,00	0,9573
CRP +, Aryl hydrocarbon receptor	0,68	0,5535
CRP +, ATF-2 (creb-2)	0,90	0,3775
CRP +, ATF4	1,19	0,1235
CRP +, B2 microglobuline	1,25	0,4284
CRP +, B-actine	1,00	0,9757
CRP +, bax	1,06	0,295
CRP +, Bcl-2	0,77	0,3438
CRP +, CAPN2	1,13	0,3369
CRP +, caspase 3	1,31	0,1161
CRP +, cathepsin K	1,08	0,6622
CRP +, CBF-C ou NFYC	0,90	0,508
CRP +, CCR1	1,22	0,1739
CRP +, CCR-7	1,01	0,934
CRP +, CCR-8	1,28	0,1221
CRP +, CD14	1,12	0,2086
CRP +, CEBPA	0,92	0,6616
CRP +, Cholesteryl ester hydrolase	1,00	0,983
CRP +, CISH	1,01	0,9492
CRP +, c-myc	0,60	0,006
CRP +, Cox-1	1,03	0,6104
CRP +, CREB	1,27	0,033
CRP +, c-rel	1,29	0,273
CRP +, CXCR-1	0,95	0,6327
CRP +, CXCR-4	1,63	0,002
CRP +, CXCR-5	0,74	0,3241
CRP +, Cyclophilline A	0,89	0,1937
CRP +, CYP1B1	1,23	0,0143
CRP +, CYP3	1,28	0,0303
CRP +, DUSP1	1,43	0,0004
CRP +, E2F	1,04	0,3657
CRP +, Egr-1	0,89	0,2482
CRP +, EMMPRIN	1,11	0,3039
CRP +, EMP-1	1,17	0,4118
CRP +, EP2R	1,03	0,5476
CRP +, EP2R1	0,78	0,2417
CRP +, EP2R4	0,95	0,7278
CRP +, ERK2 (MAPK1)	1,07	0,4067
CRP +, ETR101	0,92	0,3147
CRP +, FABP5	0,96	0,696

Tableau 9 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes de femme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides*

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP +, FASTK	1,01	0,9302
CRP +, fibrinogen like 2	0,74	0,0287
CRP +, GAPDH	1,18	0,1067
CRP +, GBP1	0,65	0,0209
CRP +, G-CSF (3)	1,08	0,3013
CRP +, GM-CSF	0,98	0,9338
CRP +, GM-CSF Ralpha	1,28	0,0115
CRP +, gp130	1,17	0,0719
CRP +, GRO-alpha	1,56	0,0131
CRP +, GRO-beta	1,50	0,0199
CRP +, GSR	1,28	0,0029
CRP +, IFN-gamma R2	1,01	0,9054
CRP +, IFNGR1	1,08	0,4965
CRP +, IkB1a (mad3)	1,21	0,0674
CRP +, IKK-alpha	0,80	0,433
CRP +, IKK-beta	1,42	0,1518
CRP +, IL-1 alpha	1,14	0,262
CRP +, IL-1 beta	1,36	0,0453
CRP +, IL-10 Ra	0,97	0,6974
CRP +, IL-10 Rbeta	1,05	0,6501
CRP +, IL12 Rb1	0,90	0,7223
CRP +, IL-12 Rb2	0,92	0,0563
CRP +, IL-15	1,22	0,7341
CRP +, IL-18	0,83	0,0605
CRP +, IL-19	1,58	0,004
CRP +, IL-22	0,64	0,2231
CRP +, IL-4 Ralpha	1,07	0,5756
CRP +, IL-6	1,90	0,0191
CRP +, IL8	1,45	0,074
CRP +, IL-8 Ra	0,79	0,3815
CRP +, ILK	1,03	0,6871
CRP +, Integrin-alpha5	1,06	0,6549
CRP +, Integrin-alpha6	1,34	0,027
CRP +, Integrin-alphaX	1,07	0,6537
CRP +, Integrin-beta2	1,21	0,0721
CRP +, IRAK1	0,87	0,4103
CRP +, IRAK2	0,94	0,7555
CRP +, IRF 7A	1,03	0,7226
CRP +, IRF1	1,01	0,9795
CRP +, ITGB1	1,06	0,647
CRP +, JNK2 ou MAPK9	0,68	0,0326
CRP +, LAMB3	0,90	0,3026
CRP +, LIF	1,13	0,219
CRP +, LPLase	0,94	0,6294
CRP +, LXRa	1,73	<,0001
CRP +, M6PR	0,94	0,441
CRP +, MAPK4	1,17	0,2412
CRP +, MAPK8	1,63	0,0224
CRP +, MCP-1	1,11	0,1843
CRP +, MCP-2	1,00	0,9704
CRP +, MCP-3	0,76	0,0037
CRP +, M-CSF	1,57	0,0052

Tableau 9 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes de femme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides)*

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP +, MD-2	1,03	0,7107
CRP +, MEK1	0,82	0,3124
CRP +, MEK2	1,05	0,376
CRP +, Metallothionein	1,43	0,0264
CRP +, MIP-1alpha	0,85	0,0751
CRP +, MIP-1beta	0,76	0,0203
CRP +, MKP3 PYST 1	1,02	0,8755
CRP +, MMP-1	1,29	0,1232
CRP +, MMP12	0,52	0,0087
CRP +, MMP-9	1,20	0,0858
CRP +, MyD88	0,98	0,8611
CRP +, NCOR2	0,95	0,7016
CRP +, NFKB p50 (vREL)	0,90	0,2845
CRP +, NFKB1	1,10	0,2025
CRP +, NFKB2	0,72	0,0152
CRP +, NFKB3 (p65)	1,20	0,1861
CRP +, nNOS	0,90	0,3797
CRP +, osteopontin	0,79	0,0998
CRP +, ox LDLR	0,83	0,5196
CRP +, p38 MAPK	1,01	0,8885
CRP +, PAFR	1,32	0,1109
CRP +, PAI-2 OU SERPINB2	1,80	0,0016
CRP +, PAK1	1,00	0,9617
CRP +, PBEF	1,31	0,0168
CRP +, PCNA	0,89	0,103
CRP +, PGES	0,74	0,268
CRP +, PI3K 110	0,89	0,2348
CRP +, PI3K 110b	0,97	0,622
CRP +, pim1	0,82	0,336
CRP +, PINCH LIMS1	1,17	0,4233
CRP +, PKCd	1,17	0,0227
CRP +, PKR? Ou PLCG2	0,92	0,4086
CRP +, PLA2G4A	0,85	0,753
CRP +, PLAU	1,09	0,2686
CRP +, PPARG(4)	1,11	0,4544
CRP +, PPARGc1	0,82	0,438
CRP +, PRKCB1	1,15	0,0943
CRP +, PTGIR	1,01	0,9317
CRP +, PXN	0,96	0,5376
CRP +, Rantes	1,08	0,7246
CRP +, SELPLG	0,83	0,3563
CRP +, serine protease	1,02	0,8587
CRP +, SGK	1,25	0,1312
CRP +, SOD2	1,49	0,0125
CRP +, Squalene epoxidase	0,99	0,9244
CRP +, SRC1	1,33	0,0232
CRP +, SRF	0,85	0,0486
CRP +, STAT1	1,13	0,0973
CRP +, STAT3	1,19	0,0009
CRP +, STAT5A	1,13	0,1437
CRP +, TANK	1,11	0,1569

Tableau 9 : *Analyse des changements d'expression génique des monocytes de femme exposés à la CRPp (puces à oligonucléotides)*

Gènes	Ratio (CRP+/CRP-)	p mesuré (test-t apparié)
CRP +, TBXA2R	1,00	0,9806
CRP +, TGF-b1	1,18	0,2027
CRP +, Thiopurine MT	0,75	0,1367
CRP +, TIMP-1	1,09	0,515
CRP +, TIMP-2	1,03	0,6662
CRP +, TLR2	1,07	0,2343
CRP +, TLR4	0,79	0,2422
CRP +, TNFSF13/APRIL	0,98	0,7432
CRP +, TNFSF14/LIGHT	1,08	0,8003
CRP +, TOLLIP	1,17	0,1199
CRP +, TPM4	0,79	0,5079
CRP +, TRADD	1,11	0,6003
CRP +, TRAF3	1,34	0,0004
CRP +, TRAF6	1,07	0,677
CRP +, TREM1	1,07	0,3295
CRP +, TUBB	1,00	0,8913
CRP +, Urokinase R	1,32	0,0399
CRP +, VASP	1,18	0,1446

Les gènes des monocytes exposés à la CRPp dont l'expression était modifiée de manière significative par rapport aux monocytes non exposés, ont été sélectionnés dans chaque groupe sur 2 critères :

- une valeur seuil du ratio ≥ 1.5 ou ≤ 0.75
- une différence statistiquement significative ($p<0.05$)

La question était de se savoir à partir de quelle valeur de ratio peut-on considérer la modulation comme pertinente ? Jusqu'à présent, la valeur seuil (f) a surtout été déterminée de façon arbitraire :

- f = 1.5 (Le Bouter, Demolombe *et al*. 2003)
- f = 2 (Lucau-Danila, Lelandais *et al*. 2005)
- f = 5 (DeRisi, van den *et al.* 2000)

Au-delà de la nécessité d'une approche statistique pour répondre à cette question et donc la réalisation plusieurs fois de l'expérience pour disposer d'un effectif suffisant, l'hypothèse biologique que nous envisageons nous amène à penser que les variations biologiques du monocyte exposé à la CRP ne sont pas des variations « violentes », avec des changements d'expression génique de 10, 50 ou 100 fois, mais plutôt des changements d'expression légers et chroniques. En effet, le développement de l'athérosclérose suit un processus lent. C'est pourquoi nos valeurs seuils de ratio sont celles définies ci-dessus.

Ainsi, les gènes pour lesquels l'expression augmente au moins de 50% chez les monocytes stimulés par la CRPp et de manière significative sont présentés, à la fois pour les groupes homme et femme, dans le **tableau 10**.

De la même façon, les gènes pour lesquels l'expression diminue au moins de 34% chez les monocytes stimulés par la CRPp et de manière significative sont présentés dans le **tableau 11**.

Les gènes sont regroupés par famille ou par fonction (chémokine, récepteur chémokine, cytokine, intégrine, enzyme, récepteur nucléaire, …).

Tableau 10 : *Gènes pour lesquels l'expression a augmenté au moins de 50% chez les monocytes de femmes et d'hommes stimulés par la CRPp versus Contrôle (expériences de puces à oligonucélotides)*

Groupe[a]	N° d'accession GenBank	Gène[b]	Abbreviation	Ratio (homme) (CRPp/Cont)	Ratio (femme) (CRPp/Cont)
Chemokine	NM_001511	Gro protein alpha	GRO alpha	1.55	1.80
	NM_002089	Gro protein beta	GRO beta	1.5	1.70
	NM_000584	Interleukin 8	IL-8		1.80
Chemokine Récepteur	NM_005201	CC motif receptor 8	CCR-8		1.70
	NM_003467	CXC motif receptor 4	CXCR-4	1.65	1.75
Cytokine	NM_000757	Macrophage colony stimulating factor 3	MCSF	1.55	1.50
	NM_000758	Granulocyte macrophage colony stimulating factor 2	GM-CSF		1.50
	NM_005746	Pre-B cell colony-enhancing factor	PBEF		1.55
	NM_000575	Interleukin 1 alpha	IL-1 alpha		1.80
	NM_000576	Interleukin 1 beta	IL-1 beta		1.85
	NM_000600	Interleukin 6	IL-6	1.9	2.30
	NM_013371	Interleukin 19	IL-19	1.6	
Integrine	NM_000210	Integrin alpha 6	ITGA6		1.50
	NM_002211	Integrin beta 1	ITGB1		1.50
Enzyme	NM_000636	Manganese-dependent superoxide dismutate	SOD2 Mn	1.5	
Récepteur nucléaire	NM_005693	Liver X receptor alpha	LXR alpha	1.75	1.60
Protéase	XM_006270	Matrix metalloproteinase type 1	MMP-1		1.65
Régulateur de l'invasion tissulaire	NM_002575	Plasminogen activator inhibitor type 2	PAI-2	1.8	2.50
Tranduction du signal	NM_004987	Lim and senescent cell antigen-like domains 1	PINCH LIMS1		1.80
	NM_002750	Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	1.65	1.75
Superfamille TGF-beta	NM_001105	Activin RIA			1.90

[a]Les gènes sont regroupés par famille ou par fonction. Beaucoup de gènes peuvent appartenir à plusieurs groupes
[b]Les gènes ont été sélectionné pour un ratio ≥ 1.5 et une statistique significative ($p<0.05$)

Tableau 11 : *Gènes pour lesquels l'expression a diminué au moins de 34% chez les monocytes de femmes et d'hommes stimulés par la CRPp versus Contrôle (expériences de puces à oligonucélotides)*

Groupe[a]	N° d'accession GenBank	Gène[b]	Abbreviation	Ratio (homme) (CRPp/Cont)	Ratio (femme) (CRPp/Cont)
Chemokine	NM_006273	Chemokine CC motif ligand 7	MCP-3	0.75	
	NM_002984	Small inducible cytokine A4 (SCYA4)	MIP-1 beta	0.75	0.75
Régulateurs du cycle cellulaire	NM_002467	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-myc	0.60	
Inflammation	M36501	Alpha 2 macroglobuline		0.70	0.70
Protéase	NM_002426	Matrix metalloproteinase 12	MMP-12	0.50	
Protéine secrétée	NM_006682	Fibrinogen-like 2		0.75	
Transduction du signal	NM_002752	Mitogen-activated protein kinase 9	MAPK-9	0.65	
	NM_002502	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	NFkB2	0.70	
	NM_002053	Guanylate binding protein 1	GBP1	0.65	

[a]Les gènes sont regroupés par famille ou par fonction. Beaucoup de gènes peuvent appartenir à plusieurs groupes
[b]Les gènes ont été sélectionné pour un ratio ≤ 0.75 et une statistique significative ($p<0.05$)

Chez les monocytes isolés à partir de femme, la CRPp augmente l'expression de 20 gènes, à la fois pro et anti-inflammatoire, parmi lesquels IL-6 et l'activateur du plasminogène PAI-2 qui sont induits plus de 2 fois par rapport au contrôle (**Tableau 10**). A l'effet opposé, la CRPp diminue l'expression la protéine inflammatoire macrophagique MIP-1β et l'alpha-2 macroglobuline (A2M) (**Tableau 11**).

Concernant les monocytes du groupe « homme », la CRPp augmente l'expression de 10 gènes (**Tableau 10**) et diminue l'expression de 9 gènes (**Tableau 11**). Ainsi, il y a plus de gènes surexprimés par la CRPp chez les monocytes de femmes comparés à ceux des hommes. De plus, le niveau d'induction est aussi plus élevé chez les femmes que chez les hommes. Pour exemple, le PAI-2 augmente de 150 % chez les monocytes femmes et seulement de 80% chez ceux des hommes (**Tableau 10**).

2.2 Confirmation des modifications d'expression génique mis en évidence par les puces à oligonucléotides à l'aide de la PCR quantitative en temps réel

Nous avons regroupé les gènes en fonction de leur famille à laquelle ils appartiennent. Ceci nous a permis d'identifier des sous-groupes de gènes connus pour contribuer à la réaction pro-inflammatoire et dont l'expression est augmentée par la CRPp.

Ces gènes appartiennent aux familles des cytokines pro-inflammatoires et chemokines (IL-1, IL-6, IL-8, Groα, Groβ, PBEF), aux récepteurs des chemokines (CCR-8 et CXCR-4) et aux intégrines (α6 et β1). D'autre part, la CRPp sur régule l'expression de gènes impliqués dans le remodelage de la paroi artérielle (MMP-1) et dans la fibrinolyse (PAI-2).

Nous avons confirmé les effets de la CRPp sur plusieurs de ces gènes par PCR quantitative en temps réel, à la fois chez les monocytes isolés des femmes et des hommes.

Ainsi, la CRPp augmente l'expression (% augmentation groupe femme / groupe homme) de l'IL-1α (+42% / +33%), IL-1β (+42% / +39%), IL-6 (+100% / +117%), Groβ (+85% / +78%), IL-8 (+54% / +47%) et PAI-2 (+74% / +116%) **(Figure 28).**

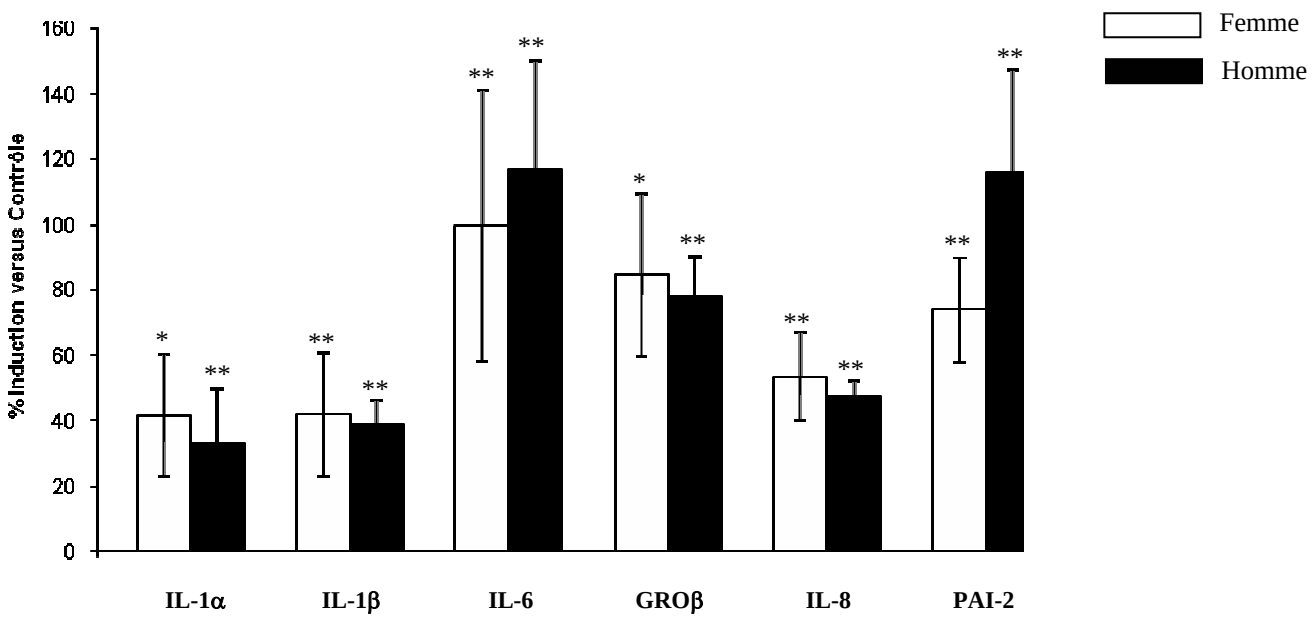


Figure 28 : *Evaluation par PCR quantitative en temps réel des effets pro-inflammatoires de la CRPp sur les monocytes isolés de femmes (n=9) et d'hommes (n=9)*

Les monocytes sont exposés à la CRPp (25 µg/mL) ou « vehicle » pendant 12h. La CRPp modifie l'expression de gènes pro-athérosclérotiques et pro-inflammatoires. Le graphique représente le pourcentage de variation d'expression génique chez les monocytes exposés à la CRPp comparé aux monocytes qui servent de contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type.

*P<0.05 et **P<0.01 versus monocytes contrôles.

Une des découvertes de cette étude est la modulation de l'expression de gènes qui contribuent à la réponse anti-inflammatoire. En effet, la CRPp diminue l'expression de l'ARNm des chémokines MIP-1α et MIP-1β ainsi que la protéine porteuse A2M **(Tableau 11)**. D'autre part, la CRPp augmente l'expression de l'ARNm de la cytokine anti-inflammatoire Activine RIA, de la SOD2 Mn (oxidation-protective superoxyde dismutase type 2) et du LXRα (liver X receptor) (**Tableau 10**).

Les modifications d'expressions géniques, liées à la réponse anti-inflammatoire et observées à l'aide des puces à oligonucléotides, sont confirmées par PCR quantitative en temps réel, à la fois chez les hommes et les femmes.

Ainsi, la CRPp diminue l'expression (% diminution groupe femme / groupe homme) des gènes MIP-1α (-30% / -46%), MIP-1β (-52% / -77%), A2M (-46% / -65%) et du TNF-α (-22% / -35%). Parallèlement, la CRPp augmente l'expression du gène ADM (+29% / +55%) **(Figure 29)**.

Il faut noter que le comportement du TNF-α est différent entre les expériences de puces à oligonucléotides et celles de PCR quantitative en temps réel. En effet, chez les femmes, l'expression de l'ARNm du TNF-α n'est pas modifiée chez les monocytes après exposition à la CRPp et chez les hommes, l'expression de l'ARNm n'était pas détectée en raison du niveau de détection de la méthode.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la CRPp exerce des effets à la fois pro-et anti-inflammatoires sur les monocytes humains mis en culture ex vivo.

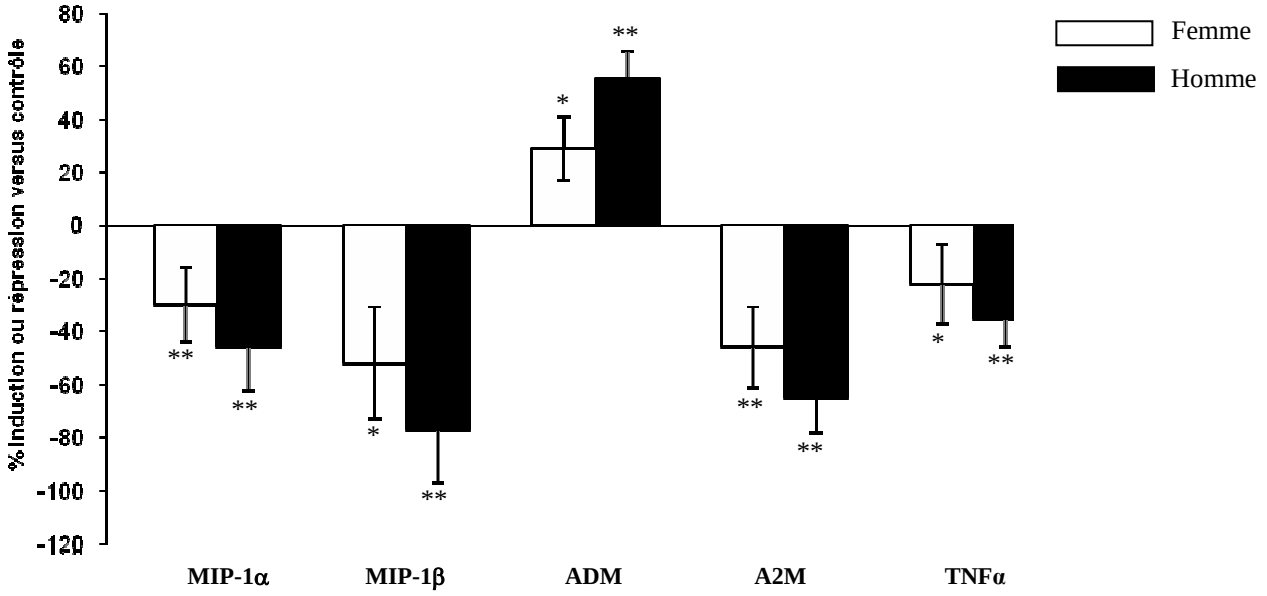


Figure 29 : *Evaluation par PCR quantitative en temps réel des effets anti-inflammatoires de la CRPp sur les monocytes isolés de femmes (n=9) et d'hommes (n=9)*

Les monocytes sont exposés à la CRPp (25 µg/mL) ou « vehicle » pendant 12h. La CRPp modifie l'expression de gènes anti-inflammatoires. Le graphique représente le % de variation d'expression génique chez les monocytes exposés à la CRPp comparé aux monocytes contrôle. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± écart type.

*P<0.05 et **P<0.01 vs monocytes contrôles.

2.3 La CRPp exerce des effets pro-atherogéniques communs sur la biologie du monocyte

2.3.1 Cytokines pro-inflammatoires et chimiokines

Plusieurs études ont montré que la CRP exerce des effets pro-inflammatoires sur les cellules endothéliales et que cela contribue à la pathophysiologie de l'athérosclérose (Szmitko P.E. *et al.* 2003a; Szmitko P.E. *et al.* 2003b). Nos résultats indiquent que la CRP augmente l'expression de l'ARNm des gènes IL-1α, IL-1β et IL-6 chez le monocyte, comme démontré dans nos expériences de puces à oligonucléotides et de PCR quantitative en temps réel, confirmant alors les effets pro-inflammatoires de la CRP.

Toutes ces cytokines participent au processus de l'athérosclérose (Osterud B. and Bjorklid E. 2003). Il-1 et Il-6 sont des cytokines pleïotropiques à effets multiples puisqu'elles sont impliquées à la fois dans la défense de l'hôte, l'inflammation et l'invasion tissulaire (der Thusen J.H. *et al.*. 2003). Le rôle essentiel d'IL-1β dans l'athérosclérose a été mis en évidence chez des souris « Knock-out » pour le gène de l'ApoE (-/-) chez qui le manque d'expression de la cytokine IL-1β était associée avec la diminution des lésions athérosclérеuses (der Thusen J.H. *et al.* 2003). Les informations sur le rôle pro-athérogénique d'IL6 restent plus limitées. L'expression accrue du transcrit d'IL-6 chez des souris C57B1/6ApoE -/- accélère le développement de lésions précoces (der Thusen J.H. *et al.* 2003). L'injection d'IL-6 est asscociée à une augmentation des concentrations en IL-6, IL-1β, TNF-α et fibrinogène alors que les concentrations de cholestérol total sont inchangées entre le groupe de souris traitées à l'IL-6 recombinante et le groupe de souris non traitées. Ces effets pro-inflammatoires ont été également rapportés chez les macrophages alvéolaires humains (Galve-de Rochemonteix B. *et al.* 1993). D'autre part, en plus de leurs rôles majeurs de médiateurs lors de la phase aigue de la réponse inflammatoire, IL-1β et en particulier IL-6 sont des facteurs clés dans l'activation de l'expression de la CRP par les hépatocytes (Pepys M.B. and Hirschfield G.M. 2003).

La CRP augmente également l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le recrutement du monocyte tels que IL-8 et MCP-1 (Gerszten R.E. *et al.*1999), dans l'adhésion des monocytes sur les cellule endothéliales avec Gro-α et Gro-β (HagiwaraH. *et al.* 1998) et dans la chimotaxie des monocytes/macrophages via les récepteurs CCR-8 et CXCR-4.

L'IL-8 et MCP-1 sont les chimiokines les plus importantes impliquées dans le recrutement des lymphocytes T et des monocytes au niveau des lésions athéroscléreuses (Boring L. *et al.* 1998; Gu,L. *et al.* 1998). Les fonctions clés de ces chimiokines dans l'athérosclérose incluent leurs capacités à provoquer l'extravasion leucocytaire, l'angiogenèse et la prolifération et migration des cellules musculaires lisses (Bursill C.A. *et al.* 2004). Il a été montré que l'incubation de cellules endothéliales de la veine ombilicale avec de la CRP humaine recombinante (CRPr) (100 µg/ml) induit une secrétion de MCP-1 induite de 7 fois (Pasceri V. *et al.* 2001). D'autre part, une autre étude indique qu'un segment peptidique de la CRP active l'expression de MCP-1 chez des monocytes adhérents humains (Zhou P. *et al.* 1995). L'incubation de cellules issues de la lignée monocytaire THP-1 avec de la CRPp induit l'augmentation de l'expression de CCR2 (CC chemokine receptor 2) et accélère la chimiotaxie médiée par MCP-1 (Han K.H. *et al.* 2004). Si MCP-1 est un facteur clé dans le recrutement du monocyte (Lu B. *et al.* 1998) et dans le développement de l'athérosclérose (Gosling J. *et al.* 1999), CCR2 contribue à la constitution de la plaque athéroscléreuse (Boring L. *et al.* 1998). Enfin, il a été montré que MCP-1 est induit chez les PBMC lors de la migration transendothéliale (Takahashi M. *et al.* 1995).

A notre connaissance, nous montrons pour la première fois que la CRPp, à une concentration de 25 µg/ml induit l'expression d'IL-8 chez le monocyte. L'hybridation in-situ et le marquage immunohistochimique de lésions coronaires humaines atteintes d'athérosclérose a montré une expression d'IL-8 importante dans des zones de la plaque riches en macrophages (Apostolopoulos J. *et al.* 1996; Liu Y. *et al.* 1997; Wang N. *et al.* 1996). Il a été démontré que MCP-1 et IL-8 induisent le roulement des monocytes afin qu'ils adhèrent aux monocouches de cellules endothéliales exprimant la E-selectine (Gerszten R.E. *et al.* 1999).

Analysés ensemble, ces résultats confirment les travaux précédents et suggèrent que l'un des mécanismes à travers lequel la CRP pourrait contribuer à la pathophysiologie de l'athérosclérose passe par l'augmentation de l'expression de chimiokines chez les monocytes ce qui peut être interprété comme un signal primaire à la migration transendothéliale et/ou des interactions entre les monocytes et les lymphocytes (Burger D. and Dayer J.M. 2002).

Nous montrons également pour la première fois que la CRP augmente l'expression de l'ARNm du gène Gro-β qui induit l'adhésion des monocytes sur les cellules endothéliales

(Hagiwara H. *et al.* 1998). Les récepteurs aux chimiokines jouent également un rôle documenté dans l'athérogenèse. Ainsi, CCR-8, le récepteur de CCL-1, secrété par les monocytes / macrophages, lymphocytes T et les cellules endothéliales activées, peut contrôler le chimiotactisme de ces mêmes cellules (Harpel P.C. and Haque N.S. 2002). CXCR-4, le récepteur de SDF-1, est connu pour être surexprimé lors de la différentiation des monocytes en macrophages et de manière exponentielle lorsque les macrophages, exposés aux LDL oxydés, sont transformés en cellules graisseuses (Gupta S.K. *et al.* 1999).

2.3.2 Integrines

Nos résultats suggèrent que l'expression de l'ARNm des intégrines α_6 et β_1 est augmentée chez les monocytes isolés de femmes. Les intégrines prennent une part active dans le processus athérogénique en établissant une adhésion stable entre les cellules endothéliales et les monocytes/lymphocytes qui est suivie de leurs migrations dans l'intima. L'intégrine α_6 trouvée principalement à la surface des cellules endothéliales, est connue pour interagir de manière préferentielle avec les lymphocytes jouant un rôle de récepteur d'adhésion cellulaire (Lenter M. *et al.* 1993). Son rôle, lors de l'extravasion lymphocytaire *in vivo* reste encore à définir. Nous faisons l'hypothèse que l'expression augmentée de l'intégrine α_6 chez les monocytes pourrait être impliqué dans les interactions monocytes – lymphocytes. Cependant, chaque chaîne peut aussi interagir avec d'autres chaînes formant de nouvelles integrines impliquées dans l'athérogenèse. La chaîne β_1 régule directement l'adhésion des monocytes et des lymphocytes sur la cellule endothéliale via l'integrine $\alpha_1\beta_4$ et VCAM-1, adhésion qui est suivie alors de l'extravasion des leucocytes vers les sites inflammatoires.

2.3.3 Inhibiteur de l'activateur du plasminogène, type 2 (PAI-2) et metalloproteinase MMP-1

Puisque la concentration de CRP peut être associée à l'épaisseur de la plaque athéroscléreuse et par conséquent, à sa vulnérabilité, il était intéressant d'analyser l'expression des gènes impliqués à la fois dans l'activité fibrinolytique et le remodelage artériel. Nos résultats, issus à la fois des puces à oligonucléotides et des expériences de PCR quantitative en temps réel, suggèrent que la plus forte augmentation d'ARNm quantifiée chez le monocyte exposé à la CRPp concerne PAI-2.

PAI-2 est un inhibiteur de l'activateur du plasminogène (u-PA) qui permet le clivage du plasminogène en plasmine qui, en plus de dégrader les caillots sanguins (Lijnen H.R. 2002), active de nombreuses MMPs. Les MMPs sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracelullaire contribuant ainsi à l'instabilité de la plaque athéroscléreuse. La signification biologique de l'augmentation de l'expression de PAI-2 chez les monocytes exposés à la CRPp, dans le contexte du processus de l'athéroscérose, est difficile à interpréter car les effets de PAI-2 sont à la fois pro- et anti-athérogéniques. Pro-athérogéniques à travers l'accumulation et le dépôt de fibrine dans la paroi artérielle, caractéristique de la plaque athéroscléreuse, et anti-athérogéniques par l'inhibition de l'activation des MMPs responsable du développement de l'athérosclérose et de la déstabilisation de la plaque (Jones C.B. *et al.* 2003).

D'autre part, la CRP induit l'augmentation de l'expression de MMP-1 chez les monocytes isolés à partir des femmes. MMP-1 est responsable du clivage initial des molécules de collagène de type I et III, composantes majeures de la plaque athéroscléreuse. Bien que nous n'ayons pas mesuré cette différence en PCR quantitative en temps réel, des résultats similaires ont été observés par d'autres équipes sur des histiocytes U937 et des macrophages exposés à la CRP (100µg/ml) avec une induction positive de l'expression et de la secrétion de MMP-1 aux alentours de 4 fois (Williams T.N. *et al.* 2004). Le rôle pro-athérogénique de MMP-1 a été mis en évidence chez des souris KO ApoE -/- chez qui TIMP-1, un inhibiteur de MMP-1, était surexprimé (Rouis M. *et al.* 1999). Parallèlement, en l'absence de TIMP-1, une augmentation du nombre de macrophages présents dans les lésions aortiques de l'intima a été observée, suggérant un rôle direct de MMP-1 dans l'infiltration des monocytes dans la paroi artérielle et par conséquent dans le développement de l'athérosclérose (Silence J. *et al.* 2002). Nos résultats suggèrent donc que l'effet pro-athérogénique de MMP-1 pourrait être contre balancé par PAI-2, inhibiteur de son activation.

2.4 Effets anti-inflammatoires de la CRPp sur la biologie du monocyte

2.4.1 Chimiokines et cytokines anti-inflammatoire

L'un des effets anti-athérogéniques principaux de la CRPp est la diminution de l'expression génique des chimiokines MIP-1α et MIP-1β (macrophage inflammatory proteins) retrouvée dans tous les échantillons étudiés ; ceci a été mis en évidence par les puces à oligonucléotides

que nous avons confirmées en PCR quantitative en temps réel. Les protéines MIPs, en plus d'être chimiotactiques pour les monocytes et les lymphocytes, jouent un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse et de la synthèse des médiateurs inflammatoires tels que IL-1 et TNF-α (Menten P. *et al.* 2002). A notre connaissance, il existe une seule étude qui concerne la CRP et MIP-1α et qui confirme les résultats de notre étude. Des souris transgéniques qui surexpriment la CRP humaine sont protégées d'une encephalomyelite allergique expérimentale via l'expression diminuée de MIP-1α (SzalaiA.J. *et al.* 2002). L'inhibition de l'expression des MIPs par la CRP pourrait représenter un point de contrôle d'une réponse inflammatoire exagérée.

Chez les humains, TNFα a été identifié dans des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses à différents stades de l'athérosclérose (Barath P. *et al.* 1990). Les rôles attribués au TNFα incluent le recrutement des cellules inflammatoires, la prolifération des cellules musculaires lisses et la rupture de plaque (Niemann-Jonsson A. *et al.* 2000). Nous montrons pour la première fois que la CRP diminue l'expression de l'ARNm du TNFα chez les monocytes *ex vivo*. Chez des souris transgéniques surexprimant la CRP humaine, il s'est avéré que la CRP avait des effets anti-inflammatoires à travers l'inhibition de la production de TNFα (Szalai A.J. *et al.* 2002). Nos résultats appuient ces observations et suggèrent que la CRP ne change pas l'expression de l'ARNm du TNFα chez les monocytes mis en culture (quand l'expression de l'ARNm est analysée par les expériences de puces à oligonucléotides et entraîne une légère diminution de l'expression de l'ARNm quand cell-ci est quantitfiée par PCR quantitative en temps réel.

Quelle que soit la méthode, le message essentiel est que la stimulation des monocytes avec la CRPp n'est pas associée à une expression augmentée de l'ARNm du TNFα. Notre observation in vitro est en accord avec une expérience in vivo récente. En effet, des volontaires humains ayant reçu une injection de CRP humaine recombinante ont eu une augmentation significative de leur concentration plasmatique en cytokines telles que IL-6 et IL-8 mais aucune modification pour le TNFα (Bisoendial R.J. *et al.* 2005; Bisoendial R. *et al.* 2005). Analysés ensemble, ces résultats suggèrent qu'à travers des mécanismes qui ne sont pas encore pleinement compris, la CRP est associée avec une régulation différentielle des voies de synthèse du TNF-α et de l'IL-6.

2.4.2 alpha-2 macroglobuline (A2M)

La plus forte sous-expression de l'ARNm observée dans nos expériences de puces à oligonucléotides et confirmée en PCR quantitative en temps réel avec tous les échantillons étudiés est l'alpha-2 macroglobuline. A2M est un inhibiteur de protéases capable de se fixer à plusieurs cytokines. Taylor et al. ont montré que A2M neutralise l'effet inhibiteur exercé par TGFβ (Transforming Growth Factor-β) sur la synthèse de la CRP induite par IL-6 (Taylor A.W. and Mortensen R.F. 1991). D'autre part, TGFβ est une cytokine anti-inflammatoire sur exprimée lors de l'athérosclérose. Nous faisons l'hypothèse que la CRP pourrait exercer des effets anti-inflammatoires et anti-athérogéniques en réprimant l'expression et la synthèse d'A2M. De plus, nous apportons l'évidence convaincante que la CRP induit la surexpression du récepteur A de l'activine chez les monocytes isolés à partir du groupe femme (puces à oligonucélotides), membre de la superfamille du TGF-β et qui joue également un rôle anti-inflammatoire.

2.4.3 Adrenomédulline (ADM)

Bien que le ratio de 1.5X ait été choisi comme seuil pour sélectionner les gènes surexprimés mis en évidence sur les puces à oligonucléotides, nous avons étudié l'expression génique de l'ADM par PCR quantitative en temps réel.

L'ADM est un vasodilatateur puissant qui, à forte concentration, est associée à de nombreuses pathologies inflammatoires et cardiovasculaires, et est fortement corrélée aux concentrations de CRP et d'IL-6 (Bunton D.C. *et al.* 2004). Nos résultats montrent une surexpression génique d'ADM dans tous les échantillons. Nakayama et son équipe ont montré que l'ARNm de l'ADM est exprimé chez les monocytes humains ex-vivo (Nakayama M. *et al.* 1999). L'augmentation de l'expression génique de l'ADM pourrait avoir des effets anti-athérogéniques via l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses dans la média artérielle (Bunton D.C. *et al.* 2004) aussi bien qu'à travers l'inhibition du stress oxydatif (Bunton D.C. *et al.* 2004).

Les études immunohistochimiques mettent en évidence l'expression d'ADM chez les macrophages issus de lésions athéroscléreuses de l'aorte humaine (Bunton D.C. *et al.* 2004).

Cependant, la CRP diminue la sécrétion de l'ADM à la fois dans les cellules musculaires lisses et endothéliales d'artères coronariennes humaines.

Nous montrons donc dans cette étude et ceci pour la première fois, que la CRP peut exercer des effets anti-athérogéniques en augmentant l'expression de l'ADM chez les monocytes humains ex-vivo.

2.5 Effets différentiels de la CRP entre les monocytes isolés des femmes et des hommes

Il est bien accepté aujourd'hui que le sexe est un facteur essentiel qui module la physiologie cardiovasculaire et la pathophysiologie à travers des mécanismes qui ne sont pas encore élucidés (Leinwand L.A. 2003). Dans le but d'analyser séparément les effets de la CRP sur la biologie du monocyte isolés à la fois des hommes et des femmes, nous montrons qu'il y a des motifs communs induits par la CRP dans les changements d'expression de gène, mais aussi des différences genre spécifique. Nos résultats sont même plus qu'intéressants étant donné que les prélèvements de sang issus des femmes ont été effectués au hasard de leur cycle menstruel. Les effets de la CRP sont probablement assez puissants pour atténuer les effets du cycle.

Récemment, l'équipe de Sander et al. (Sander K. *et al.* 2007) a montré que la concentration en CRP est associée à la progression de l'épaississement média-intima de la carotide chez les femmes mais pas chez les hommes ce qui est en accord avec nos résultats. Cette étude argumente la possibilité que le traitement par œstrogène exogène puisse expliquer les concentrations de CRP plus élevées chez les femmes comme rapportées dans l'étude de Framinhgam (Rutter M.K. *et al.* 2004).

D'autres auteurs ont mis evidence que la relation entre la CRP et le risque cardiovasculaire est dépendant du genre (Tuomisto K. *et al.* 2006).

De façon très intéressante, sur un modèle de souris surexprimant le gène de la CRP humaine et déficiente en ApoE, Paul et. al ont démontré que la surexpression de la CRP était associée à un développement accéléré de l'athérosclérose chez les souris mâles mais pas chez les souris femelles (Paul A. *et al.* 2004).

Une interaction similaire entre le sexe et la CRP a été prouvée par une autre équipe ayant travaillé sur les souris transgéniques surexprimant la CRP humaine (Trion A. *et al.* 2005).

La signification de nos observations sur l'incidence du genre dans l'athérosclérose est pour le moment purement hypothétique, mais elles contribuent à expliquer l'association statistique différente entre plusieurs marqueurs inflammatoires, le sexe et les manifestations de l'athérosclérose (Pradhan A.D. *et al.* 2002).

3. Limites des puces à oligonucléotides

Les puces à ADNc sont des outils puissants pour détecter les modifications significatives biologiques de l'expression génique, mais sont souvent limitées par leurs capacités à détecter des modifications de faible amplitude à cause des artéfacts liés au hasard et aux erreurs systématiques (Yao B. *et al.* 2004).

La plupart des publications ont adopté une analyse basée sur le ratio et fixé la limite à une modification de l'expression génique de 2 fois. Il a été démontré que, comparé à la plupart des méthodes qui mesure les changements d'expression de l'ARNm telles que le « Northern blotting » ou la PCR quantitative (Yuen T. *et al.* 2002), les puces à ADNc sou-estiment l'amplitude des changements d'expression génique (Yao B. *et al.* 2004).

Il a été suggéré que l'augmentation du nombre de répliquâts permettrait la détection de modifications d'expression géniques plus petites qu'un facteur 2 (Yao B. *et al.* 2004). Le ratio limite présenté dans notre étude est 1.5 fois pour les expressions géniques croissantes. De plus, en utilisant l'approche de marquage inversé des marqueurs fluorochromes Cy3 et Cy5, il y avait beaucoup plus de gènes dont l'expression était significativement différente entre les échantillons de CRP traités et ceux non traités. Cela a déjà été rapporté par Yao et al. (Yao B. *et al.* 2004).

Cette limite fixée à 1.5 fois est un bon compromis entre la sensibilité et l'exactitude. Une approche similaire a été rapportée par Le bouter (Le Bouter S. *et al.* 2003). Nous considérons alors que les changements d'expression génique observés sont biologiquement significatifs.

ETUDE 2 : Effets de la CRP sur l'expression et l'activation du LXRα chez le monocyte

Ne pouvant explorer toutes les hypothèses qui découlaient des résultats issus des puces à oligonucléotides, nous avons concentré notre attention sur les effets de la CRPp sur l'expression et activation du LXRα chez les monocytes humains purifiés, effets qui n'avaient jamais été décrit dans la littérature auparavant.

Les récepteurs X du foie (LXRs) font parti de la superfamille des récepteurs nucléaires et jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie lipidique et le métabolisme des acides gras (Tontonoz P. and Mangelsdorf D.J. 2003). Les activateurs endogènes connus des LXRs sont les oxystérols et d'autres intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol. Ces activateurs sont présents dans les plaques athéroscléreuses (Joseph S.B. *et al.* 2003).

1. Induction de l'expression génique et protéique du LXRα chez les monocytes ex-vivo exposés à la CRP

Les expériences de puces à oligonucléotides ont mis en évidence, à la fois chez les hommes et les femmes, une augmentation de l'ARNm du LXRα chez le monocyte exposé à la CRPp (25µg/ml) pendant 12h **(Tableau 10)**.

Cette observation a été validée en PCR quantitative en temps réel puisque la CRPp augmente de 72% l'expression de l'ARNm du LXRα chez les femmes et de 97% chez les hommes **(Figure 30)**.

Une cinétique d'expression de l'ARNm a été réaliseé afin d'évaluer les effets de la CRPp sur le monocyte humain ex vivo au cours du temps. Les monocytes ont été exposés à la CRPp pendant 0h, 2h, 6h, 12h et 24h. Le point d'incubation « 12h » correspond au niveau maximal d'expression de l'ARNm du LXRα **(figure 31)**, le même temps déterminé lors de la cinétique pro-inflammatoire (**figure 27**).

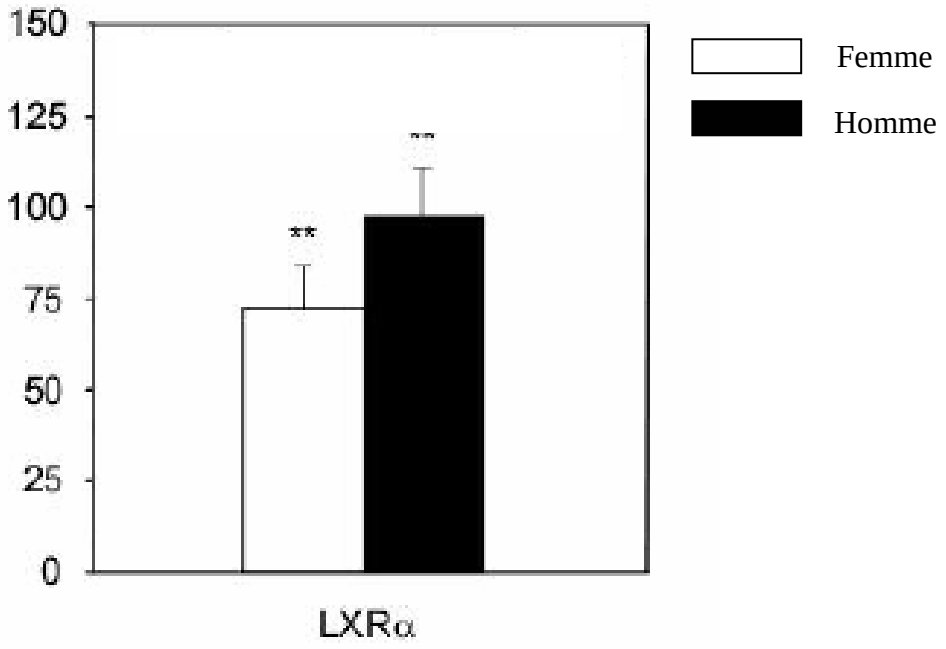


Figure 30 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm du LXRα chez les monocytes humains ex vivo*

Les monocytes isolés à partir de femmes (n=9) ou d'hommes (n=9) ont été exposés à la CRPp (25µg/ml) ou contrôle pendant 12h et l'expression de l'ARNm du LXRα a été évaluée par PCR quantitative en temps réel. Les barres graphiques représentent le % d'augmentation de l'ARNm chez les monocytes exposés à la CRPp vs monocytes contrôle. Les valeurs sont la moyenne ± écart type.

** $P < 0.01$ vs. monocytes contrôles.

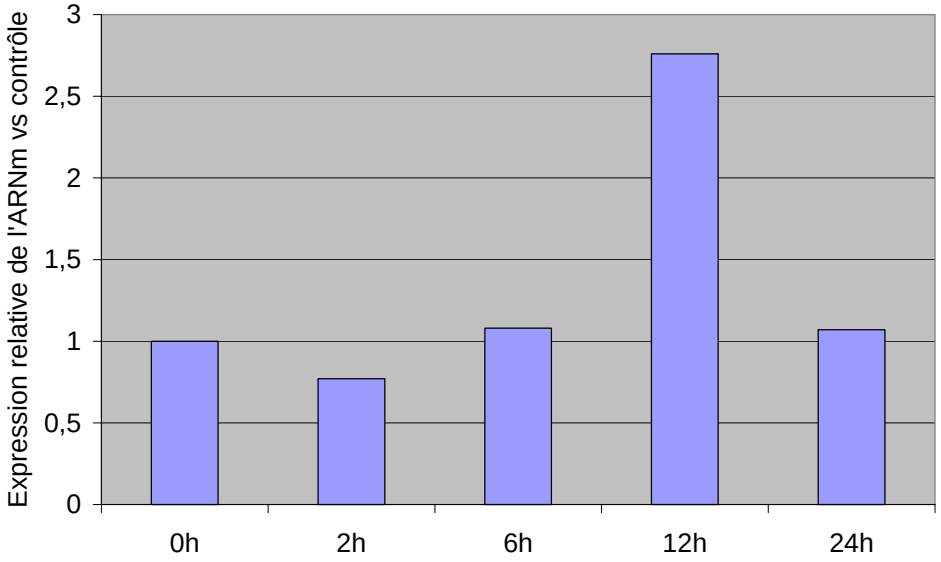


Figure 31 : *Cinétique représentative de l'expression de l'ARNm du LXRα chez le monocyte humain (n=1) exposé à la CRPp (25µg/ml) pendant 0h, 2h, 6h, 12h et 24h*

L'expression relative des ARNm a été mesurée en PCR quantitative en temps réel.

Nous avons ensuite vérifié si cette induction génique était suivie d'une synthèse protéique par Western Blotting à l'aide d'anticorps anti-LXRα. Les expériences ont été faites dans un premier temps sur les protéines totales du monocyte (cytoplasmiques et nucléaires). Effectivement, la CRPp induit la surexpression de la protéine LXRα **(Figure 32a)**.

Le récepteur nucléaire LXRα est sous son état latent dans le cytoplasme cellulaire. En effet, LXRα est un facteur de transcription qui requiert une translocation nucléaire afin d'être activé. Pour tester si la CRPp induit l'activation du LXRα, des extraits nucléaires de monocytes exposés ou non à la CRPp ont été analysés par immunotransfert **(Figure 32b)**. Nos résultats montrent clairement que la CRPp déclenche la translocation nucléaire du LXRα argumentant pour son activation.

Afin de confirmer l'activation du LXRα nucléaire, à savoir qu'il joue son rôle de facteur de transcription, nous avons étudié l'expression du gène ABCA1. En effet, les LXRs régulent l'expression de gènes impliqués dans le cholestérol et l'homéostasie des acides gras incluant le gène qui code pour ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1), et particulièrement dans les macrophages. Nous montrons dans cette étude que l'expression de l'ARNm de ABCA1 augmente de 99% chez les femmes et de 100% chez les hommes à l'aide de la PCR quantitative en temps réel **(Figure 33)**. Ceci confirme bien l'activation du LXRα chez le monocyte humain ex-vivo exposé à la CRPp.

Nous montrons donc, pour la première fois, que la CRP augmente l'expression génique et protéique du LXRα chez les monocytes purifiés à partir d'hommes et femmes en bonne santé.

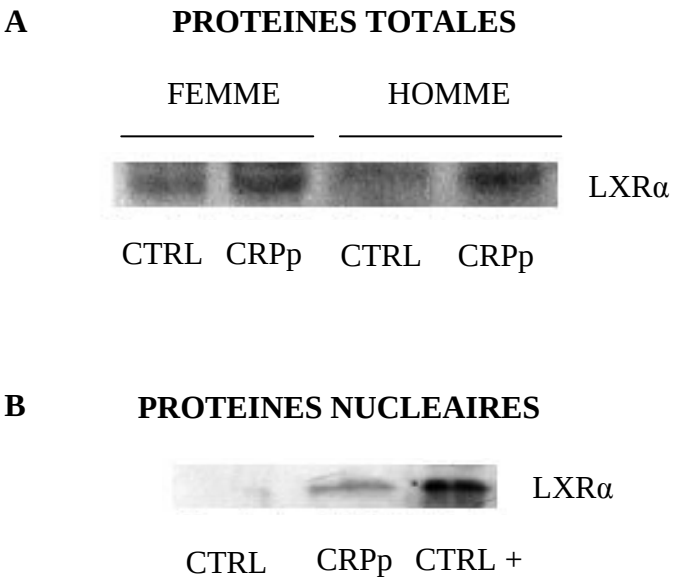


Figure 32 : *La CRp augmente l'expression protéique du LXRα chez les monocytes ex vivo*
Analyse par immunotransfert (Western Blotting) de l'expression protéique du LXRα sur des extraits de protéines totales (A) et de protéines nucléaires (B) préparées à partir de monocytes humains exposés à la CRPp (25µg/ml) ou non (CTRL) pendant 24h (n = 4). Les extraits nucléaires de macrophages dérivés de THP-1 ont été utilisés comme contrôle positif (CTRL +) de l'expression du LXRα.

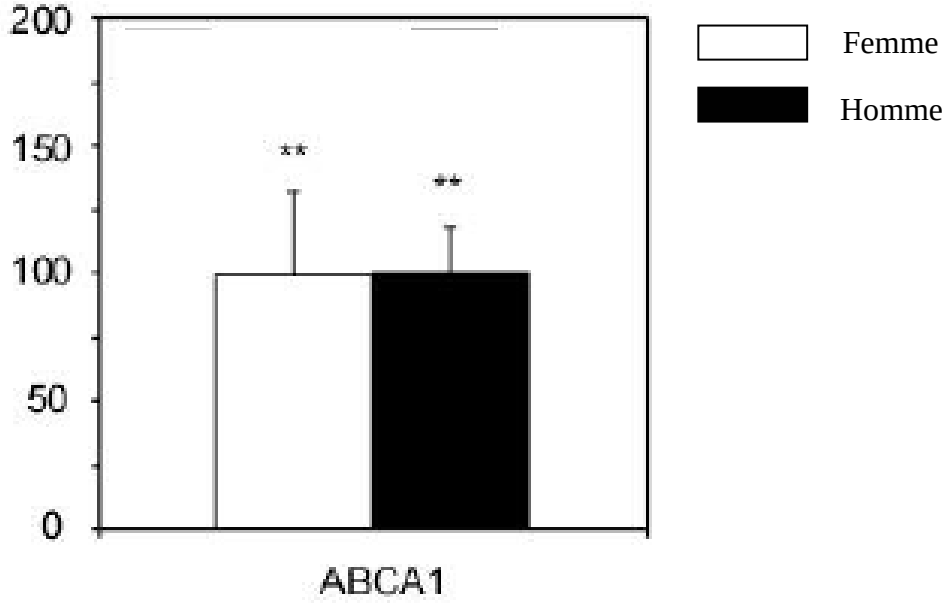


Figure 33 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm de ABCA1 chez les monocytes humains ex vivo*

Les monocytes isolés à partir de femmes (n = 9) ou d'hommes (n = 9) ont été exposés à la CRPp (25µg/ml) ou contrôle pendant 12h et l'expression de l'ARNm de ABCA1 a été évalué par PCR quantitative en temps réel. Les barres graphiques représentent le % d'augmentation de l'ARNm chez les monocytes exposés à la CRPp vs monocytes contrôle. Les valeurs sont la moyenne ± écart type.

** $P < 0.01$ vs. monocytes contrôles.

2. Induction de l'expression génique et protéique du LXRα chez les monocytes THP-1 exposés à la CRP

Afin de confirmer les effets de la CRP sur l'expression du LXRα chez les monocytes ex-vivo, nous avons étudié les effets de 2 concentrations de CRPp (2.5 et 25 µg/ml) sur les cellules monocytaires THP-1, lignée cellulaire qui se différencie en macrophages après exposition au PMA.

Les effets de la CRPp sur le LXRα des cellules THP-1 sont dépendants de la dose de CRP à laquelle sont exposées les cellules. En effet, l'augmentation de l'expression de l'ARNm est plus forte chez les cellules THP-1 exposées à 25 µg/ml de CRPp (115%) que celles exposées à 2.5 µg/ml (50%) **(Figure 34).**

De plus, tout comme pour les monocytes ex-vivo, la CRPp augmente également l'expression protéique du LXRα en fonction du temps d'exposition. Les expériences d'immunotransfert confirment cette surexpression protéique au niveau des protéines totales **(Figure 35a).** Parallèlement, la translocation du LXRα du cytoplasme vers le noyau cellulaire est confirmée comme l'indique la détection du LXRα au niveau des protéines nucléaires (**Figure 35b).**

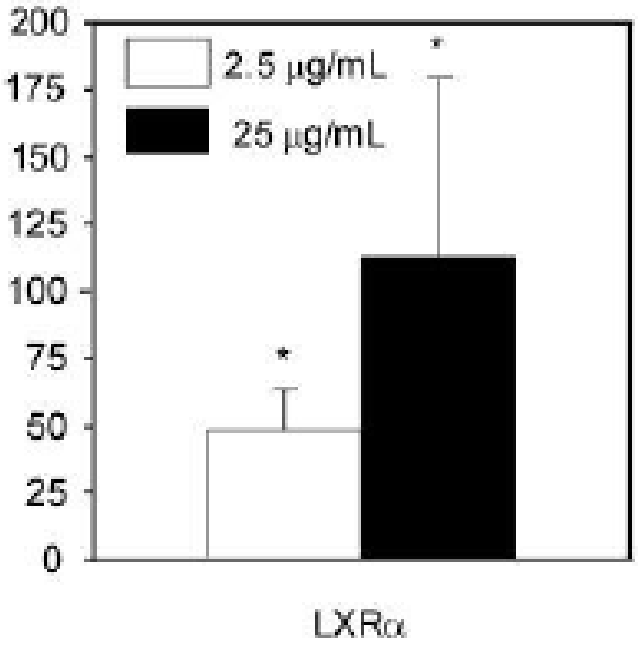


Figure 34 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm de LXRα chez les cellules THP-1*
Les cellules THP-1 ont été exposées à la CRPp à différentes concentrations (2.5 et 25 µg/ml) ou contrôle pendant 12h et l'expression de l'ARNm de LXRα a été évaluée par PCR quantitative en temps réel (n = 4). Les barres graphiques représentent le % d'augmentation de l'ARNm chez les cellules THP-1 exposées à la CRPp vs cellules THP-1 contrôle. Les valeurs sont la moyenne ± écart type.
* $P < 0.05$ vs. contrôle.

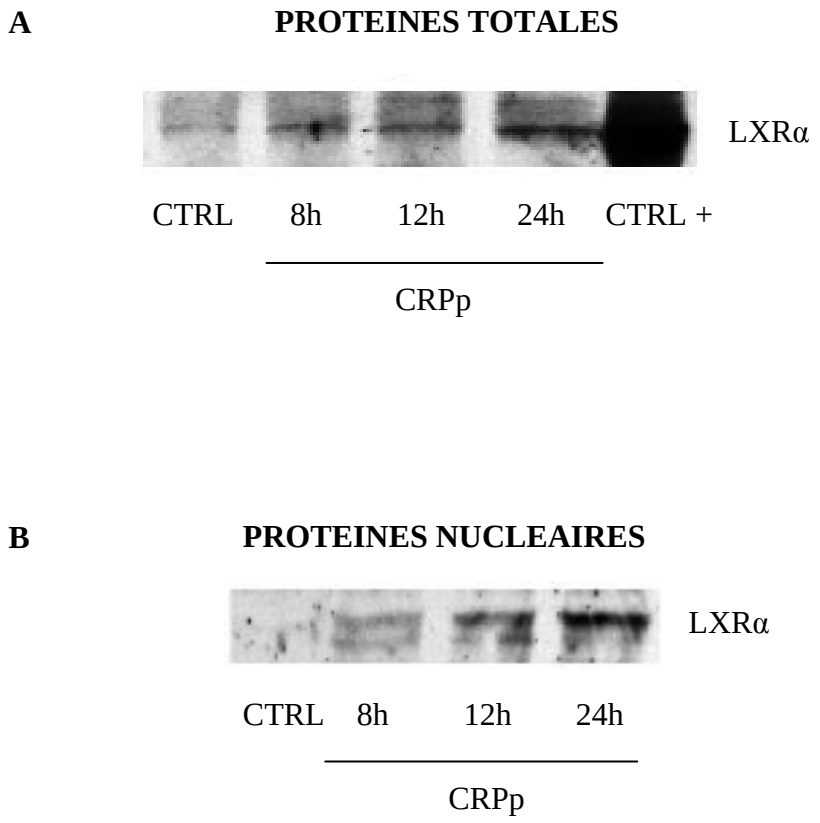


Figure 35 : *La CRPp augmente l'expression protéique du LXRα chez les cellules THP-1*
Analyse par immunotransfert (Western Blotting) de l'expression protéique du LXRα sur des extraits de protéines totales (A) et protéines nucléaires (B) préparées à partir de cellules THP-1 exposées à la CRPp (25µg/ml) ou non (CTRL) pendant 8h, 12h et 24h (n = 4). Les extraits de protéines totales de foie de rat ont été utilisé comme contrôle positif (CTRL +) de l'expression du LXRα.

Afin de confirmer que cette translocation est suivie d'une activation du facteur de transcription, l'ARNm du gène ABCA1 a été quantifié par PCR quantitative en temps réel. Même à la concentration la plus faible de CRPp (2.5 µg/ml), une augmentation de 150% à 12h d'exposition et de 120% à 24h est quantifiée par rapport au contrôle **(Figure 36)**. La surexpression de l'ARNm d'ABCA1 mesurée chez les cellules THP-1 confirme donc l'activation du LXRα par la CRPp.

L'exposition des cellules THP-1 à un stimulus inflammatoire non spécifique tel que le LPS (lipopolysaccharide) ne change pas l'expression de l'ARNm du LXRα chez les cellules THP-1 (données non montrées), ce qui suggère une induction spécifique de l'expression du LXRα par la CRPp. D'autre part, la régulation de l'expression du LXRα par la CRPp est spécifique de cette isoforme LXR, puisque la CRPp n'entraîne aucune modification de l'expression de l'ARNm du LXRβ à la fois chez les cellules THP-1 et chez les moncoytes ex-vivo.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère que l'exposition de monocytes humains *ex vivo* et des cellules THP-1 à la CRPp résulte en l'augmentation de l'expression restreinte au LXRα et non au LXRβ. D'autre part, cette induction est spécifique de la CRP puisque le LPS n'augmente pas l'expression du LXRα chez les cellules THP-1.

Chez les macrophages en culture, l'activation du LXRα induit l'expression de ABCA1 (Tontonoz P. and Mangelsdorf D.J. 2003). Nous avons apporté l'évidence, dans cette étude, qu'à la fois chez les monocytes ex-vivo et les cellules THP-1, la CRP induit la translocation nucléaire du LXRα et l'expression de ABCA1 via la voie de signalisation du LXRα.

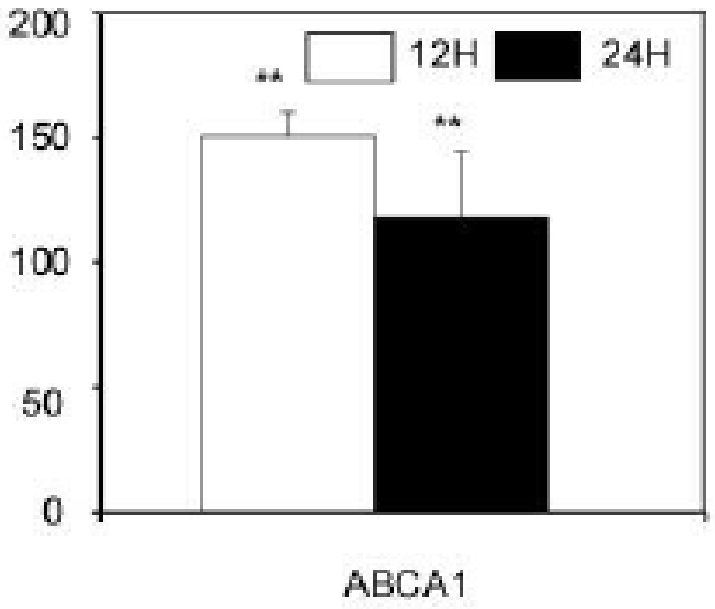


Figure 36 : *La CRPp augmente l'expression de l'ARNm de ABCA1 chez les cellules THP-1*

Les cellules THP-1 ont été exposées à la CRPp (2,5µg/ml) ou contrôle pendant 12h et 24h et l'expression de l'ARNm de ABCA1 a été évaluée par PCR quantitative en temps réel. Les barres graphiques représentent le % d'augmentation de l'ARNm chez les THP-1 exposés à la CRPp vs THP-1 contrôle. Les valeurs sont la moyenne ± écart type.

** $P < 0.01$ vs. THP-1 contrôle

3. Exploration des voies de transduction du signal

3.1 Voies d'activation des MAP Kinases

Nous avons étudié les voies de transduction du signal par lesquelles la CRP active l'expression de l'ARNm du LXRα chez les cellules THP-1. En raison de la similarité de l'activation de la voie LXRα induite par la CRP chez les monocytes ex-vivo et les cellules THP-1, nous avons utilisé cette lignée cellulaire pour en exploiter les mécanismes.

En 2005, l'équipe de Xie a montré que la CRP (50µg pendant 12h) augmentait la sécrétion d'IL-8 chez les monocytes humains périphériques (Xie L. *et al.* 2005), et que cette sécrétion était inhibée par les inhibiteurs des voies ERK1/2 et p38 MAP Kinases.

Nous avons donc testé l'implication des voies de phosphorylation dans la régulation de l'expression du LXRα. Les cellules THP-1 ont été exposées à la CRPr (2.5 µg/ml) pendant 30 min, 2h et 4h.

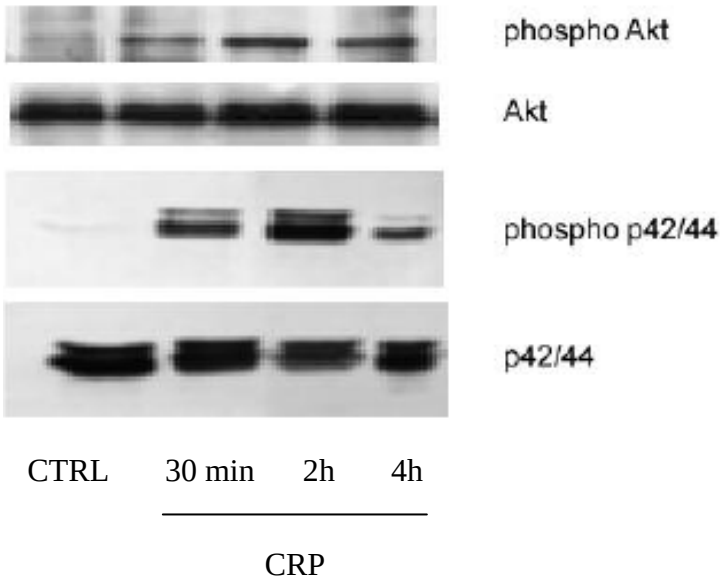
Les voies d'activation des MAP Kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK) et de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase) ont été exploitées à l'aide de Western Blotting ciblées sur les protéines ERK1/2 MAP Kinase(p42/44) totales et phosphorylées, ainsi que sur les protéines PI3 Kinase (AKT) totales et phosphorylées. En effet, ce sont des voies majeures de transduction du signal. La phosphorylation de la protéine déclenche son activation.

La CRPr induit une phosphorylation rapide des protéines p42/44 et de AKT **(Figure 37a)**, mais pas de p38MAPK (résultat non montré). Ceci indique que la CRPr agit à la fois sur les voies d'activation des MAP Kinases et de la PI3K.

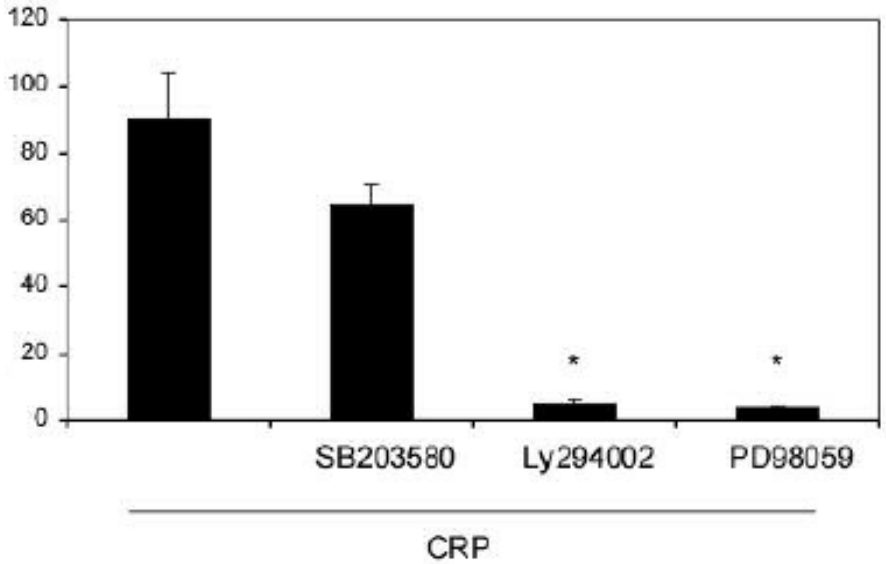
L'inhibition spécifique des voies ERK MAPK ou PI3 Kinase en utilisant respectivement les inhibiteurs PD98059 et Ly294002 bloque la surexpression de l'ARNm du LXRα induite par la CRPr. En effet, alors que sans inhibiteur la surexpression de l'ARNm du LXRα par rapport au contrôle est de 90%, celle-ci tombe à moins de 5% en présence des inhibiteurs et de façon significative (**Figure 37b**).

En revanche, l'inhibition de la voie p38 MAPK via l'inhibiteur SB20580 ne modifie en rien l'expression de LXRα. Ces données montrent clairement que la transduction du signal à travers ERK MAPK et PI3K est nécessaire à l'expression de l'ARNm de LXRα induit par la CRPr.

A



B



<u>Figure 37 :</u> *La CRP induit l'expression du LXRα via l'activation des voies de transduction du signal ERK et PI3 Kinase*

A : La CRPr active les voies ERK et PI3 Kinases. Les extraits protéiques totaux de cellules THP-1 exposées à la CRPr (2.5 µg/ml) ou non (CTRL) pendant 30 min, 2h et 4h sont analysés par Western Blotting ciblé sur phospho-ERK1/2, ERK1/2 totaux, phospho-AKT et AKT total (n=4). ***B*** : L'inhibition des voies ERK 1/2 (Ly294002) et PI3 Kinase (PD98059) mais pas p38 MAP Kinase (SB203580) bloque l'expression de l'ARNm de LXRα induit par la CRPr. Les ARNm du LXRα, extraits de cellules THP -1 exposées à la CRPr (2.5 µg/ml) ou non pendant 12h, sont quantifiés en PCR quantitative en temps réel (n=4). Pour toutes les expériences, les inhibiteurs étaient ajoutés à une concentration de 10 µM 30 min avant l'administration de CRPr. * $P<0.05$ vs THP-1 sans inhibiteurs.

3.1.1 Activation des voies de transduction via les récepteurs Fcγ

Les effets de la CRP sont connus pour être médiés par l'intermédiaire des récepteurs aux immunoglobulines FcγRI et RII (Mold C. *et al.* 2002; Williams T.N. *et al.* 2004). Nous avons étudié la spécificité d'action de la CRPr purifiée *« de novo »* sur la voie d'activation du LXRα en préincubant des cellules THP-1 avec un anticorps monoclonal anti-FcγR de type I (CD64) et anti-FcγR de type II (CD32).

En présence d'anticorps anti-CD32, l'expression de l'ARNm du LXRα induite par la CRPr est attenuée de manière significative (65%), et complètement abolie en présence d'anticorps anti-CD64 (100%) **(Figure 38)**. Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'expression de l'ARNm du LXRα induite par la CRP est médiée principalement à travers le récepteur FcγR de type I (CD 64). L'interaction de la CRPr avec le récepteur FcγRI et l'activation des voies de transduction du signal ERK1/2 ey PI3K mises en évidence dans nos expériences sont en accord avec la biologie connue de la CRP et de ses récepteurs (Watanabe Y. *et al.* 2005). Nos résultats suggèrent donc, pour la première fois, que l'activation de la voie du LXRα induite par la CRP est médiée par le récepteur FcγRI, associé habituellement à l'activation des voies ERK1/2 et PI3K. Il est intéressant de noter que tous ces résultats sont obtenus à des concentrations de CRPr faibles (5µg/ml) **(Figure 38)**.

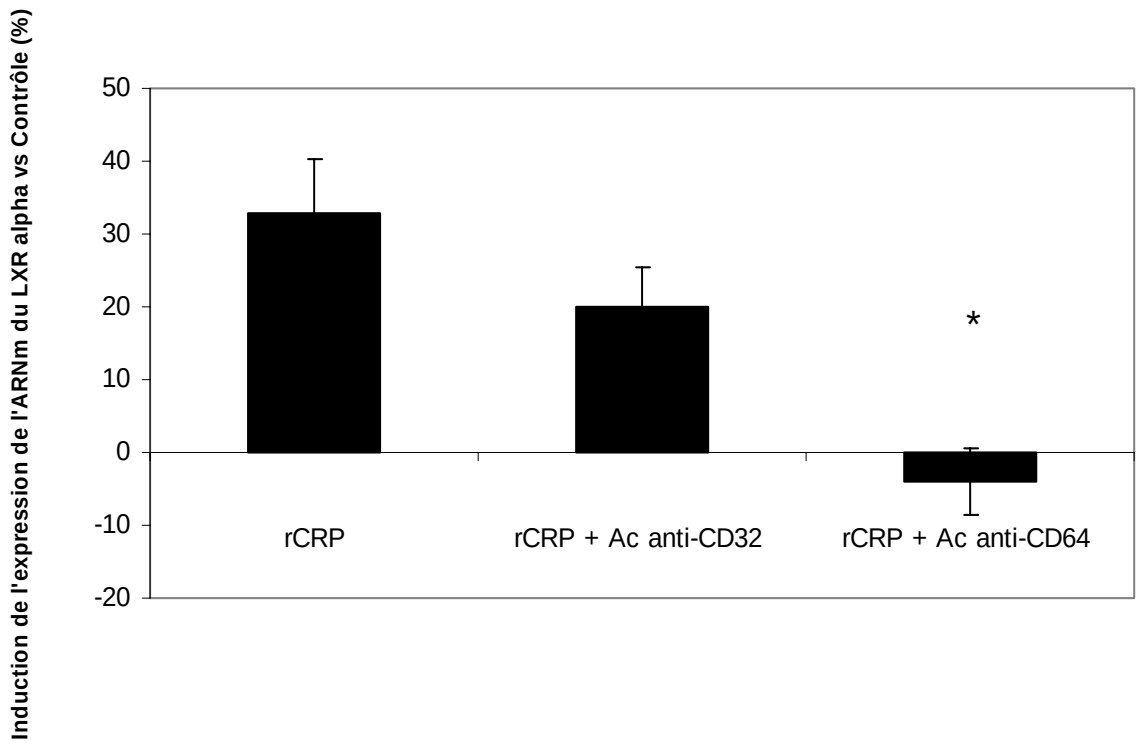


Figure 38 : *Effets des anticorps anti-CD32 (FcγRII) et anti-CD64 ((FcγRI) sur l'expression de l'ARNm du LXRα médiée par la CRPr chez des cellules THP-1*

Pour toutes les expériences, les anticorps anti-CD32 ou anti-CD64 (2µg/ml) sont rajoutés dans le milieu de culture des THP-1 avant exposition à la CRPr (5 µg/ml) pendant 12h. La CRPr est une CRPr purifiée « *de novo* » pour éliminer toutes traces d'entoxines à l'aide d'une colonne detoxigel. Les résultats sont la moyenne ± écart type des changements d'expression (%) de l'ARNm du LXRα au cours de 3 expériences indépendantes versus contrôle. * $P<0.05$ vs les deux autres groupes d'expériences (Analyse non paramétrique de la variance avec le test de Krusakal Wallis suivie des comparaisons appariées avec le test de Dunn).

3.2 Voie d'activation NF-κB

Plusieurs données issues de la littérature montrent un lien étroit entre la CRP et la voie d'activation NF-κB. Ainsi, l'équipe de Li et al. qui rapporte que la CRP n'est pas seulement un marqueur inflammatoire mais une cause directe des maladies cardiovasculaires, a montré que les niveaux élevés de CRP chez des patients atteints d'angor instable étaient associés à une activation du facteur nucléaire NF-κB (Li J.J. and Fang C.H. 2004). D'autre part, la CRP est capable d'induire l'activation de NF-κB chez des cellules mésangiales à travers le Ca^{2+} intracellulaire et des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) (Chang J.W. *et al.* 2005).

Nous avons étudié si la CRPr pouvait conduire à l'activation de la voie NF-κB chez les cellules THP-1. L'analyse par immunotransfert de NF-κB p65 sur des extraits nucléaires de cellules THP-1 exposées à la CRPr a été réalisée. Nos résultats montrent clairement que la protéine NF-κB p65 est rapidement transférée dans le noyau après traitement des cellules THP-1 avec la CRPr **(Figure 39)**.

PROTEINES NUCLEAIRES

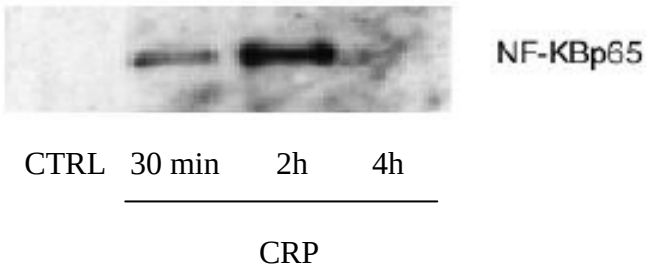


Figure 39 : *La CRP active la voie NF-κB chez les cellules THP-1*

Analyse par immunotransfert de la protéine NF-κB p65 sur des extraits nucléaires issues de cellules THP-1 exposées à la CRPr (2.5 µg/ml) ou non (CTRL) pendant 30 min, 2h et 4h (n=4).

4. Effets athéroprotecteurs de la CRP via l'activation du LXRα chez le monocyte circulant

Les récepteurs X du foie (LXRα et LXRβ) appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription induits par un ligand (Prufer K. *et al.* 2007). Ils régulent l'expression de protéines impliquées dans le transport, la synthèse de novo et le catabolisme du cholestérol (Alberti S. *et al.* 2001; Peet D.J. *et al.* 1998; Stulnig T.M. *et al.* 2002) ainsi que dans la lipogenèse (Laffitte B.A. *et al.* 2003). La distribution tissulaire diffère entre les deux récepteurs. LXRα est fortement exprimé dans le foie, le tissu adipeux et les macrophages alors que LXRβ est exprimé dans tous les tissus examinés (Repa J.J. *et al.* 2000). De manière similaire à d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, ces protéines contiennent un domaine de fixation à l'ADN en doigt de zinc et un domaine de fixation au ligand qui interagit avec de petites molécules lipophiliques spécifiques.

LXRα et LXRβ sont des récepteurs nucléaires de la famille de type II. Les récepteurs de cette famille recquièrent une hétérodimérisation avec le récepteur X aux rétinoides (RXR) pour une fixation de haute affinité à l'ADN. Ils partagent 78% de leurs séquences d'acides aminés et la plupart fixent des ligands similaires avec des affinités similaires. Les ligands naturels pour les 2 récepteurs sont les oxystérols incluant le 22-(R) hydroxycholestérol (Janowski B.A. *et al.* 1996; Peet D.J. *et al.* 1998). Alors que ces ligands ainsi que l'acide rétinoique 9-cis activent la transcription (Willy P.J. *et al.* 1995), le pyrophosphate geranyl geranyl est un antagoniste qui inhibe la transcription. Cet effet antagoniste est partiellement lié à l'inhibition de la fixation de coactivateur aux LXR (Gan X. *et al.* 2001) et/ou l'inhibition de la fixation des hétérodimères LXR-RXR à l'ADN (Forman B.M. *et al.* 1997).

Les souris KO pour les gènes des LXR ont été des outils essentiels dans la découverte de la biologie du LXR. La première cible du LXR identifiée est l'enzyme CYP7A1 qui catalyse une étape limitante dans la synthèse de l'acide biliaire. L'incapacité des souris KO pour le LXRα à réguler de manière appropriée ce gène a fourni une des fonctions clé des LXR dans le métabolisme du cholestérol (Peet D.J. *et al.* 1998). Soumises à un régime alimentaire riche en cholestérol, les souris avaient leur taux de cholestérol LDL fortement augmenté et inversement avec leur taux de cholestérol HDL. La perte de cholestérol chez la souris résulte en partie d'une augmentation de la conversion en acides biliaires grâce à l'augmentation de l'expression et de l'activité du gène CYP7A1. Depuis la découverte de CYP7A1, une

multitude de cibles additionnelles des LXR ont été mises en évidence. La plupart de ces gènes ont des liens dans le métabolisme lipidique (**Figure 40**), tels que les transporteurs de cassettes de fixation à l'ATP (ABC transporteurs), les apolipoprotéines et les enzymes de remodelage des lipoprotéines.

L'observation que des agonistes synthétiques du LXR augmentent les niveaux de cholestérol-HDL plasmatiques et inhibent l'absorption du cholestérol intestinal chez la souris (Repa J.J. *et al.* 2000; Schultz J.R. *et al.* 2000) a entrainé un intérêt particulier pour ces ligands en tant que potentiel thérapeutique. Ces effets sur l'homéostasie du cholestérol systémique pourraient avoir un impact bénéfique sur les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études mettent en évidence le rôle essentiel des transporteurs ABC dans les effets du LXR. Les transporteurs ABC sont des protéines membranaires intégrées qui couplent l'hydrolyse de l'ATP au transport de substrats variés à travers la membrane cellulaire. L'un des gènes cible les plus important du LXR est le gène ABCA1. La protéine ABCA1 est critique pour l'efflux de cholestérol cellulaire en excès vers des accepteurs Apo tels que ApoAI qui est la première étape dans le transport inverse du cholestérol. L'importance de ABCA1 dans le métabolisme du cholestérol a été mis en évidence suite à l'étude de patients atteints de la maladie de Tangier, causée par des mutations dans ce gène (Bodzioch M. *et al.* 1999; Brooks-Wilson A. *et al.* 1999; Rust, Rosier S. *et al*. 1999). Cette maladie est caractérisée par l'absence de HDL plasmatique et l'accumulation d'esters de cholestérol dans les cellules réticuloendothéliales des tissus périphériques incluant la rate, les nœuds lymphatiques, la muqueuse intestinale et le thymus. Les cellules de ces patients présentent un défaut dans leur capacité à éliminer le cholestérol. Des études chez des modèles animaux ont confirmé le rôle important de l'activité d'ABCA1 dans la susceptibilité à développer l'athérosclérose. Des transplantations de moelle oesseuse ont montré que l'inactivation sélective d'ABCA1 dans les macrophages augmente l'athérosclérose chez les souris sans altérer les niveaux de cholestérol plasmatique (Haghpassand M. *et al.* 2001; Van Eck M. *et al.* 2002). Inversement, l'expression du gène ABCA1 humain chez les souris athérogéniques, soit sous la direction de son propre promoteur ou bien le promoteur ApoE, réduit l'extension des lésions athérosclérreuses (Joyce C.W. *et al.* 2002; Singaraja R.R. *et al.* 2002).

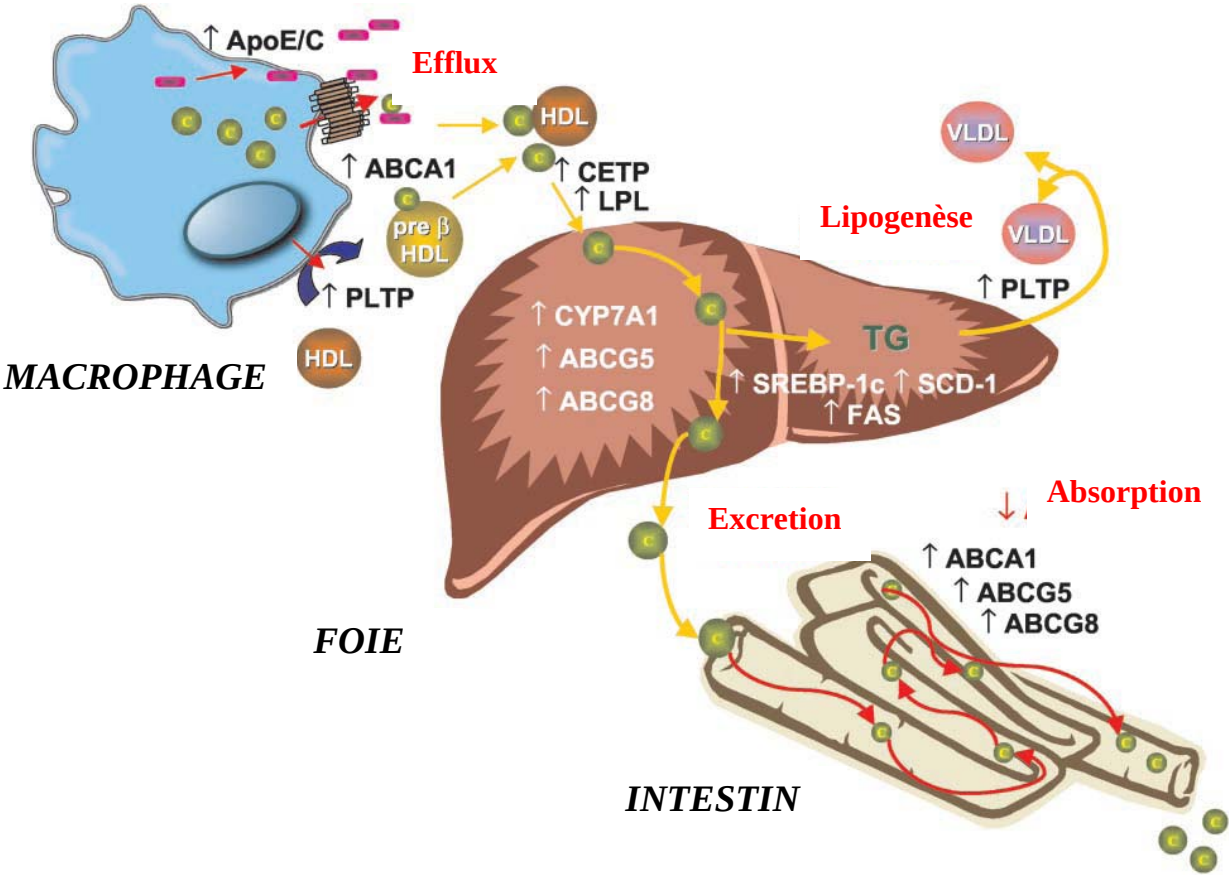


Figure 40 : *Le rôle des gènes cibles des LXRα et β dans l'homéostasie du cholestérol et la lipogenèse* (Tontonoz P. and Mangelsdorf D.J. 2003)

De nombreuses études ont établi le rôle central des LXRs dans le contrôle de l'expression d'ABCA1 et l'efflux de cholestérol (Costet P. *et al.* 2000; Repa J.J. *et al.* 2000; Schwartz D. *et al.* 2000; Venkateswaran A. *et al.* 2000). L'équipe de Repea (Repa J.J. *et al.* 2000) a établi que les hétérodimères LXR/RXR sont des régulateurs clés de l'expression d'ABCA1 *in vivo* et ont montré que l'activation du ligand de LXR inhibite l'absorption du choléstérol. D'autre part, la capacité des oxystérols et des activateurs synthétiques du LXR à stimuler l'expression d'ABCA1 est perdue chez les souris KO pour les LXRs. Un élément de réponse au LXR dans le promoteur du gène ABCA1 a été mis en évidence (Costet P. *et al.* 2000). L'expression de l'ARNm d'ABCA1 chez les macrophages est induit en réponse au chargement lipidique cellulaire et c'est l'expression et l'activation de LXR qui stimule l'efflux de cholestérol médié par ApoAI (Venkateswaran A. *et al.* 2000; Schwartz D. *et al.* 2000). La capacité du LXR à stimuler l'efflux de cholestérol est directemnt relié à sa capacité à contrôler ABCA1 car l'effet des ligands de LXR est perdu chez les fibroblastes issus de patients atteints de la maladie de Tangier. Enfin, les souris KO pour LXRα/β développent une splénomégalie et accumulent des cellules graisseuses dans de multiples tissus périphériques. Ce phénotype est très similaire à celui des souris KO pour ABCA1 (Tangirala R.K. *et al.* 2002).

L'accumulation d'esters de cholestérol macrophagiques dans la paroi artérielle reflète une balance entre le flux entrant médié par les récepteurs scavenger et les efflux de cholestérol médiés par ABCA1. Alors, les altérations dans cette balance qui favorisent l'élimination lipidique seraient prédictives d'une limitation de la formation de cellules graisseuses et d'un retard à l'apparition des lésions d'athérome. Inversement, les interferences avec la voie des efflux de cholestérol devraient exacerber le développement des lésions atheroscléreuses. Les diverses actions des LXRs dans les différents tissus présentent un challenge pour disséquer les rôles des effets médiés spécifiquement par le LXR dans les maladies cardiovasculaires. Tangirala et ses collègues ont été capables d'analyser l'importance des voies de signalisation macrophagiques du LXR à l'aide d'une transplantation de moelle osseuse chez des souris ApoE-/- et LDLR-/- (Tangirala R.K. *et al.* 2002). Cette transplantation de moelle osseuse déficiente en LXR a mené à une augmentation significative de la formation de lésions athéroscléreuses à la fois chez des souris ApoE-/- et LDLR-/-. Ces études ont fourni les arguments en faveur de l'hypothèse que l'activité du LXR dans les macrophages est un déterminant essentiel de susceptibilité à l'athérosclérose. Le traitement *in vitro,* de macrophages surchargés en lipides, avec des ligands synthétiques du LXR mène à une augmentation de l'expression des gènes cibles du LXR., suggérant qu'une hyperactivation

similaire de la voie du LXR pourrait être déclenchée à l'intérieur de la paroi vasculaire (Joseph S.B. *et al.* 2002).

Afin d'élucider la base moléculaire des effets athéroprotecteurs des LXRs, des études récentes ont exploré d'autres rôles pour ces récepteurs dans la biologie du macrophage. Ainsi, en plus de leurs rôles dans le métabolisme lipidique soulignés ci-dessus, les macrophages jouent un rôle central dans l'immunité innée. Ils permettent de coordonner les réponses inflammatoires à des stimulis liés à des pathogènes ou à des cellules apoptotiques, à travers la production de cytokines et de chemokines. D'autre part, l'athérosclérose est maintenant reconnue comme une maladie inflammatoire chronique aussi bien qu'un désordre du métabolisme lipidique. Les médiateurs inflammatoires tels que MCP-1, IL-6 et IL-1β provoquent le recrutement des monocytes et stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses (Hansson G.K. 2005). Les métalloprotéinases telles que MMP-9 sont impliquées à la fois dans le remodelage de la lésion athéroscléreuse et la rupture de la plaque (Galis Z.S. *et al.* 1995; Pasterkamp G. *et al.* 2000). Les agonistes du LXR sont capables de réprimer l'expression d'une batterie de gènes inflammatoires chez les macrophages activés (Joseph S.B. *et al.* 2003). En accord avec ces effets *in vitro*, les souris déficientes pour le LXR présentent des réponses exacerbées à des stimulis inflammatoires et les ligands de LXR réduisent l'inflammation chez un modèle murin atteint de dermatite. De plus, le traitement de souris ApoE-/- avec des agonistes du LXR a réduit l'expression du médiateur inflammatoire MMP-9 dans l'aorte athéroscléreuse. Analysés ensemble, ces observations suggèrent que les agonistes du LXR peuvent exercer des effets antiathérogéniques non seulement en promouvant l'efflux de cholestérol, mais aussi en limitant l'expresion/ activation des médiateurs inflammatoires dans la paroi artérielle.

Les études chez des souris KO ont montré que le LXRα joue un rôle plus important que le LXRβ dans la régulation des niveaux de cholestérol et dans la lipogenèse. En effet, alors que le KO pour le gène LXRα chez la souris inhibe l'expression de gènes lipogéniques codant pour la steroyl coenzyme A desaturase 1 et la fatty acid synthase, le KO du gène LXRβ n'affecte pas l'expression de ces gènes (Alberti S. *et al.* 2001). A la place, ce KO augmente l'expression d'un autre gène lipogénique codant pour l'acetyl CoA carboxylase et le régulateur clé des gènes lipogéniques qui est le sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) (Schuster G.U. *et al.* 2002). Une telle augmentation de l'expression de ces gènes indique un effet répressif du LXRβ sur ces gènes. Les données montrent également que la

lipogenèse est régulée principalement par le LXRα et que le LXRβ pourrait même avoir un effet inhibiteur sur cette synthèse.

L'expression tissulaire sélective du LXRα et du LXRβ et/ou l'activation sélective par des ligands ne peuvent pas expliquer de telles différences dans leurs fonctions. Puisque le contrôle de la localisation subcellulaire régule souvent l'activité de ces récepteurs, la régulation sélective du traffic nucléo-cytoplasmique peut contribuer à l'activation sélective de l'expression des gènes par LXRα et LXRβ.

Nous avons montré pour la première fois que la CRP est capable d'augmenter l'expression de l'ARNm du LXRα suivie de son expression protéique et de son activation. Ces résultats concernent aussi bien les monocytes ex-vivo humains que les cellules THP-1.

La signification de cette activation induite par la CRP de la voie du LXRα est pour le moment purement hypothétique. En raison de l'implication du LXRα dans le transport inversé du cholestérol (Tontonoz P. and Mangelsdorf D.J. 2003), processus caractérisé par le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il peut être secrété directement dans la bile ou convertis en acides biliares, cet effet de la CRP pourrait donc être athéroprotecteur.

L'implication des LXRs dans l'athéroprotection a été démontrée de manière convaincante chez des souris ApoE -/- . En effet, la transplantation de la moelle osseuse a été utilisée pour éliminer de manière sélective l'expression sélective du LXRα macrophagique chez les souris ApoE -/- (Tangirala R.K. *et al.* 2002). En plus de leur implication dans le métabolisme du cholestérol, il a été montré que LXRα et LXRβ inhibent aussi bien l'expression constitutive que celle inductible par des cytokines de la métalloprotéinase MMP-9 (Castrillo A. *et al.* 2003), connue pour être impliquée dans l'instabilité de la plaque. D'autre part, il a été suggéré que le LXRα est un régulateur négatif de la réponse pro-inflammatoire macrophagique (Joseph S.B. *et al.* 2003).

Bien que des effets athéroprotecteurs de la CRP soient déjà rapportés (Bhakdi S. *et al.* 2004), nos résultats qui montrent la surexpression et l'activation de LXRα fournissent un nouveau mécanisme pour expliquer ces effets. Le lien entre la CRP et le LXRα, comme démontré dans cette étude, pourrait faire parti d'interactions complexes entre les voies pro- et anti-inflammatoires. En effet, il a été récemment démontré que les agonistes du LXRα attenuent

l'augmentation de l'expression de la CRP dans le foie induite par les cytokines IL-1 et IL-6 (Blaschke F. *et al.* 2006). Nous interprétons l'activation de la voie du LXRα induite par la CRP comme l'un des mécanismes possibles à travers lequel la CRP exerce ces effets anti-inflammatoires.

Les effets anti-inflammatoires de la CRP ont été démontrés *in vivo*. En effet, des souris étaient protégées des effets létaux du LPS et la protection était médiée à travers les récepteurs Fcgamma RI et RIIa, la sécrétion augmentée de la cytokine anhti-inflammatoire IL-10 et la baisse de la sécrétion d'IL-12 (Mold C. *et al.* 2002).

En conclusion, les effets pro- et anti-inflammatoires de la CRP sont probablement reliés au fait que la CRP interagisse avec différents récepteurs Fcgamma : les récepteurs stimulants, FcgammaRI (CD64) et FcgammaRIIa (CD32), augmentant la phagocytose et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ; et le récepteur à effet inhibiteur, FcgammaRIIb, bloquant les signaux d'activation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif de mieux comprendre les effets de la CRP sur la biologie du monocyte humain circulant dans l'athérosclérose. Pour ce faire, nous avons cherché d'une part, à évaluer les changements d'expression génique du monocyte exposé à la CRP à travers l'analyse d'une partie de son transcriptome grâce à la technologie des puces à oligonucléotides et d'autre part, puisque le risque de maladies cardiovasculaires est plus élevé chez les hommes par rapport aux femmes et que cette protection diminue après la ménopause où hommes et femmes se rejoignent vis-à-vis de ces risques, définir si cette protection pouvait passer par une réponse différente du monocyte à la CRP. Suite aux résultats issus de l'analyse du transcriptome, nous avons focalisé toute notre attention sur un récepteur nucléaire dont l'expression génique modifiée a été mis en évidence par l'exploitation des résultats des puces à oligonucléotides : le LXRα. Nous avons évalué l'effet de la CRP sur l'expression et l'activation du LXRα et défini les différentes voies de transduction du signal par lesquelles la CRP pouvait agir.

Nous avons pris en compte 250 gènes dont l'expression est modifiée dans les monocytes dans plusieurs situations physiopathologiques caractérisées par une activation de l'inflammation. Sur les 171 gènes qui ont répondus aux critères de sélection statistique, environ 10% ont vu leur expression génique modifiée après exposition des monocytes humains à la CRPp (25µg/mL) pendant 12h. Nous avons montré que la CRP exerce des effets pro-atherogéniques communs sur la biologie du monocyte à travers l'induction génique de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, integrines, et de molécules impliqués à la fois dans l'activité fibrinolytique et le remodelage artériel. Cependant, l'action de la CRP ne semble pas se restreindre à une simple réponse pro-inflammatoire, puisque nous avons mis en évidence des effets anti-athérogéniques via la répression génique de certaines cytokines, chimiokines, d'un inhibiteur de protéase et d'un vasodilatateur.

Dans le but d'analyser séparément les effets de la CRP sur la biologie du monocyte isolés à la fois des hommes et des femmes, nous avons montré qu'il y a des motifs communs induits par la CRP dans les changements d'expression de gène, mais aussi des différences genre spécifique. Nos résultats sont même plus qu'intéressants étant donné que les prélèvements de sang issus des femmes ont été effectués au hasard de leur cycle menstruel. Les effets de la CRP sont probablement assez puissants pour atténuer les effets du cycle. Nos résultats confirment d'autres études récentes qui montrent que la concentration en CRP est

associée à la progression de l'épaississement média-intima de la carotide chez les femmes mais pas chez les hommes. Nos travaux argumentent la possibilité que les médications d'œstrogène exogènes puissent expliquer les niveaux de CRP plus élevés chez les femmes comme rapportés dans l'étude de Framinhgam.

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence pour la première fois l'induction et l'activation, à la fois génique et protéique, du LXRα par la CRP dans le monocyte humain *ex-vivo*. Cette activation est conduite par les voies de transduction du signal ERK MAPK et PI3K qui sont nécessaires à l'expression de l'ARNm de LXRα induit par la CRPr. L'augmentation de l'expression de l'ARNm du LXRα induite par la CRP est médiée principalement à travers le récepteur FcγR de type I (CD 64). LXR, récepteur nucléaire qui hétérodimérise avec d'autres récepteurs nucléaires tels que RXR et PPARs, est un puissant nœud régulateur qui module l'expression de nombreux gènes impliqués dans le remodellage de la paroi vasculaire. Il est considéré comme l'une des cibles pharmaceutiques les plus prometteuses dans le développement de l'athérosclérose et le remodalage de la paroi vasculaire.

PERSPECTIVES :

Suite aux résultats de notre étude, nous projetons de mieux caractériser les voies de transduction du signal reliant la CRP à l'augmentation de l'expression du LXRα. Pour cela, nous proposons, d'une part, de travailler avec des puces à facteurs de transcription, modulateurs pharmacologiques de plusieurs voies biologiques pensées être impliquées dans la transduction du signal médiée par la CRP, et d'autre part, de transfecter des cellules THP-1 avec des gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur LXR intact ou muté.

Nous étudierons alors les genes dont l'expression est sous le contrôle de l'induction du LXR. Nous utiliserons plusieurs approches qui impliquent la co-stimulation des cellules THP-1 avec la CRP et les agonistes du LXR, la co-transfection avec les genes LXR et RXR / PPAR et l'inhibition de l'expression de l'ARNm du LXR à l'aide de siRNA. Nous analyserons les effets de ces expériences sur l'expression génique à l'aide de puces à oligonucléotides et les confirmerons par PCR quantitative en temps réel suivi de l'analyse protéique. Les liens entre CRP et LXR seront investis chez des cohortes de patients inclus dans plusieurs études longitudinales : patients atteints d'infarctus du myocarde, de douleurs cardiaques congestives

et d'hypertension artérielle. Si l'hypothèse des effets anti-inflammatoires de la CRP est correcte, nous devrions observer des profils parallèles dépendants du temps concernant l'expression de l'ARNm et des protéines CRP et LXRα chez des monocytes humains fraichement isolés.

Les résultats attendus sont: (1) une meilleure compréhension de l'étroite relation qui existe entre l'inflammation estimée par les concentrations augmentées de CRP et le remodelage vasculaire qui accompagne les douleurs cardiaques, la vieillesse ou l'hypertension, conditions dans lesquelles les contractions artérielles et ventriculaires sont augmentées aussi bien que l'occurrence de complications cliniques aigues de l'athérosclérose ; (2) une caractérisation de l'implication du LXR comme noyau régulateur de la réponse pro- et anti-inflammatoire impliquée dans le remodelage vasculaire ; (3) une identification de nouvelles cibles thérapeutiques, en amont du LXRα, qui pourraient être utilisées pour moduler le remodelage vasculaire et les complications cardiovasculaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Agrawal A., Cha-Molstad H., Samols D. and Kushner I. (2001) Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50. *J.Immunol.* **166,** 2378-2384.

2. Agrawal A., Cha-Molstad H., Samols D. and Kushner I. (2003) Overexpressed nuclear factor-kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology* **108,** 539-547.

3. Agrawal A., Samols D. and Kushner I. (2003) Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBPbeta to the promoter. *Mol.Immunol.* **40,** 373-380.

4. Agrawal A., Shrive A.K., Greenhough T.J. and Volanakis J.E. (2001) Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J.Immunol.* **166,** 3998-4004.

5. Ahmed N., Thorley R., Xia D., Samols D. and Webster R.O. (1996) Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein exhibit diminished chemotactic factor-induced alveolitis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **153,** 1141-1147.

6. Akira S., Hirano T., Taga T. and Kishimoto T. (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* **4,** 2860-2867.

7. Albelda S.M., Smith C.W. and Ward P.A. (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* **8,** 504-512.

8. Albert M.L., Sauter B. and Bhardwaj N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392,** 86-89.

9. Alberti S., Schuster G., Parini P., Feltkamp D., Diczfalusy U., Rudling M., Angelin B., Bjorkhem I., Pettersson S. and Gustafsson J.A. (2001) Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J.Clin.Invest* **107,** 565-573.

10. Alon R., Kassner P.D., Carr M.W., Finger E.B., Hemler M.E. and Springer T.A. (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J.Cell Biol.* **128,** 1243-1253.

11. Annema A., Sluiter W. and van Furth R. (1992) Effect of interleukin 1, macrophage colony-stimulating factor, and factor increasing monocytopoiesis on the production of leukocytes in mice. *Exp.Hematol.* **20,** 69-74.

12. Apostolopoulos J., Davenport P. and Tipping P.G. (1996) Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **16,** 1007-1012.

13. Asanuma Y., Oeser A., Shintani A.K., Turner E., Olsen N., Fazio S., Linton M.F., Raggi P. and Stein C.M. (2003) Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N.Engl.J.Med.* **349,** 2407-2415.

14. Ayada K., Yokota K., Kobayashi K., Shoenfeld Y., Matsuura E. and Oguma K. (2007) Chronic infections and atherosclerosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1108,** 594-602.

15. Badimon J.J., Meyer B., Feigen L.P., Baron D.A., Chesebro J.H., Fuster V. and Badimon L. (1997) Thrombosis triggered by severe arterial lesions is inhibited by oral administration of a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Eur.J.Clin.Invest* **27,** 568-574.

16. Bang R., Marnell L., Mold C., Stein M.P., Clos K.T., Chivington-Buck C. and Clos T.W. (2005) Analysis of binding sites in human C-reactive protein for Fc{gamma}RI, Fc{gamma}RIIA, and C1q by site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* **280,** 25095-25102.

17. Barath P., Fishbein M.C., Cao J., Berenson J., Helfant R.H. and Forrester J.S. (1990) Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am.J.Cardiol.* **65,** 297-302.

18. Barna B.P., James K. and Deodhar S.D. (1987) Activation of human monocyte tumoricidal activity by C-reactive protein. *Cancer Res.* **47,** 3959-3963.

19. Baron C., Raposo G., Scholl S.M., Bausinger H., Tenza D., Bohbot A., Pouillart P., Goud B., Hanau D. and Salamero J. (2001) Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *J.Cell Sci.* **114,** 999-1010.

20. Barth S., Kleinhappl B., Gutschi A., Jelovcan S. and Marth E. (2000) In vitro cytokine mRNA expression in normal human peripheral blood mononuclear cells. *Inflamm.Res.* **49,** 266-274.

21. Baumann H. and Gauldie J. (1990) Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol.Biol.Med.* **7,** 147-159.

22. Bello G., Cailotto F., Hanriot D., Kolopp-Sarda M.N., Latger-Cannard V., Hess K., Zannad F., Longrois D. and Ropars A. (2008) C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway. *Atherosclerosis.*

23. Berlin C., Bargatze R.F., Campbell J.J., von Andrian U.H., Szabo M.C., Hasslen S.R., Nelson R.D., Berg E.L., Erlandsen S.L. and Butcher E.C. (1995) alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80,** 413-422.

24. Berliner J., Leitinger N., Watson A., Huber J., Fogelman A. and Navab M. (1997) Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb.Haemost.* **78,** 195-199.

25. Bhakdi S., Dorweiler B., Kirchmann R., Torzewski J., Weise E., Tranum-Jensen J., Walev I. and Wieland E. (1995) On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J.Exp.Med.* **182,** 1959-1971.

26. Bhakdi S., Torzewski M., Klouche M. and Hemmes M. (1999) Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19,** 2348-2354.

27. Bhakdi S., Torzewski M., Paprotka K., Schmitt S., Barsoom H., Suriyaphol P., Han S.R., Lackner K.J. and Husmann M. (2004) Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation* **109,** 1870-1876.

28. Bharadwaj D., Stein M.P., Volzer M., Mold C. and Du Clos T.W. (1999) The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J.Exp.Med.* **190,** 585-590.

29. Binder C.J., Chang M.K., Shaw P.X., Miller Y.I., Hartvigsen K., Dewan A. and Witztum J.L. (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat.Med.* **8,** 1218-1226.

30. Bisoendial R., Birjmohun R., Keller T., van Leuven S., Levels H., Levi M., Kastelein J. and Stroes E. (2005) In vivo effects of C-reactive protein (CRP)-infusion into humans. *Circ.Res.* **97,** e115-e116.

31. Bisoendial R.J., Kastelein J.J., Levels J.H., Zwaginga J.J., van den B.B., Reitsma P.H., Meijers J.C., Hartman D., Levi M. and Stroes E.S. (2005) Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ.Res.* **96,** 714-716.

32. Blake G.J. and Ridker P.M. (2003) C-reactive protein: a surrogate risk marker or mediator of atherothrombosis? *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **285,** R1250-R1252.

33. Blaschke F., Bruemmer D., Yin F., Takata Y., Wang W., Fishbein M.C., Okura T., Higaki J., Graf K., Fleck E., Hsueh W.A. and Law R.E. (2004) C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells. *Circulation* **110,** 579-587.

34. Blaschke F., Takata Y., Caglayan E., Collins A., Tontonoz P., Hsueh W.A. and Tangirala R.K. (2006) A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ.Res.* **99,** e88-e99.

35. Bodman-Smith K.B., Melendez A.J., Campbell I., Harrison P.T., Allen J.M. and Raynes J.G. (2002) C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (FcgammaRI). *Immunology* **107,** 252-260.

36. Bodzioch M., Orso E., Klucken J., Langmann T., Bottcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Buchler C., Porsch-Ozcurumez M., Kaminski W.E., Hahmann H.W., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner K.J. and Schmitz G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat.Genet.* **22,** 347-351.

37. Boisvert W.A., Santiago R., Curtiss L.K. and Terkeltaub R.A. (1998) A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J.Clin.Invest* **101,** 353-363.

38. Bommhardt U., Chang K.C., Swanson P.E., Wagner T.H., Tinsley K.W., Karl I.E. and Hotchkiss R.S. (2004) Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J.Immunol.* **172,** 7583-7591.

39. Boring L., Gosling J., Chensue S.W., Kunkel S.L., Farese R.V., Jr., Broxmeyer H.E. and Charo I.F. (1997) Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J.Clin.Invest* **100,** 2552-2561.

40. Boring L., Gosling J., Cleary M. and Charo I.F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394,** 894-897.

41. Bouvenot et al. (1995) Pathologie médicale:cardiologie, angiologie. *Paris:Masson.*

42. Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee S.M., Zhang L.H., Roomp K., van Dam M., Yu L., Brewer C., Collins J.A., Molhuizen H.O., Loubser O., Ouelette B.F., Fichter K., Ashbourne-Excoffon K.J., Sensen C.W., Scherer S., Mott S., Denis M., Martindale D., Frohlich J., Morgan K., Koop B., Pimstone S., Kastelein J.J., Genest J., Jr. and Hayden M.R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.* **22,** 336-345.

43. Brull D.J., Serrano N., Zito F., Jones L., Montgomery H.E., Rumley A., Sharma P., Lowe G.D., World M.J., Humphries S.E. and Hingorani A.D. (2003) Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23,** 2063-2069.

44. Brundish D.E. and Baddiley J. (1968) Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem.J.* **110,** 573-582.

45. Buchta R., Gennaro R., Pontet M., Fridkin M. and Romeo D. (1988) C-reactive protein decreases protein phosphorylation in stimulated human neutrophils. *FEBS Lett.* **237,** 173-177.

46. Buchta R., Pontet M. and Fridkin M. (1987) Binding of C-reactive protein to human neutrophils. *FEBS Lett.* **211,** 165-168.

47. Bunton D.C., Petrie M.C., Hillier C., Johnston F. and McMurray J.J. (2004) The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacol.Ther.* **103,** 179-201.

48. Burger D. and Dayer J.M. (2002) The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3,** S169-S176.

49. Bursill C.A., Channon K.M. and Greaves D.R. (2004) The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr.Opin.Lipidol.* **15,** 145-149.

50. Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* **25,** 169-193.

51. Cabana V.G., Gewurz H. and Siegel J.N. (1982) Interaction of very low density lipoproteins (VLDL) with rabbit C-reactive protein. *J.Immunol.* **128,** 2342-2348.

52. Calabro P., Willerson J.T. and Yeh E.T. (2003) Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* **108,** 1930-1932.

53. Callaghan M.M., Lovis R.M., Rammohan C., Lu Y. and Pope R.M. (1996) Autocrine regulation of collagenase gene expression by TNF-alpha in U937 cells. *J.Leukoc.Biol.* **59,** 125-132.

54. Castrillo A., Joseph S.B., Marathe C., Mangelsdorf D.J. and Tontonoz P. (2003) Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J.Biol.Chem.* **278,** 10443-10449.

55. Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J. and Lanzavecchia A. (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388,** 782-787.

56. Cermak J., Key N.S., Bach R.R., Balla J., Jacob H.S. and Vercellotti G.M. (1993) C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* **82,** 513-520.

57. Cha-Molstad H., Agrawal A., Zhang D., Samols D. and Kushner I. (2000) The Rel family member P50 mediates cytokine-induced C-reactive protein expression by a novel mechanism. *J.Immunol.* **165,** 4592-4597.

58. Chang J.W., Kim C.S., Kim S.B., Park S.K., Park J.S. and Lee S.K. (2005) C-reactive protein induces NF-kappaB activation through intracellular calcium and ROS in human mesangial cells. *Nephron Exp.Nephrol.* **101,** e165-e172.

59. Chen Y., Morimoto S., Kitano S., Koh E., Fukuo K., Jiang B., Chen S., Yasuda O., Hirotani A. and Ogihara T. (1995) Lysophosphatidylcholine causes Ca2+ influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **112,** 69-76.

60. Chomczynski P. and Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat.Protoc.* **1,** 581-585.

61. Ciliberto G., Arcone R., Wagner E.F. and Ruther U. (1987) Inducible and tissue-specific expression of human C-reactive protein in transgenic mice. *EMBO J.* **6,** 4017-4022.

62. Cleland S.J., Sattar N., Petrie J.R., Forouhi N.G., Elliott H.L. and Connell J.M. (2000) Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin.Sci.(Lond)* **98,** 531-535.

63. Cohen A. (1997) Cardiologie et pathologie vasculaire. *Paris:ESTEM*.

64. Cook D.G., Mendall M.A., Whincup P.H., Carey I.M., Ballam L., Morris J.E., Miller G.J. and Strachan D.P. (2000) C-reactive protein concentration in children:

relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* **149,** 139-150.

65. Cook S.A. and Rosenzweig A. (2002) DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine. *Circ.Res.* **91,** 559-564.

66. Costet P., Luo Y., Wang N. and Tall A.R. (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J.Biol.Chem.* **275,** 28240-28245.

67. Daeron M. (1997) Fc receptor biology. *Annu.Rev.Immunol.* **15,** 203-234.

68. Danenberg H.D., Szalai A.J., Swaminathan R.V., Peng L., Chen Z., Seifert P., Fay W.P., Simon D.I. and Edelman E.R. (2003) Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation* **108,** 512-515.

69. Danesh J., Collins R., Appleby P. and Peto R. (1998) Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* **279,** 1477-1482.

70. Danesh J., Collins R. and Peto R. (1997) Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* **350,** 430-436.

71. Das T., Sen A.K., Kempf T., Pramanik S.R., Mandal C. and Mandal C. (2003) Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. *Biochem.J.* **373,** 345-355.

72. Dasu M.R., Devaraj S., Du Clos T.W. and Jialal I. (2007) The biological effects of CRP are not attributable to endotoxin contamination: evidence from TLR4 knockdown human aortic endothelial cells. *J.Lipid Res.* **48,** 509-512.

73. Daugherty A., Webb N.R., Rateri D.L. and King V.L. (2005) Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis. *J.Lipid Res.* **46,** 1812-1822.

74. Davi G. and Patrono C. (2007) Platelet activation and atherothrombosis. *N.Engl.J.Med.* **357,** 2482-2494.

75. Davies M.J. (1990) A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* **82,** II38-II46.

76. Davignon J. and Ganz P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109,** III27-III32.

77. de Beer F.C., Soutar A.K., Baltz M.L., Trayner I.M., Feinstein A. and Pepys M.B. (1982) Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J.Exp.Med.* **156,** 230-242.

78. de Ferranti S.D. and Rifai N. (2007c) C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc.Pathol.* **16,** 14-21.

79. de Ferranti S.D. and Rifai N. (2007a) C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc.Pathol.* **16,** 14-21.

80. de Ferranti S.D. and Rifai N. (2007b) C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc.Pathol.* **16,** 14-21.

81. deFilippi C., Wasserman S., Rosanio S., Tiblier E., Sperger H., Tocchi M., Christenson R., Uretsky B., Smiley M., Gold J., Muniz H., Badalamenti J., Herzog C. and Henrich W. (2003) Cardiac troponin T and C-reactive protein for predicting prognosis, coronary atherosclerosis, and cardiomyopathy in patients undergoing long-term hemodialysis. *JAMA* **290,** 353-359.

82. Delamarre L., Pack M., Chang H., Mellman I. and Trombetta E.S. (2005) Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307,** 1630-1634.

83. der Thusen J.H., Kuiper J., Van Berkel T.J. and Biessen E.A. (2003) Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol.Rev.* **55,** 133-166.

84. DeRisi J., van den H.B., Marc P., Balzi E., Brown P., Jacq C. and Goffeau A. (2000) Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.* **470,** 156-160.

85. Dessein P.H., Joffe B.I. and Stanwix A.E. (2004) High sensitivity C-reactive protein as a disease activity marker in rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* **31,** 1095-1097.

86. Devaraj S., Venugopal S. and Jialal I. (2006) Native pentameric C-reactive protein displays more potent pro-atherogenic activities in human aortic endothelial cells than modified C-reactive protein. *Atherosclerosis* **184,** 48-52.

87. Diaz B. and Lopez-Berestein G. (2000) A distinct element involved in lipopolysaccharide activation of the tumor necrosis factor-alpha promoter in monocytes. *J.Interferon Cytokine Res.* **20,** 741-748.

88. Dichtl W., Nilsson L., Goncalves I., Ares M.P., Banfi C., Calara F., Hamsten A., Eriksson P. and Nilsson J. (1999) Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ.Res.* **84,** 1085-1094.

89. Diehl E.E., Haines G.K., III, Radosevich J.A. and Potempa L.A. (2000) Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am.J.Med.Sci.* **319,** 79-83.

90. Dobrinich R. and Spagnuolo P.J. (1991) Binding of C-reactive protein to human neutrophils. Inhibition of respiratory burst activity. *Arthritis Rheum.* **34,** 1031-1038.

91. Dong Q. and Wright J.R. (1996) Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J.Immunol.* **156,** 4815-4820.

92. Du Clos T.W. (1989) C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J.Immunol.* **143,** 2553-2559.

93. Du Clos T.W., Zlock L.T. and Rubin R.L. (1988) Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *J.Immunol.* **141,** 4266-4270.

94. Duff G.W., Libby P., Ordovas J.M. and Reilly P.R. (2006) The future of living well to 100. *Am.J.Clin.Nutr.* **83,** 488S-490S.

95. Edwards K.M., Gewurz H., Lint T.F. and Mold C. (1982) A role for C-reactive protein in the complement-mediated stimulation of human neutrophils by type 27 Streptococcus pneumoniae. *J.Immunol.* **128,** 2493-2496.

96. Eisenberg M.S., Chen H.J., Warshofsky M.K., Sciacca R.R., Wasserman H.S., Schwartz A. and Rabbani L.E. (2000) Elevated levels of plasma C-reactive protein are associated with decreased graft survival in cardiac transplant recipients. *Circulation* **102,** 2100-2104.

97. Eliassen L.T., Rekdal O., Svendsen J.S. and Osterud B. (2000) TNF 41-62 and TNF 78-96 have distinct effects on LPS-induced tissue factor activity and the production of cytokines in human blood cells. *Thromb.Haemost.* **83,** 598-604.

98. Eriksson E.E. (2004) Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Curr.Opin.Lipidol.* **15,** 553-558.

99. Falk E., Shah P.K. and Fuster V. (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation* **92,** 657-671.

100. Federici M. and Lauro R. (2005) Review article: diabetes and atherosclerosis--running on a common road. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **22 Suppl 2,** 11-15.

101. Fogg D.K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D.R., Cumano A. and Geissmann F. (2006) A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311,** 83-87.

102. Folcik V.A., Aamir R. and Cathcart M.K. (1997) Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17,** 1954-1961.

103. Folsom A.R., Aleksic N., Catellier D., Juneja H.S. and Wu K.K. (2002) C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Am.Heart J.* **144,** 233-238.

104. Forman B.M., Ruan B., Chen J., Schroepfer G.J., Jr. and Evans R.M. (1997) The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94,** 10588-10593.

105. Fourcade O., Simon M.F., Viode C., Rugani N., Leballe F., Ragab A., Fournie B., Sarda L. and Chap H. (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80,** 919-927.

106. Freedman J.E. and Loscalzo J. (2002) Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation* **105,** 2130-2132.

107. Furman M.I., Barnard M.R., Krueger L.A., Fox M.L., Shilale E.A., Lessard D.M., Marchese P., Frelinger A.L., III, Goldberg R.J. and Michelson A.D. (2001)

Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.* **38,** 1002-1006.

108. Gabay C. and Kushner I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N.Engl.J.Med.* **340,** 448-454.

109. Gaboriaud C., Juanhuix J., Gruez A., Lacroix M., Darnault C., Pignol D., Verger D., Fontecilla-Camps J.C. and Arlaud G.J. (2003) The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J.Biol.Chem.* **278,** 46974-46982.

110. Galis Z.S., Sukhova G.K., Kranzhofer R., Clark S. and Libby P. (1995) Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92,** 402-406.

111. Galve-de Rochemonteix B., Wiktorowicz K., Kushner I. and Dayer J.M. (1993) C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages. *J.Leukoc.Biol.* **53,** 439-445.

112. Gan X., Kaplan R., Menke J.G., MacNaul K., Chen Y., Sparrow C.P., Zhou G., Wright S.D. and Cai T.Q. (2001) Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J.Biol.Chem.* **276,** 48702-48708.

113. Ganapathi M.K., Rzewnicki D., Samols D., Jiang S.L. and Kushner I. (1991) Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in Hep 3B cells. *J.Immunol.* **147,** 1261-1265.

114. Gawaz M., Langer H. and May A.E. (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J.Clin.Invest* **115,** 3378-3384.

115. Geng Y.J. and Libby P. (2002) Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22,** 1370-1380.

116. Gershov D., Kim S., Brot N. and Elkon K.B. (2000) C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J.Exp.Med.* **192,** 1353-1364.

117. Gerszten R.E., Garcia-Zepeda E.A., Lim Y.C., Yoshida M., Ding H.A., Gimbrone M.A., Jr., Luster A.D., Luscinskas F.W. and Rosenzweig A. (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398,** 718-723.

118. Gerszten R.E., Luscinskas F.W., Ding H.T., Dichek D.A., Stoolman L.M., Gimbrone M.A., Jr. and Rosenzweig A. (1996) Adhesion of memory lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human vascular endothelial cells under simulated physiological flow conditions in vitro. *Circ.Res.* **79,** 1205-1215.

119. Giachelli C.M., Lombardi D., Johnson R.J., Murry C.E. and Almeida M. (1998) Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am.J.Pathol.* **152,** 353-358.

120. Giannotti G. and Landmesser U. (2007) Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz* **32,** 568-572.

121. Giral P. (1998) Athérome: anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. *Rev.Prat.* **48,** 99-106.

122. Gitlin J.D., Gitlin J.I. and Gitlin D. (1977) Localizing of C-reactive protein in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **20,** 1491-1499.

123. Glagov S., Weisenberg E., Zarins C.K., Stankunavicius R. and Kolettis G.J. (1987) Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N.Engl.J.Med.* **316,** 1371-1375.

124. Goldstein J.A., Demetriou D., Grines C.L., Pica M., Shoukfeh M. and O'Neill W.W. (2000) Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *N.Engl.J.Med.* **343,** 915-922.

125. Gordon S. and Taylor P.R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.* **5,** 953-964.

126. Gosling J., Slaymaker S., Gu L., Tseng S., Zlot C.H., Young S.G., Rollins B.J. and Charo I.F. (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J.Clin.Invest* **103,** 773-778.

127. Grandjean F., Berlage V., Auger L., Robert F., Vankerhoven P. and Cirriez J.M. (2006) High sensitivity CRP, two approaches. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* **21,** 168-171.

128. Greenland P. (2003) Improving risk of coronary heart disease: can a picture make the difference? *JAMA* **289,** 2270-2272.

129. Griendling K.K., Ushio-Fukai M., Lassegue B. and Alexander R.W. (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* **29,** 366-373.

130. Griselli M., Herbert J., Hutchinson W.L., Taylor K.M., Sohail M., Krausz T. and Pepys M.B. (1999) C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J.Exp.Med.* **190,** 1733-1740.

131. Gu L., Okada Y., Clinton S.K., Gerard C., Sukhova G.K., Libby P. and Rollins B.J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol.Cell* **2,** 275-281.

132. Guha M. and Mackman N. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J.Biol.Chem.* **277,** 32124-32132.

133. Guo J., Van Eck M., Twisk J., Maeda N., Benson G.M., Groot P.H. and Van Berkel T.J. (2003) Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23,** 447-453.

134. Gupta S.K., Pillarisetti K. and Lysko P.G. (1999) Modulation of CXCR4 expression and SDF-1alpha functional activity during differentiation of human monocytes and macrophages. *J.Leukoc.Biol.* **66,** 135-143.

135. Hack C.E., Wolbink G.J., Schalkwijk C., Speijer H., Hermens W.T. and van den B.H. (1997) A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunol.Today* **18,** 111-115.

136. Hage F.G. and Szalai A.J. (2007) C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *J.Am.Coll.Cardiol.* **50,** 1115-1122.

137. Haghpassand M., Bourassa P.A., Francone O.L. and Aiello R.J. (2001) Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J.Clin.Invest* **108,** 1315-1320.

138. Hagiwara H., Mitsumata M., Yamane T., Jin X. and Yoshida Y. (1998) Laminar shear stress-induced GRO mRNA and protein expression in endothelial cells. *Circulation* **98,** 2584-2590.

139. Haidari M., Javadi E., Sadeghi B., Hajilooi M. and Ghanbili J. (2001) Evaluation of C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, as a risk factor for stable coronary artery disease. *Clin.Biochem.* **34,** 309-315.

140. Han K.H., Hong K.H., Park J.H., Ko J., Kang D.H., Choi K.J., Hong M.K., Park S.W. and Park S.J. (2004) C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1--mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. *Circulation* **109,** 2566-2571.

141. Hansson G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N.Engl.J.Med.* **352,** 1685-1695.

142. Hansson G.K., Holm J. and Kral J.G. (1984) Accumulation of IgG and complement factor C3 in human arterial endothelium and atherosclerotic lesions. *Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.[A]* **92,** 429-435.

143. Hansson G.K., Libby P., Schonbeck U. and Yan Z.Q. (2002) Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ.Res.* **91,** 281-291.

144. Harpel P.C. and Haque N.S. (2002) Chemokine receptor-8: potential role in atherogenesis. *Isr.Med.Assoc.J.* **4,** 1025-1027.

145. Hashimoto H., Kitagawa K., Hougaku H., Shimizu Y., Sakaguchi M., Nagai Y., Iyama S., Yamanishi H., Matsumoto M. and Hori M. (2001) C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* **104,** 63-67.

146. Hatada E.N., Krappmann D. and Scheidereit C. (2000) NF-kappaB and the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* **12,** 52-58.

147. Hatanaka K., Li X.A., Masuda K., Yutani C. and Yamamoto A. (1995) Immunohistochemical localization of C-reactive protein-binding sites in human

atherosclerotic aortic lesions by a modified streptavidin-biotin-staining method. *Pathol.Int.* **45,** 635-641.

148. Hattori Y., Matsumura M. and Kasai K. (2003) Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc.Res.* **58,** 186-195.

149. Haverkate F., Thompson S.G., Pyke S.D., Gallimore J.R. and Pepys M.B. (1997) Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* **349,** 462-466.

150. Healy A.M., Pickard M.D., Pradhan A.D., Wang Y., Chen Z., Croce K., Sakuma M., Shi C., Zago A.C., Garasic J., Damokosh A.I., Dowie T.L., Poisson L., Lillie J., Libby P., Ridker P.M. and Simon D.I. (2006) Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation* **113,** 2278-2284.

151. Heinrich P.C., Castell J.V. and Andus T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem.J.* **265,** 621-636.

152. Heuertz R.M., Piquette C.A. and Webster R.O. (1993) Rabbits with elevated serum C-reactive protein exhibit diminished neutrophil infiltration and vascular permeability in C5a-induced alveolitis. *Am.J.Pathol.* **142,** 319-328.

153. Heuertz R.M., Schneider G.P., Potempa L.A. and Webster R.O. (2005) Native and modified C-reactive protein bind different receptors on human neutrophils. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **37,** 320-335.

154. Heuertz R.M., Tricomi S.M., Ezekiel U.R. and Webster R.O. (1999) C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. *J.Biol.Chem.* **274,** 17968-17974.

155. Heuertz R.M., Xia D., Samols D. and Webster R.O. (1994) Inhibition of C5a des Arg-induced neutrophil alveolitis in transgenic mice expressing C-reactive protein. *Am.J.Physiol* **266,** L649-L654.

156. Hirano T., Matsuda T., Turner M., Miyasaka N., Buchan G., Tang B., Sato K., Shimizu M., Maini R., Feldmann M. and . (1988) Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol.* **18,** 1797-1801.

157. Hirschfield G.M., Gallimore J.R., Kahan M.C., Hutchinson W.L., Sabin C.A., Benson G.M., Dhillon A.P., Tennent G.A. and Pepys M.B. (2005) Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102,** 8309-8314.

158. Hirschfield G.M., Herbert J., Kahan M.C. and Pepys M.B. (2003) Human C-reactive protein does not protect against acute lipopolysaccharide challenge in mice. *J.Immunol.* **171,** 6046-6051.

159. HOKAMA Y., COLEMAN M.K. and RILEY R.F. (1962) In vitro effects of C-reactive protein on phagocytosis. *J.Bacteriol.* **83,** 1017-1024.

160. Hollenbaugh D., Mischel-Petty N., Edwards C.P., Simon J.C., Denfeld R.W., Kiener P.A. and Aruffo A. (1995) Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J.Exp.Med.* **182,** 33-40.

161. Hubacek J.A., Rothe G., Pit'ha J., Skodova Z., Stanek V., Poledne R. and Schmitz G. (1999) C(-260)-->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* **99,** 3218-3220.

162. Huber S.A., Sakkinen P., Conze D., Hardin N. and Tracy R. (1999) Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19,** 2364-2367.

163. Hundt M., Zielinska-Skowronek M. and Schmidt R.E. (2001) Lack of specific receptors for C-reactive protein on white blood cells. *Eur.J.Immunol.* **31,** 3475-3483.

164. Huo Y., Schober A., Forlow S.B., Smith D.F., Hyman M.C., Jung S., Littman D.R., Weber C. and Ley K. (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat.Med.* **9,** 61-67.

165. Hutchinson W.L., Koenig W., Frohlich M., Sund M., Lowe G.D. and Pepys M.B. (2000) Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin.Chem.* **46,** 934-938.

166. Hynes R.O. and Wagner D.D. (1997) Genetic manipulation of vascular adhesion molecules in mice. *J.Clin.Invest* **100,** S11-S13.

167. Ikonomidis I., Andreotti F., Economou E., Stefanadis C., Toutouzas P. and Nihoyannopoulos P. (1999) Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* **100,** 793-798.

168. Imhof B.A. and Aurrand-Lions M. (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat.Rev.Immunol.* **4,** 432-444.

169. Irving P.M., Macey M.G., Shah U., Webb L., Langmead L. and Rampton D.S. (2004) Formation of platelet-leukocyte aggregates in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* **10,** 361-372.

170. James K., Hansen B. and Gewurz H. (1981) Binding of C-reactive protein to human lymphocytes. II. Interaction with a subset of cells bearing the Fc receptor. *J.Immunol.* **127,** 2545-2550.

171. Janowski B.A., Willy P.J., Devi T.R., Falck J.R. and Mangelsdorf D.J. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383,** 728-731.

172. Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G. and Hansson G.K. (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **6,** 131-138.

173. Jones C.B., Sane D.C. and Herrington D.M. (2003) Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc.Res.* **59,** 812-823.

174. Jones S.A., Novick D., Horiuchi S., Yamamoto N., Szalai A.J. and Fuller G.M. (1999) C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. *J.Exp.Med.* **189,** 599-604.

175. Joseph S.B., Castrillo A., Laffitte B.A., Mangelsdorf D.J. and Tontonoz P. (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat.Med.* **9,** 213-219.

176. Joseph S.B., McKilligin E., Pei L., Watson M.A., Collins A.R., Laffitte B.A., Chen M., Noh G., Goodman J., Hagger G.N., Tran J., Tippin T.K., Wang X., Lusis A.J., Hsueh W.A., Law R.E., Collins J.L., Willson T.M. and Tontonoz P. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99,** 7604-7609.

177. Joyce C.W., Amar M.J., Lambert G., Vaisman B.L., Paigen B., Najib-Fruchart J., Hoyt R.F., Jr., Neufeld E.D., Remaley A.T., Fredrickson D.S., Brewer H.B., Jr. and Santamarina-Fojo S. (2002) The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99,** 407-412.

178. Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los S.K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer E.G., Littman D.R. and Lang R.A. (2002) In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* **17,** 211-220.

179. Kaplan M.H. and Volanakis J.E. (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J.Immunol.* **112,** 2135-2147.

180. Karra R., Vemullapalli S., Dong C., Herderick E.E., Song X., Slosek K., Nevins J.R., West M., Goldschmidt-Clermont P.J. and Seo D. (2005) Molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102,** 16789-16794.

181. Kew R.R., Hyers T.M. and Webster R.O. (1990) Human C-reactive protein inhibits neutrophil chemotaxis in vitro: possible implications for the adult respiratory distress syndrome. *J.Lab Clin.Med.* **115,** 339-345.

182. Khreiss T., Jozsef L., Potempa L.A. and Filep J.G. (2004a) Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* **109,** 2016-2022.

183. Khreiss T., Jozsef L., Potempa L.A. and Filep J.G. (2004b) Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* **110,** 2713-2720.

184. Khreiss T., Jozsef L., Potempa L.A. and Filep J.G. (2005) Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circ.Res.* **97,** 690-697.

185. Kilpatrick J.M. and Volanakis J.E. (1985) Opsonic properties of C-reactive protein. Stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein-coated cells. *J.Immunol.* **134,** 3364-3370.

186. Kim I., Oh J.L., Ryu Y.S., So J.N., Sessa W.C., Walsh K. and Koh G.Y. (2002) Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells. *FASEB J.* **16,** 126-128.

187. Kimberly M.M., Vesper H.W., Caudill S.P., Cooper G.R., Rifai N., Dati F. and Myers G.L. (2003) Standardization of immunoassays for measurement of high-sensitivity C-reactive protein. Phase I: evaluation of secondary reference materials. *Clin.Chem.* **49,** 611-616.

188. Kindmark C.O. (1971) Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various species of pathogenic bacteria. *Clin.Exp.Immunol.* **8,** 941-948.

189. Klegeris A., Singh E.A. and McGeer P.L. (2002) Effects of C-reactive protein and pentosan polysulphate on human complement activation. *Immunology* **106,** 381-388.

190. Kluft C. and de Maat M.P. (2003) Genetics of C-reactive protein: new possibilities and complications. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23,** 1956-1959.

191. Kobayashi S., Inoue N., Ohashi Y., Terashima M., Matsui K., Mori T., Fujita H., Awano K., Kobayashi K., Azumi H., Ejiri J., Hirata K., Kawashima S., Hayashi Y., Yokozaki H., Itoh H. and Yokoyama M. (2003) Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23,** 1398-1404.

192. Koch A.E., Kunkel S.L., Pearce W.H., Shah M.R., Parikh D., Evanoff H.L., Haines G.K., Burdick M.D. and Strieter R.M. (1993) Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am.J.Pathol.* **142,** 1423-1431.

193. Koenig W., Sund M., Frohlich M., Fischer H.G., Lowel H., Doring A., Hutchinson W.L. and Pepys M.B. (1999) C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* **99,** 237-242.

194. Kol A., Bourcier T., Lichtman A.H. and Libby P. (1999) Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J.Clin.Invest* **103,** 571-577.

195. Kolodgie F.D., Narula J., Burke A.P., Haider N., Farb A., Hui-Liang Y., Smialek J. and Virmani R. (2000) Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am.J.Pathol.* **157,** 1259-1268.

196. Kushner I. and Kaplan M.H. (1961) Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions. *J.Exp.Med.* **114,** 961-974.

197. Kushner I., RAKITA L. and Kaplan M.H. (1963) Studies of acute-phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbits. *J.Clin.Invest* **42,** 286-292.

198. Labarrere C.A., Lee J.B., Nelson D.R., Al Hassani M., Miller S.J. and Pitts D.E. (2002) C-reactive protein, arterial endothelial activation, and development of transplant coronary artery disease: a prospective study. *Lancet* **360,** 1462-1467.

199. Laffitte B.A., Joseph S.B., Chen M., Castrillo A., Repa J., Wilpitz D., Mangelsdorf D. and Tontonoz P. (2003) The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol.Cell Biol.* **23,** 2182-2191.

200. Le Bouter S., Demolombe S., Chambellan A., Bellocq C., Aimond F., Toumaniantz G., Lande G., Siavoshian S., Baro I., Pond A.L., Nerbonne J.M., Leger J.J., Escande D. and Charpentier F. (2003) Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ.Res.* **92,** 234-242.

201. Leinwand L.A. (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J.Clin.Invest* **112,** 302-307.

202. Lenter M., Uhlig H., Hamann A., Jeno P., Imhof B. and Vestweber D. (1993) A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90,** 9051-9055.

203. Leon B., Lopez-Bravo M. and Ardavin C. (2005) Monocyte-derived dendritic cells. *Semin.Immunol.* **17,** 313-318.

204. Li J.J. and Fang C.H. (2004) C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med.Hypotheses* **62,** 499-506.

205. Li S.H., Szmitko P.E., Weisel R.D., Wang C.H., Fedak P.W., Li R.K., Mickle D.A. and Verma S. (2004) C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* **109,** 833-836.

206. Li S.P., Liu T.Y. and Goldman N.D. (1990) cis-acting elements responsible for interleukin-6 inducible C-reactive protein gene expression. *J.Biol.Chem.* **265,** 4136-4142.

207. Li Y.P., Mold C. and Du Clos T.W. (1994) Sublytic complement attack exposes C-reactive protein binding sites on cell membranes. *J.Immunol.* **152,** 2995-3005.

208. Libby P., Egan D. and Skarlatos S. (1997) Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* **96,** 4095-4103.

209. Libby P. and Li H. (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J.Clin.Invest* **92,** 538-539.

210. Libby P., Ridker P.M. and Maseri A. (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105,** 1135-1143.

211. Lijnen H.R. (2002) Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem.Soc.Trans.* **30,** 163-167.

212. Lin M.C., Almus-Jacobs F., Chen H.H., Parry G.C., Mackman N., Shyy J.Y. and Chien S. (1997) Shear stress induction of the tissue factor gene. *J.Clin.Invest* **99,** 737-744.

213. Lindahl B., Toss H., Siegbahn A., Venge P. and Wallentin L. (2000) Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N.Engl.J.Med.* **343,** 1139-1147.

214. Liu C., Wang S., Deb A., Nath K.A., Katusic Z.S., McConnell J.P. and Caplice N.M. (2005) Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation. *Circ.Res.* **97,** 135-143.

215. Liu Y., Hulten L.M. and Wiklund O. (1997) Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17,** 317-323.

216. Liuzzo G., Biasucci L.M., Gallimore J.R., Grillo R.L., Rebuzzi A.G., Pepys M.B. and Maseri A. (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N.Engl.J.Med.* **331,** 417-424.

217. Loppnow H., Werdan K., Reuter G. and Flad H.D. (1998) The interleukin-1 and interleukin-1 converting enzyme families in the cardiovascular system. *Eur.Cytokine Netw.* **9,** 675-680.

218. Lu B., Rutledge B.J., Gu L., Fiorillo J., Lukacs N.W., Kunkel S.L., North R., Gerard C. and Rollins B.J. (1998) Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J.Exp.Med.* **187,** 601-608.

219. Luc G., Lecerf JM. and Bard JM.et al (1991) Cholestérol et athérosclérose. *Paris:Masson*.

220. Lucau-Danila A., Lelandais G., Kozovska Z., Tanty V., Delaveau T., Devaux F. and Jacq C. (2005) Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol.Cell Biol.* **25,** 1860-1868.

221. Luscinskas F.W., Kansas G.S., Ding H., Pizcueta P., Schleiffenbaum B.E., Tedder T.F. and Gimbrone M.A., Jr. (1994) Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J.Cell Biol.* **125,** 1417-1427.

222. Ma J. and Liew C.C. (2003) Gene profiling identifies secreted protein transcripts from peripheral blood cells in coronary artery disease. *J.Mol.Cell Cardiol.* **35,** 993-998.

223. Mach F., Schonbeck U., Bonnefoy J.Y., Pober J.S. and Libby P. (1997) Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* **96,** 396-399.

224. Mach F., Schonbeck U., Sukhova G.K., Atkinson E. and Libby P. (1998) Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* **394,** 200-203.

225. Macintyre S., Samols D. and Dailey P. (1994) Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. *J.Biol.Chem.* **269,** 24496-24503.

226. MacIntyre S.S., Kushner I. and Samols D. (1985) Secretion of C-reactive protein becomes more efficient during the course of the acute phase response. *J.Biol.Chem.* **260,** 4169-4173.

227. Mackness M.I., Mackness B., Durrington P.N., Fogelman A.M., Berliner J., Lusis A.J., Navab M., Shih D. and Fonarow G.C. (1998) Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr.Opin.Lipidol.* **9,** 319-324.

228. Madrid L.V., Mayo M.W., Reuther J.Y. and Baldwin A.S., Jr. (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J.Biol.Chem.* **276,** 18934-18940.

229. Mahoney T.S., Weyrich A.S., Dixon D.A., McIntyre T., Prescott S.M. and Zimmerman G.A. (2001) Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98,** 10284-10289.

230. Mallat Z., Besnard S., Duriez M., Deleuze V., Emmanuel F., Bureau M.F., Soubrier F., Esposito B., Duez H., Fievet C., Staels B., Duverger N., Scherman D. and Tedgui A. (1999) Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ.Res.* **85,** e17-e24.

231. Margaglione M., Cappucci G., Colaizzo D., Vecchione G., Grandone E. and Di Minno G. (2000) C-reactive protein in offspring is associated with the occurrence of myocardial infarction in first-degree relatives. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20,** 198-203.

232. Marnell L., Mold C. and Du Clos T.W. (2005a) C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin.Immunol.* **117,** 104-111.

233. Marnell L., Mold C. and Du Clos T.W. (2005b) C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin.Immunol.* **117,** 104-111.

234. Marnell L., Mold C. and Du Clos T.W. (2005c) C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin.Immunol.* **117,** 104-111.

235. Marnell L.L., Mold C., Volzer M.A., Burlingame R.W. and Du Clos T.W. (1995) C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells. *J.Immunol.* **155,** 2185-2193.

236. Martin M., Rehani K., Jope R.S. and Michalek S.M. (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat.Immunol.* **6,** 777-784.

237. Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., LaFace D.M. and Green D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J.Exp.Med.* **182,** 1545-1556.

238. Matzinger P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296,** 301-305.

239. Mazzolai L., Duchosal M.A., Korber M., Bouzourene K., Aubert J.F., Hao H., Vallet V., Brunner H.R., Nussberger J., Gabbiani G. and Hayoz D. (2004) Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE-/- mice. *Hypertension* **44,** 277-282.

240. McCloskey M.A., Dankert J.R. and Esser A.F. (1989) Assembly of complement components C5b-8 and C5b-9 on lipid bilayer membranes: visualization by freeze-etch electron microscopy. *Biochemistry* **28,** 534-540.

241. McEver R.P. and Cummings R.D. (1997) Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J.Clin.Invest* **100,** 485-491.

242. McIntyre T.M., Prescott S.M., Weyrich A.S. and Zimmerman G.A. (2003) Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr.Opin.Hematol.* **10,** 150-158.

243. Mendall M.A., Patel P., Ballam L., Strachan D. and Northfield T.C. (1996) C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ* **312,** 1061-1065.

244. Menten P., Wuyts A. and Van Damme J. (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13,** 455-481.

245. Methia N., Andre P., Denis C.V., Economopoulos M. and Wagner D.D. (2001) Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* **98,** 1424-1428.

246. Michowitz Y., Goldstein E., Roth A., Afek A., Abashidze A., Ben Gal Y., Keren G. and George J. (2005) The involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in atherosclerosis. *J.Am.Coll.Cardiol.* **45,** 1018-1024.

247. Miles S.A., Rezai A.R., Salazar-Gonzalez J.F., Vander M.M., Stevens R.H., Logan D.M., Mitsuyasu R.T., Taga T., Hirano T., Kishimoto T. and . (1990) AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87,** 4068-4072.

248. Miller D.T., Ridker P.M., Libby P. and Kwiatkowski D.J. (2007) Atherosclerosis: the path from genomics to therapeutics. *J.Am.Coll.Cardiol.* **49,** 1589-1599.

249. Mold C., Gresham H.D. and Du Clos T.W. (2001) Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs. *J.Immunol.* **166,** 1200-1205.

250. Mold C., Rodriguez W., Rodic-Polic B. and Du Clos T.W. (2002) C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. *J.Immunol.* **169,** 7019-7025.

251. Mondy J.S., Lindner V., Miyashiro J.K., Berk B.C., Dean R.H. and Geary R.L. (1997) Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circ.Res.* **81,** 320-327.

252. Montero I., Orbe J., Varo N., Beloqui O., Monreal J.I., Rodriguez J.A., Diez J., Libby P. and Paramo J.A. (2006) C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J.Am.Coll.Cardiol.* **47,** 1369-1378.

253. Moreno P.R., Purushothaman K.R., Fuster V., Echeverri D., Truszczynska H., Sharma S.K., Badimon J.J. and O'Connor W.N. (2004) Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* **110,** 2032-2038.

254. Morrison T.B., Weis J.J. and Wittwer C.T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24,** 954-8, 960, 962.

255. Mortensen R.F. and Duszkiewicz J.A. (1977) Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors. *J.Immunol.* **119,** 1611-1616.

256. Mortensen R.F., Osmand A.P. and Gewurz H. (1975) Effects on C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-dependent lymphocytes and alteration of their functions. *J.Exp.Med.* **141,** 821-839.

257. Mortensen R.F., Osmand A.P., Lint T.F. and Gewurz H. (1976) Interaction of C-reactive protein with lymphocytes and monocytes: complement-dependent adherence and phagocytosis. *J.Immunol.* **117,** 774-781.

258. Muller H. and Fehr J. (1986) Binding of C-reactive protein to human polymorphonuclear leukocytes: evidence for association of binding sites with Fc receptors. *J.Immunol.* **136,** 2202-2207.

259. Muller W.A., Weigl S.A., Deng X. and Phillips D.M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J.Exp.Med.* **178,** 449-460.

260. Munro J.M. and Cotran R.S. (1988) The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* **58,** 249-261.

261. Munsch B., Lizard G., Gueldry S. and Gambert P. (1995) [Agents inducing cell death of the vascular wall]. *Ann.Biol.Clin.(Paris)* **53,** 473-480.

262. Murphy C., Beckers J. and Ruther U. (1995) Regulation of the human C-reactive protein gene in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* **270,** 704-708.

263. Nagel T., Resnick N., Atkinson W.J., Dewey C.F., Jr. and Gimbrone M.A., Jr. (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J.Clin.Invest* **94,** 885-891.

264. Nakagomi A., Freedman S.B. and Geczy C.L. (2000) Interferon-gamma and lipopolysaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by C-reactive protein: relationship with age, sex, and hormone replacement treatment. *Circulation* **101,** 1785-1791.

265. Nakashima Y., Raines E.W., Plump A.S., Breslow J.L. and Ross R. (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18,** 842-851.

266. Nakayama M., Takahashi K., Murakami O., Murakami H., Sasano H., Shirato K. and Shibahara S. (1999) Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin.Sci.(Lond)* **97,** 247-251.

267. Napoli C., D'Armiento F.P., Mancini F.P., Postiglione A., Witztum J.L., Palumbo G. and Palinski W. (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J.Clin.Invest* **100,** 2680-2690.

268. Niemann-Jonsson A., Dimayuga P., Jovinge S., Calara F., Ares M.P., Fredrikson G.N. and Nilsson J. (2000) Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor-alpha expression. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20,** 2205-2211.

269. Nikfardjam M., Mullner M., Schreiber W., Oschatz E., Exner M., Domanovits H., Laggner A.N. and Huber K. (2000) The association between C-reactive protein on admission and mortality in patients with acute myocardial infarction. *J.Intern.Med.* **247,** 341-345.

270. O'Brien K.D., McDonald T.O., Chait A., Allen M.D. and Alpers C.E. (1996) Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* **93,** 672-682.

271. Osterud B. and Bjorklid E. (2003) Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev.* **83,** 1069-1112.

272. Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M. and Donner D.B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401,** 82-85.

273. Papanicolaou D.A., Wilder R.L., Manolagas S.C. and Chrousos G.P. (1998) The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann.Intern.Med.* **128,** 127-137.

274. Pasceri V., Cheng J.S., Willerson J.T. and Yeh E.T. (2001) Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* **103,** 2531-2534.

275. Pasceri V., Willerson J.T. and Yeh E.T. (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* **102,** 2165-2168.

276. Pasterkamp G., Schoneveld A.H., Hijnen D.J., de Kleijn D.P., Teepen H., van der Wal A.C. and Borst C. (2000) Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* **150,** 245-253.

277. Paul A., Ko K.W., Li L., Yechoor V., McCrory M.A., Szalai A.J. and Chan L. (2004) C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **109,** 647-655.

278. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O., III, Criqui M., Fadl Y.Y., Fortmann S.P., Hong Y., Myers G.L., Rifai N., Smith S.C., Jr., Taubert K., Tracy R.P. and Vinicor F. (2003) Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* **107,** 499-511.

279. Peet D.J., Janowski B.A. and Mangelsdorf D.J. (1998) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **8,** 571-575.

280. Peet D.J., Turley S.D., Ma W., Janowski B.A., Lobaccaro J.M., Hammer R.E. and Mangelsdorf D.J. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93,** 693-704.

281. Pepys J. and Longbottom J.L. (1971) Antigenic and C-substance activities of related glycopeptides from fungal, parasitic and vegetable sources. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **41,** 219-221.

282. Pepys M.B., Booth S.E., Tennent G.A., Butler P.J. and Williams D.G. (1994) Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin.Exp.Immunol.* **97,** 152-157.

283. Pepys M.B., Hawkins P.N., Kahan M.C., Tennent G.A., Gallimore J.R., Graham D., Sabin C.A., Zychlinsky A. and de Diego J. (2005) Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. *Circ.Res.* **97,** e97-103.

284. Pepys M.B. and Hirschfield G.M. (2003) C-reactive protein: a critical update. *J.Clin.Invest* **111,** 1805-1812.

285. Philip R. and Epstein L.B. (1986) Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature* **323,** 86-89.

286. Poitras E. and Houde A. (2002) **La PCR en temps réel: principes et applications**. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2,** 2-11.

287. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P., Zemel E.S. and Gewurz H. (1983b) Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol.Immunol.* **20,** 1165-1175.

288. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P., Zemel E.S. and Gewurz H. (1983a) Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol.Immunol.* **20,** 1165-1175.

289. Potempa L.A., Siegel J.N., Fiedel B.A., Potempa R.T. and Gewurz H. (1987) Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Mol.Immunol.* **24,** 531-541.

290. Potter M. (1971) Antigen-binding myeloma proteins in mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **190,** 306-321.

291. Pradhan A.D., Manson J.E., Rossouw J.E., Siscovick D.S., Mouton C.P., Rifai N., Wallace R.B., Jackson R.D., Pettinger M.B. and Ridker P.M. (2002) Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA* **288,** 980-987.

292. Praillet C., Grimaud JA. and Lortat-Jacob H. (1998) Les protéoglycannes. I, Molécules aux multiples fonctions : futures molécules thérapeutiques? *Med.Sci.* **14,** 412-420.

293. Prufer K. and Boudreaux J. (2007) Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated. *J.Cell Biochem.* **100,** 69-85.

294. Raines E.W. and Ross R. (1996) Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays* **18,** 271-282.

295. Rajaram M.V., Ganesan L.P., Parsa K.V., Butchar J.P., Gunn J.S. and Tridandapani S. (2006) Akt/Protein kinase B modulates macrophage inflammatory response to Francisella infection and confers a survival advantage in mice. *J.Immunol.* **177,** 6317-6324.

296. Rajavashisth T.B., Andalibi A., Territo M.C., Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M. and Lusis A.J. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344,** 254-257.

297. Rajavashisth T.B., Yamada H. and Mishra N.K. (1995) Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **15,** 1591-1598.

298. Randolph G.J., Angeli V. and Swartz M.A. (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* **5,** 617-628.

299. Reape T.J. and Groot P.H. (1999) Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147,** 213-225.

300. Repa J.J., Turley S.D., Lobaccaro J.A., Medina J., Li L., Lustig K., Shan B., Heyman R.A., Dietschy J.M. and Mangelsdorf D.J. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289,** 1524-1529.

301. Resnick N., Collins T., Atkinson W., Bonthron D.T., Dewey C.F., Jr. and Gimbron M.A., Jr. (1993) Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90,** 7908.

302. Reynolds G.D. and Vance R.P. (1987) C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch.Pathol.Lab Med.* **111,** 265-269.

303. Ridker P.M. (1999) Evaluating novel cardiovascular risk factors: can we better predict heart attacks? *Ann.Intern.Med.* **130,** 933-937.

304. Ridker P.M. (2003) Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107,** 363-369.

305. Ridker P.M. (2004) Inflammation in atherothrombosis: how to use high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in clinical practice. *Am.Heart Hosp.J.* **2,** 4-9.

306. Ridker P.M., Cannon C.P., Morrow D., Rifai N., Rose L.M., McCabe C.H., Pfeffer M.A. and Braunwald E. (2005) C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N.Engl.J.Med.* **352,** 20-28.

307. Ridker P.M. and Cook N. (2004) Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores. *Circulation* **109,** 1955-1959.

308. Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P. and Hennekens C.H. (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N.Engl.J.Med.* **336,** 973-979.

309. Ridker P.M., Hennekens C.H., Buring J.E. and Rifai N. (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N.Engl.J.Med.* **342,** 836-843.

310. Ridker P.M., Rifai N., Rose L., Buring J.E. and Cook N.R. (2002) Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N.Engl.J.Med.* **347,** 1557-1565.

311. Ridker P.M., Rifai N., Stampfer M.J. and Hennekens C.H. (2000) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* **101,** 1767-1772.

312. Rifai N. and Ridker P.M. (2001) Proposed cardiovascular risk assessment algorithm using high-sensitivity C-reactive protein and lipid screening. *Clin.Chem.* **47,** 28-30.

313. Rohde L.E., Hennekens C.H. and Ridker P.M. (1999) Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am.J.Cardiol.* **84,** 1018-1022.

314. Rosamond W., Flegal K., Friday G., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D., McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C.J., Roger V., Rumsfeld J., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S. and Hong Y. (2007) Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **115,** e69-171.

315. Rosenfeld M.E. and Ross R. (1990) Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **10,** 680-687.

316. Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362,** 801-809.

317. Ross R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* **340,** 115-126.

318. Rouis M., Adamy C., Duverger N., Lesnik P., Horellou P., Moreau M., Emmanuel F., Caillaud J.M., Laplaud P.M., Dachet C. and Chapman M.J. (1999) Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **100,** 533-540.

319. Roux K.H., Kilpatrick J.M., Volanakis J.E. and Kearney J.F. (1983) Localization of the phosphocholine-binding sites on C-reactive protein by immunoelectron microscopy. *J.Immunol.* **131,** 2411-2415.

320. Rowe I.F., Walker L.N., Bowyer D.E., Soutar A.K., Smith L.C. and Pepys M.B. (1985) Immunohistochemical studies of C-reactive protein and apolipoprotein B in inflammatory and arterial lesions. *J.Pathol.* **145,** 241-249.

321. Rust S., Rosier M., Funke H., Real J., Amoura Z., Piette J.C., Deleuze J.F., Brewer H.B., Duverger N., Denefle P. and Assmann G. (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* **22,** 352-355.

322. Rutter M.K., Meigs J.B., Sullivan L.M., D'Agostino R.B., Sr. and Wilson P.W. (2004) C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Circulation* **110,** 380-385.

323. Saeland E., van Royen A., Hendriksen K., Vile-Weekhout H., Rijkers G.T., Sanders L.A. and van de Winkel J.G. (2001) Human C-reactive protein does not bind to FcgammaRIIa on phagocytic cells. *J.Clin.Invest* **107,** 641-643.

324. Sander K., Horn C.S., Briesenick C. and Sander D. (2007) High-sensitivity C-reactive protein is independently associated with early carotid artery progression in women but not in men: the INVADE Study. *Stroke* **38,** 2881-2886.

325. Sarma J., Laan C.A., Alam S., Jha A., Fox K.A. and Dransfield I. (2002) Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* **105,** 2166-2171.

326. Savill J., Dransfield I., Gregory C. and Haslett C. (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* **2,** 965-975.

327. Sawyer R.T., Strausbauch P.H. and Volkman A. (1982) Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest* **46,** 165-170.

328. Schmidt A.M., Yan S.D., Wautier J.L. and Stern D. (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ.Res.* **84,** 489-497.

329. Schonbeck U., Mach F., Bonnefoy J.Y., Loppnow H., Flad H.D. and Libby P. (1997a) Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J.Biol.Chem.* **272,** 19569-19574.

330. Schonbeck U., Mach F., Sukhova G.K., Murphy C., Bonnefoy J.Y., Fabunmi R.P. and Libby P. (1997b) Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ.Res.* **81,** 448-454.

331. Schultz J.R., Tu H., Luk A., Repa J.J., Medina J.C., Li L., Schwendner S., Wang S., Thoolen M., Mangelsdorf D.J., Lustig K.D. and Shan B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14,** 2831-2838.

332. Schuster G.U., Parini P., Wang L., Alberti S., Steffensen K.R., Hansson G.K., Angelin B. and Gustafsson J.A. (2002) Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation* **106,** 1147-1153.

333. Schwartz K., Lawn R.M. and Wade D.P. (2000) ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **274,** 794-802.

334. Scirica B.M. and Morrow D.A. (2006) Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* **113,** 2128-2134.

335. See R., Abdullah S.M., McGuire D.K., Khera A., Patel M.J., Lindsey J.B., Grundy S.M. and de Lemos J.A. (2007) The association of differing measures of overweight and obesity with prevalent atherosclerosis: the Dallas Heart Study. *J.Am.Coll.Cardiol.* **50,** 752-759.

336. Seifert P.S., Hugo F., Tranum-Jensen J., Zahringer U., Muhly M. and Bhakdi S. (1990) Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J.Exp.Med.* **172,** 547-557.

337. Seo D., Wang T., Dressman H., Herderick E.E., Iversen E.S., Dong C., Vata K., Milano C.A., Rigat F., Pittman J., Nevins J.R., West M. and Goldschmidt-Clermont

P.J. (2004) Gene expression phenotypes of atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24,** 1922-1927.

338. Serino L. and Virji M. (2000) Phosphorylcholine decoration of lipopolysaccharide differentiates commensal Neisseriae from pathogenic strains: identification of licA-type genes in commensal Neisseriae. *Mol.Microbiol.* **35,** 1550-1559.

339. Shepherd J., Cobbe S.M., Ford I., Isles C.G., Lorimer A.R., MacFarlane P.W., McKillop J.H. and Packard C.J. (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.* **333,** 1301-1307.

340. Shine B., de Beer F.C. and Pepys M.B. (1981) Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. *Clin.Chim.Acta* **117,** 13-23.

341. Shrive A.K., Cheetham G.M., Holden D., Myles D.A., Turnell W.G., Volanakis J.E., Pepys M.B., Bloomer A.C. and Greenhough T.J. (1996) Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat.Struct.Biol.* **3,** 346-354.

342. Siegel J., Osmand A.P., Wilson M.F. and Gewurz H. (1975) Interactions of C-reactive protein with the complement system. II. C-reactive protein-mediated consumption of complement by poly-L-lysine polymers and other polycations. *J.Exp.Med.* **142,** 709-721.

343. Silence J., Collen D. and Lijnen H.R. (2002) Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ.Res.* **90,** 897-903.

344. Simionescu N., Vasile E., Lupu F., Popescu G. and Simionescu M. (1986) Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am.J.Pathol.* **123,** 109-125.

345. Singaraja R.R., Fievet C., Castro G., James E.R., Hennuyer N., Clee S.M., Bissada N., Choy J.C., Fruchart J.C., McManus B.M., Staels B. and Hayden M.R. (2002) Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J.Clin.Invest* **110,** 35-42.

346. Slager C.J., Wentzel J.J., Gijsen F.J., Thury A., van der Wal A.C., Schaar J.A. and Serruys P.W. (2005) The role of shear stress in the destabilization of vulnerable plaques and related therapeutic implications. *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* **2,** 456-464.

347. Sluijter J.P., Pulskens W.P., Schoneveld A.H., Velema E., Strijder C.F., Moll F., de Vries J.P., Verheijen J., Hanemaaijer R., de Kleijn D.P. and Pasterkamp G. (2006) Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke* **37,** 235-239.

348. Smyth E.M. and FitzGerald G.A. (2002) Human prostacyclin receptor. *Vitam.Horm.* **65,** 149-165.

349. Speidl W.S., Graf S., Hornykewycz S., Nikfardjam M., Niessner A., Zorn G., Wojta J. and Huber K. (2002) High-sensitivity C-reactive protein in the prediction of coronary events in patients with premature coronary artery disease. *Am.Heart J.* **144,** 449-455.

350. Springer T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76,** 301-314.

351. Stary H.C. (1994) Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res.Cardiol.* **89 Suppl 1,** 17-32.

352. Stefanadis C., Diamantopoulos L., Dernellis J., Economou E., Tsiamis E., Toutouzas K., Vlachopoulos C. and Toutouzas P. (2000) Heat production of atherosclerotic plaques and inflammation assessed by the acute phase proteins in acute coronary syndromes. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32,** 43-52.

353. Stein M.P., Edberg J.C., Kimberly R.P., Mangan E.K., Bharadwaj D., Mold C. and Du Clos T.W. (2000) C-reactive protein binding to FcgammaRIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J.Clin.Invest* **105,** 369-376.

354. Stemme S., Faber B., Holm J., Wiklund O., Witztum J.L. and Hansson G.K. (1995) T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92,** 3893-3897.

355. Stemme S., Holm J. and Hansson G.K. (1992) T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler.Thromb.* **12,** 206-211.

356. Sternik L., Samee S., Schaff H.V., Zehr K.J., Lerman L.O., Holmes D.R., Herrmann J. and Lerman A. (2002) C-reactive protein relaxes human vessels in vitro. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22,** 1865-1868.

357. Stone P.H., Coskun A.U., Yeghiazarians Y., Kinlay S., Popma J.J., Kuntz R.E. and Feldman C.L. (2003) Prediction of sites of coronary atherosclerosis progression: In vivo profiling of endothelial shear stress, lumen, and outer vessel wall characteristics to predict vascular behavior. *Curr.Opin.Cardiol.* **18,** 458-470.

358. Stulnig T.M., Steffensen K.R., Gao H., Reimers M., Dahlman-Wright K., Schuster G.U. and Gustafsson J.A. (2002) Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol.Pharmacol.* **62,** 1299-1305.

359. Szalai A.J., Briles D.E. and Volanakis J.E. (1995) Human C-reactive protein is protective against fatal Streptococcus pneumoniae infection in transgenic mice. *J.Immunol.* **155,** 2557-2563.

360. Szalai A.J., Briles D.E. and Volanakis J.E. (1996) Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from Streptococcus pneumoniae. *Infect.Immun.* **64,** 4850-4853.

361. Szalai A.J. and McCrory M.A. (2002) Varied biologic functions of C-reactive protein: lessons learned from transgenic mice. *Immunol.Res.* **26,** 279-287.

362. Szalai A.J., McCrory M.A., Cooper G.S., Wu J. and Kimberly R.P. (2002) Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun.* **3,** 14-19.

363. Szalai A.J., Nataf S., Hu X.Z. and Barnum S.R. (2002) Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. *J.Immunol.* **168,** 5792-5797.

364. Szalai A.J., van Ginkel F.W., Dalrymple S.A., Murray R., McGhee J.R. and Volanakis J.E. (1998) Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice. *J.Immunol.* **160,** 5294-5299.

365. Szalai A.J., VanCott J.L., McGhee J.R., Volanakis J.E. and Benjamin W.H., Jr. (2000) Human C-reactive protein is protective against fatal Salmonella enterica serovar typhimurium infection in transgenic mice. *Infect.Immun.* **68,** 5652-5656.

366. Szalai A.J., Wu J., Lange E.M., McCrory M.A., Langefeld C.D., Williams A., Zakharkin S.O., George V., Allison D.B., Cooper G.S., Xie F., Fan Z., Edberg J.C. and Kimberly R.P. (2005) Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J.Mol.Med.* **83,** 440-447.

367. Szmitko P.E., Wang C.H., Weisel R.D., de Almeida J.R., Anderson T.J. and Verma S. (2003a) New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* **108,** 1917-1923.

368. Szmitko P.E., Wang C.H., Weisel R.D., Jeffries G.A., Anderson T.J. and Verma S. (2003b) Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* **108,** 2041-2048.

369. Tabibiazar R., Wagner R.A., Ashley E.A., King J.Y., Ferrara R., Spin J.M., Sanan D.A., Narasimhan B., Tibshirani R., Tsao P.S., Efron B. and Quertermous T. (2005) Signature patterns of gene expression in mouse atherosclerosis and their correlation to human coronary disease. *Physiol Genomics* **22,** 213-226.

370. Takahashi M., Masuyama J., Ikeda U., Kasahara T., Kitagawa S., Takahashi Y., Shimada K. and Kano S. (1995) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ.Res.* **76,** 750-757.

371. Tangirala R.K., Bischoff E.D., Joseph S.B., Wagner B.L., Walczak R., Laffitte B.A., Daige C.L., Thomas D., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Wang X., Lusis A.J., Tontonoz P. and Schulman I.G. (2002) Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99,** 11896-11901.

372. Tarling J.D., Lin H.S. and Hsu S. (1987) Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J.Leukoc.Biol.* **42,** 443-446.

373. Taskinen S., Kovanen P.T., Jarva H., Meri S. and Pentikainen M.O. (2002) Binding of C-reactive protein to modified low-density-lipoprotein particles: identification of cholesterol as a novel ligand for C-reactive protein. *Biochem.J.* **367,** 403-412.

374. Taylor A.W. and Mortensen R.F. (1991) Effect of alpha-2-macroglobulin on cytokine-mediated human C-reactive protein production. *Inflammation* **15,** 61-70.

375. Taylor K.E., Giddings J.C. and van den Berg C.W. (2005) C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25,** 1225-1230.

376. Taylor K.E. and van den Berg C.W. (2007b) Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology* **120,** 404-411.

377. Taylor K.E. and van den Berg C.W. (2007a) Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology* **120,** 404-411.

378. Tebo J.M. and Mortensen R.F. (1990) Characterization and isolation of a C-reactive protein receptor from the human monocytic cell line U-937. *J.Immunol.* **144,** 231-238.

379. Tebo J.M. and Mortensen R.F. (1991) Internalization and degradation of receptor bound C-reactive protein by U-937 cells: induction of H2O2 production and tumoricidal activity. *Biochim.Biophys.Acta* **1095,** 210-216.

380. Tennent G.A., Hutchinson W.L., Kahan M.C., Hirschfield G.M., Gallimore J.R., Lewin J., Sabin C.A., Dhillon A.P. and Pepys M.B. (2008) Transgenic human CRP is not pro-atherogenic, pro-atherothrombotic or pro-inflammatory in apoE-/- mice. *Atherosclerosis* **196,** 248-255.

381. Thomas K.W., Monick M.M., Staber J.M., Yarovinsky T., Carter A.B. and Hunninghake G.W. (2002) Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* **277,** 492-501.

382. Thompson D., Pepys M.B. and Wood S.P. (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* **7,** 169-177.

383. Tillet W.S. and Francis T. (1930) Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J.Exp.Med.* **52,** 561-571.

384. Tommasi S., Carluccio E., Bentivoglio M., Buccolieri M., Mariotti M., Politano M. and Corea L. (1999) C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* **83,** 1595-1599.

385. Toniatti C., Arcone R., Majello B., Ganter U., Arpaia G. and Ciliberto G. (1990) Regulation of the human C-reactive protein gene, a major marker of inflammation and cancer. *Mol.Biol.Med.* **7,** 199-212.

386. Tontonoz P. and Mangelsdorf D.J. (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol.Endocrinol.* **17,** 985-993.

387. Torzewski J., Torzewski M., Bowyer D.E., Frohlich M., Koenig W., Waltenberger J., Fitzsimmons C. and Hombach V. (1998) C-reactive protein frequently colocalizes

with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18,** 1386-1392.

388. Torzewski M., Klouche M., Hock J., Messner M., Dorweiler B., Torzewski J., Gabbert H.E. and Bhakdi S. (1998) Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18,** 369-378.

389. Torzewski M., Rist C., Mortensen R.F., Zwaka T.P., Bienek M., Waltenberger J., Koenig W., Schmitz G., Hombach V. and Torzewski J. (2000) C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20,** 2094-2099.

390. Trion A., de Maat M.P., Jukema J.W., van der L.A., Maas M.C., Offerman E.H., Havekes L.M., Szalai A.J., Princen H.M. and Emeis J.J. (2005) No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E*3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25,** 1635-1640.

391. Trombetta E.S., Ebersold M., Garrett W., Pypaert M. and Mellman I. (2003) Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* **299,** 1400-1403.

392. Tuomisto K., Jousilahti P., Sundvall J., Pajunen P. and Salomaa V. (2006) C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb.Haemost.* **95,** 511-518.

393. Tuomisto T.T., Korkeela A., Rutanen J., Viita H., Brasen J.H., Riekkinen M.S., Rissanen T.T., Karkola K., Kiraly Z., Kolble K. and Yla-Herttuala S. (2003) Gene expression in macrophage-rich inflammatory cell infiltrates in human atherosclerotic lesions as studied by laser microdissection and DNA array: overexpression of HMG-CoA reductase, colony stimulating factor receptors, CD11A/CD18 integrins, and interleukin receptors. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23,** 2235-2240.

394. Uguccioni M., D'Apuzzo M., Loetscher M., Dewald B. and Baggiolini M. (1995) Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur.J.Immunol.* **25,** 64-68.

395. Unkelbach K., Gardemann A., Kostrzewa M., Philipp M., Tillmanns H. and Haberbosch W. (1999) A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19,** 932-938.

396. van der Wal A.C., Becker A.E., van der Loos C.M. and Das P.K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* **89,** 36-44.

397. van der Wal A.C., Das P.K., Bentz v.d.B., van der Loos C.M. and Becker A.E. (1989) Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* **61,** 166-170.

398. Van Eck M., Bos I.S., Kaminski W.E., Orso E., Rothe G., Twisk J., Bottcher A., Van Amersfoort E.S., Christiansen-Weber T.A., Fung-Leung W.P., Van Berkel T.J. and Schmitz G. (2002) Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99,** 6298-6303.

399. van Furth R. and Cohn Z.A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J.Exp.Med.* **128,** 415-435.

400. Van Snick J. (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.* **8,** 253-278.

401. Venkateswaran A., Laffitte B.A., Joseph S.B., Mak P.A., Wilpitz D.C., Edwards P.A. and Tontonoz P. (2000) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97,** 12097-12102.

402. Venugopal S.K., Devaraj S. and Jialal I. (2005) Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am.J.Pathol.* **166,** 1265-1271.

403. Venugopal S.K., Devaraj S., Yuhanna I., Shaul P. and Jialal I. (2002) Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* **106,** 1439-1441.

404. Verma S., Kuliszewski M.A., Li S.H., Szmitko P.E., Zucco L., Wang C.H., Badiwala M.V., Mickle D.A., Weisel R.D., Fedak P.W., Stewart D.J. and Kutryk M.J. (2004) C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* **109,** 2058-2067.

405. Verma S., Li S.H., Badiwala M.V., Weisel R.D., Fedak P.W., Li R.K., Dhillon B. and Mickle D.A. (2002) Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* **105,** 1890-1896.

406. Verma S., Wang C.H., Li S.H., Dumont A.S., Fedak P.W., Badiwala M.V., Dhillon B., Weisel R.D., Li R.K., Mickle D.A. and Stewart D.J. (2002) A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* **106,** 913-919.

407. Vigushin D.M., Pepys M.B. and Hawkins P.N. (1993) Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J.Clin.Invest* **91,** 1351-1357.

408. Virmani R., Kolodgie F.D., Burke A.P., Farb A. and Schwartz S.M. (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20,** 1262-1275.

409. Vlaicu R., Rus H.G., Niculescu F. and Cristea A. (1985) Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima. *Atherosclerosis* **55,** 35-50.

410. Volanakis J.E. (1982a) Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **389,** 235-250.

411. Volanakis J.E. (1982b) Complement-induced solubilization of C-reactive protein-pneumococcal C-polysaccharide precipitates: evidence for covalent binding of complement proteins to C-reactive protein and to pneumococcal C-polysaccharide. *J.Immunol.* **128,** 2745-2750.

412. Volanakis J.E. and Kaplan M.H. (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **136,** 612-614.

413. Waehre T., Yndestad A., Smith C., Haug T., Tunheim S.H., Gullestad L., Froland S.S., Semb A.G., Aukrust P. and Damas J.K. (2004) Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* **109,** 1966-1972.

414. Wang C.H., Li S.H., Weisel R.D., Fedak P.W., Dumont A.S., Szmitko P., Li R.K., Mickle D.A. and Verma S. (2003) C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* **107,** 1783-1790.

415. Wang N., Tabas I., Winchester R., Ravalli S., Rabbani L.E. and Tall A. (1996) Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J.Biol.Chem.* **271,** 8837-8842.

416. Warabi E., Wada Y., Kajiwara H., Kobayashi M., Koshiba N., Hisada T., Shibata M., Ando J., Tsuchiya M., Kodama T. and Noguchi N. (2004) Effect on endothelial cell gene expression of shear stress, oxygen concentration, and low-density lipoprotein as studied by a novel flow cell culture system. *Free Radic.Biol.Med.* **37,** 682-694.

417. Watanabe T. and Fan J. (1998) Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int.J.Cardiol.* **66 Suppl 1,** S45-S53.

418. Watanabe Y., Jiang S., Takabe W., Ohashi R., Tanaka T., Uchiyama Y., Katsumi K., Iwanari H., Noguchi N., Naito M., Hamakubo T. and Kodama T. (2005) Expression of the LXRalpha protein in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25,** 622-627.

419. Waxman S., Ishibashi F. and Muller J.E. (2006) Detection and treatment of vulnerable plaques and vulnerable patients: novel approaches to prevention of coronary events. *Circulation* **114,** 2390-2411.

420. Weinhold B. and Ruther U. (1997) Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the human C-reactive protein gene. *Biochem.J.* **327 (Pt 2),** 425-429.

421. Weiser J.N., Shchepetov M. and Chong S.T. (1997) Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of Haemophilus influenzae. *Infect.Immun.* **65,** 943-950.

422. Weyrich A.S., Elstad M.R., McEver R.P., McIntyre T.M., Moore K.L., Morrissey J.H., Prescott S.M. and Zimmerman G.A. (1996) Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J.Clin.Invest* **97,** 1525-1534.

423. Weyrich A.S., Lindemann S. and Zimmerman G.A. (2003) The evolving role of platelets in inflammation. *J.Thromb.Haemost.* **1,** 1897-1905.

424. Weyrich A.S., McIntyre T.M., McEver R.P., Prescott S.M. and Zimmerman G.A. (1995) Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J.Clin.Invest* **95,** 2297-2303.

425. Weyrich A.S. and Zimmerman G.A. (2004) Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* **25,** 489-495.

426. Whitelaw D.M. (1972) Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet.* **5,** 311-317.

427. Wick G., Romen M., Amberger A., Metzler B., Mayr M., Falkensammer G. and Xu Q. (1997) Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J.* **11,** 1199-1207.

428. Willerson J.T. and Ridker P.M. (2004) Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* **109,** II2-10.

429. Williams D.L., Li C., Ha T., Ozment-Skelton T., Kalbfleisch J.H., Preiszner J., Brooks L., Breuel K. and Schweitzer J.B. (2004) Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J.Immunol.* **172,** 449-456.

430. Williams K.J. and Rodrigueza W.V. (1998) Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr.Opin.Lipidol.* **9,** 511-513.

431. Williams T.N., Zhang C.X., Game B.A., He L. and Huang Y. (2004) C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24,** 61-66.

432. Willy P.J., Umesono K., Ong E.S., Evans R.M., Heyman R.A. and Mangelsdorf D.J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* **9,** 1033-1045.

433. Witztum J.L. and Berliner J.A. (1998) Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* **9,** 441-448.

434. Woo P., Korenberg J.R. and Whitehead A.S. (1985) Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. *J.Biol.Chem.* **260,** 13384-13388.

435. Woollard K.J., Phillips D.C. and Griffiths H.R. (2002) Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells. *Clin.Exp.Immunol.* **130,** 256-262.

436. World Health Organization 2006 (2007) World health statistics 2006. *WHO Library Cataloguing* 1-80.

437. Wu Y., Ji S.R., Wang H.W. and Sui S.F. (2002) Study of the spontaneous dissociation of rabbit C-reactive protein. *Biochemistry (Mosc.)* **67,** 1377-1382.

438. Xia D. and Samols D. (1997) Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94,** 2575-2580.

439. Xie L., Chang L., Guan Y. and Wang X. (2005) C-reactive protein augments interleukin-8 secretion in human peripheral blood monocytes. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **46,** 690-696.

440. Yao B., Rakhade S.N., Li Q., Ahmed S., Krauss R., Draghici S. and Loeb J.A. (2004) Accuracy of cDNA microarray methods to detect small gene expression changes induced by neuregulin on breast epithelial cells. *BMC.Bioinformatics.* **5,** 99.

441. Yasojima K., Schwab C., McGeer E.G. and McGeer P.L. (2001) Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am.J.Pathol.* **158,** 1039-1051.

442. Yasuda O., Fukuo K. and Ogihara T. (2001) [Roles of growth factors and cytokines in atherosclerosis]. *Nippon Rinsho* **59 Suppl 2,** 586-590.

443. Yudkin J.S., Stehouwer C.D., Emeis J.J. and Coppack S.W. (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19,** 972-978.

444. Yue C.C., Muller-Greven J., Dailey P., Lozanski G., Anderson V. and Macintyre S. (1996) Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* **271,** 22245-22250.

445. Yuen T., Wurmbach E., Pfeffer R.L., Ebersole B.J. and Sealfon S.C. (2002) Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* **30,** e48.

446. Zadelaar A.S., der Thusen J.H., Boesten L.S., Hoeben R.C., Kockx M.M., Versnel M.A., Van Berkel T.J., Havekes L.M., Biessen E.A. and van Vlijmen B.J. (2005) Increased vulnerability of pre-existing atherosclerosis in ApoE-deficient mice following adenovirus-mediated Fas ligand gene transfer. *Atherosclerosis* **183,** 244-250.

447. Zammit D.J., Cauley L.S., Pham Q.M. and Lefrancois L. (2005) Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity.* **22,** 561-570.

448. Zee R.Y. and Ridker P.M. (2002) Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* **162,** 217-219.

449. Zeller J.M., Landay A.L., Lint T.F. and Gewurz H. (1986) Enhancement of human peripheral blood monocyte respiratory burst activity by aggregated C-reactive protein. *J.Leukoc.Biol.* **40,** 769-783.

450. Zen Q., Zhong W. and Mortensen R.F. (1997) Binding site on human C-reactive protein (CRP) recognized by the leukocyte CRP-receptor. *J.Cell Biochem.* **64,** 140-151.

451. Zhang D., Sun M., Samols D. and Kushner I. (1996) STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J.Biol.Chem.* **271,** 9503-9509.

452. Zhang S.H., Reddick R.L., Piedrahita J.A. and Maeda N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258,** 468-471.

453. Zhang W.J., Wei H., Hagen T. and Frei B. (2007) Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104,** 4077-4082.

454. Zhong W., Zen Q., Tebo J., Schlottmann K., Coggeshall M. and Mortensen R.F. (1998) Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *J.Immunol.* **161,** 2533-2540.

455. Zhou P., Thomassen M.J., Pettay J., Deodhar S.D. and Barna B.P. (1995) Human monocytes produce monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in response to a synthetic peptide derived from C-reactive protein. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **74,** 84-88.

456. Zhou X., Stemme S. and Hansson G.K. (1996) Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am.J.Pathol.* **149,** 359-366.

457. Ziegler-Heitbrock H.W. (2000) Definition of human blood monocytes. *J.Leukoc.Biol.* **67,** 603-606.

458. Zouki C., Beauchamp M., Baron C. and Filep J.G. (1997) Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J.Clin.Invest* **100,** 522-529.

459. Zwaka T.P., Hombach V. and Torzewski J. (2001) C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* **103,** 1194-1197.

PUBLICATIONS

© 2008 Schattauer GmbH, Stuttgart

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

Didier Hanriot[1,2*], Gaëlle Bello[1,2*], Armelle Ropars[1,2], Carole Seguin-Devaux[5], Gaël Poitevin[1,2], Sandrine Grosjean[3], Véronique Latger-Cannard[2,3,4], Yvan Devaux[1,2,5], Faiez Zannad[1,2], Véronique Regnault[2,4], Patrick Lacolley[1,2], Paul-Michel Mertes[1,2], Ketsia Hess[*1,2], Dan Longrois[*1,2]

[1]INSERM, U684, Nancy, France; [2]Henri Poincaré University, Nancy, France; [3]CHU Nancy, Nancy, France; [4]INSERM, U734, Nancy, France; [5]CRP-Sante, Luxembourg Hospital, Luxembourg

Summary

Non-specific markers of inflammation such as C-reactive protein (CRP) are associated statistically with an increased risk of atherosclerosis through mechanisms that have not yet been fully elucidated. We investigated the effects of CRP on several aspects of human monocyte biology, a cell type involved in the initiation and progression of atherosclerosis. Blood monocytes isolated from healthy men and premenopausal women (n=9/group) were exposed to purified CRP (25 µg/ml) for 12 hours. Changes in gene expression were analyzed using a custom-made array containing oligonucleotide sequences of 250 genes expressed by activated monocytes and confirmed by quantitative PCR. CRP increased significantly the expression of the cytokines interleukin (IL)-1α, IL-1β and IL-6, and the chemokines GRO-α, GRO-β and IL-8. CRP also displayed anti-inflammatory effects through up-regulation of liver X receptor (LXR) α and activin receptor expression, and down-regulation of alpha 2-macroglobulin expression. Increased LXRα mRNA expression in both monocytes and the monocytic cell line THP-1 was associated with increased LXRα protein expression and nuclear translocation, as well as increased ABCA1 mRNA expression, a target gene of LXRα. Western Blot analysis revealed CRP-induced nuclear translocation of NF-κB and activation of p42/44, MAP and Akt kinases. CRP-induced LXRα mRNA expression was inhibited by anti-CD64 (FcγRI) antibodies and by p42/44 and PI3 kinase inhibitors. This hypothesis-generating study demonstrates that CRP modulates the expression of genes that contribute to both pro- and anti-inflammatory responses in human monocytes. Among these novel anti-inflammatory effects, we show clearly that CRP activates the LXRα pathway.

Keywords

Atherosclerosis, inflammation, C-reactive protein, liver X receptors, microarrays

Thromb Haemost 2008; 99: 558–569

Introduction

Atherosclerosis and its complications are responsible for a large number of deaths in developed countries (1). Atherosclerosis is characterized by interrelated processes, such as endothelial dysfunction, lipid disturbances, oxidative stress, platelet activation, thrombosis, vascular smooth cell activation and altered arterial wall extracellular matrix metabolism (1). It has been suggested that the risk factors of atherosclerosis such as atherogenic lipoproteins, cigarette smoking, diabetes, arterial hypertension and others, trigger yet poorly characterized lesions which are sensed by the organism as danger signals (2) and which induce activation of innate and adaptive immune responses (3). This activation includes the recruitment of circulating monocytes and lymphocytes into the vascular wall (1, 4). All these observations help to explain why atherosclerosis is perceived as a chronic inflammatory disease.

The inflammatory hypothesis of atherosclerosis has triggered interest in characterizing markers of the inflammatory process that can, when analyzed alone (5) or as "multimarkers" (6),

Correspondence to:
Prof. Dan Longrois
Unité mixte UHP-INSERM U684 "Rigidité, fibrose et risque cardiovasculaire"
9, avenue de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France
Tel.: +33 383683622, Fax: +33 383683639
E-mail : d.longrois@chu-nancy.fr

*These authors contributed equally to this work.

Financial support:
This work was supported financially by the Association de Recherche et d'Information Scientifique en Cardiologie (ARISC) and INSERM U689 by the Association des Infirmiers et Médecins Anesthésistes Réanimateurs (AIMAR).

Received June 14, 2007
Accepted after major revision January 23, 2008

Prepublished online February 14, 2008
doi:10.1160/TH07-06-0410

identify patients at high risk to develop atherosclerosis and its acute complications, and this independently of classical risk factors. C-reactive protein (CRP), was selected in 2003 by an Expert Panel as a clinically relevant (7) biomarker that predicts independently the occurrence of atherosclerosis and its complications. Higher than normal (above 3 mg/l) concentrations of serum CRP detected by high sensitivity assays (hsCRP) are correlated with the development of atherosclerosis in apparently healthy individuals and also predict acute complications (5). The predictive value of hsCRP is valid for most of the clinical manifestations of atherosclerosis such as coronary artery disease, sudden death, stroke, progression of carotid atherosclerosis, peripheral vascular disease and heart failure. In addition, the inflammatory hypothesis of atherosclerosis could explain also the increased risk of atherosclerosis in patients with chronic inflammatory conditions such as systemic lupus erythematosus (8), rheumatoid arthritis (9) or chronic renal failure (10).

Although the statistical association between increased plasma concentration of hsCRP and atherosclerosis is now widely accepted, many questions concerning a possible causal role of CRP in atherosclerosis remain unanswered. There are several reports on the effects of CRP on the biology of the arterial wall, most of them reporting pro-atherogenic and pro-inflammatory effects of CRP on endothelial cells, vascular smooth muscle cells (11, 12) and monocytes (13), circulating cells that contribute to the initiation and progression of atherosclerotic lesions (14).

In an attempt to understand the molecular mechanisms that could explain a causal role of CRP in the pathophysiology of atherosclerosis, we investigated the effects of CRP on human monocytes in a hypothesis-generating strategy, using a custom-made oligonucleotide array containing sequences of genes that are reported to be expressed by activated monocytes. We show here that CRP modulates the expression of genes known to contribute to both pro- and anti-inflammatory responses and bring evidence for yet unidentified pathways activated by CRP in human monocytes.

Materials and methods

The investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Cell culture

Blood samples were withdrawn from non-fasted healthy men (ages 25–35 years) and women volunteers (25–35 years, random point of the estrous cycle). Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by positive selection using CD14 microbeads and MACS separation columns (Miltenyi Biotech, Paris, France) according to the manufacturer's protocol. Monocyte purity determined by FACS analysis was typically above 90% (data not shown).

Monocytes (1.5 x 10^6 cells/ml) were incubated in serum-free medium, nominally lipopolysacchardide (LPS)-free, (Invitrogen Corporation, Baisley, United Kingdom) supplemented with 1% (vol/vol) AB serum (BioValley, Marne la Vallée, France) for 20 hours (h) before addition of CRP and secondly for 0, 2, 6, 12 or 24 h with (CRP group) or without (control group) purified human plasma CRP (designated below as pCRP), in 0.02 M Tris, 0.25 M sodium chloride pH 8.0 (25 µg/ml; Sigma cat n° C-4063, St. Louis, MO, USA).

The human monocytic leukemia cell line THP-1 was incubated at 37°C RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM/L L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 10 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino-acids (Invitrogen Corporation). THP-1 cells were exposed to either pCRP (2.5 or 25 µg/ml) or recombinant human CRP (designated below as rCRP) (2.5 µg/ml, Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France) and incubated for 8, 12 or 24 h.

To establish a control for LXRα mRNA and protein expression, THP-1 cells were differentiated into THP-1-derived macrophages by 160 nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) for 48 h. To determine the specific induction of LXRα expression by CRP, THP-1 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) and LXRα mRNA expression was measured 1 h 30 minutes (min), 3 h, 6 h, 12 h and 24 h after LPS administration. To investigate the role of MAP and PI3 kinases in LXRα transcription induction by CRP, specific inhibitors of p42/44 MAP kinase (PD98059), p38 MAPK (SB203580) and PI3 kinase (Ly294002) all from Calbiochem, were used at 10 µM with THP-1 cells. For these experiments, inhibitors were added 30 min before adding pCRP or rCRP and LXRα mRNA expression was measured 12 h later.

Control experiments for potential contaminants

In order to investigate a potential confounding effect of contaminating LPS present in the commercial CRP preparations used, cells were pre-incubated with 50 µg/ml of polymyxin B (Sigma) 30 min before the addition of CRP. This concentration of polymyxin B was chosen because in preliminary experiments, it was able to abolish the pro-inflammatory effects of LPS at concentrations up to 100 ng/ml. In addition, as both types of commercial CRP preparations (pCRP and rCRP) contained sodium azide, we purified *de novo* CRP preparations with Bio Spin columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Monocytes and THP-1 cells were also incubated with sodium azide (Sigma) at concentrations of 0.05% or 0.1% (wt/vol) corresponding respectively to the concentrations present in the commercial rCRP and pCRP preparations. Endotoxin levels in the preparations were detected and measured with the Limulus Amebocyte Lysate assay (E-Toxate kit; Sigma). CRP samples were diluted (1:10) in pyrogen-free water, and then tested according to the instruction of the Limulus Amebocyte Lysate kit (limit of sensitivity: 0.05 to 0.1 endotoxin units). The final concentrations of LPS were < 0.5 pg/ml of culture medium containing pCRP at a final concentration of 25 µg/ml and LPS concentration of the pCRP preparation was < 0.02 pg of LPS/µg of pCRP.

Microarrays

Total RNA was isolated using Trizol® reagent (Invitrogen Corporation) and treated with RNAse-free DNAse I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). This aRNA amplification procedure is preferred over other methods of nucleic acid amplification for global gene expression studies because it does not distort significantly the relative abundance of individual mRNA sequences within a RNA population (15). Amplification

Table 1: Primer pairs used for real-time quantitative PCR.

Primer, accession number of target gene	Sequence (5'-3')	PCR efficiency
HS RPS29, NM 001032	f: AAGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG	1.83
	r: AGACACGACAAGTCGGAGAA	
HS Alpha 2 macroglobuline, NM 000014	f: TTCAGGAGCTCTGGGTCACT	1.92
	r: CTGTCTTCCAGGCTGACTCC	
HS IL-1alpha, NM 000575	f: TGCCTGAGATACCCAAAACC	1.89
	r: GATGGGCAACTGATGTGAAA	
HS IL-1beta, NM 000576	f: GTCAGCTCTCTCCTTTCA	1.77
	r: AATGTGGCCGTGGTTTCT	
HS IL-6, NM 000600	f: CCACACAGACAGCCACTCAC	1.84
	r: AGGTTGTTTTCTGCCAGTGC	
HS TNF alpha, NM 000594	f: AGGCGGTGCTTGTTCCTCA	1.89
	r: GTTCGAGAAGATGATCTGACTGCC	
HS Gro beta, NM 002089	f: CCCAAACCGAAGTCATAG	1.9
	r: CAGGAACAGCCACCAATAAG	
HS IL-8, NM 000584	f: CTCCCAGTCTTGTCATTG	1.86
	r: CTGTGGAGTTTTGGCTGTTTT	
HS MIP-1 alpha, NM 002983	f: TGCTCAGAATCATGCAGGTC	1.86
	r: GGGAGGTGTAGCTGAAGCAG	
HS MIP-1 beta, NM 002984	f: AGCAAGCAAGTCTGTGCTGA	1.81
	r: CAGGTGACCTTCCCTGAAGA	
HS Adrenomedullin, NM 001124	f: ACTTCGGAGTTTTGCCATTG	2.06
	r: AGCGAACCCAGGTACATCAG	
HS PAI-2, NM 002575	r: CAGACAGCAACTCAGAGAA	2.03
	f: TGCCACACAAAGATCCTCCA	
HS LXR alpha, NM 005693	f: CCGCCTGAAGAAACTGAA	1.93
	r: CGAAGCCGGTCAGAAAAG	
HS LXR beta, NM 007121	f: CGCTACAACCACGAGACAGA	1.92
	r: GTGGAAGTCGTCCTTGCTGT	
HS ABCA1, NM005502	f: CAACAGTTTGTGGCCCTTTT	1.87
	r: GACAAACACAGCTGGCAAGA	

of mRNA to aRNA was performed on 3 µg of total RNA using the Amino Allyl MessageAmp™ aRNA kit (Ambion, Cambridgeshire, UK) according to the manufacturer's protocol. Twenty µg of each amino allyl aRNA were labelled with Cy3 or Cy5 (Amersham Pharmacia, Orsay, France) and purified with the High Pure RNA Tissue Kit (Roche Molecular Biochemicals). Ten µg of each amino allyl aRNA labeled Cy3 or Cy5 (Control and pCRP groups, respectively) were combined and fragmented at 94°C for 15 min, purified with filter concentrators (Microcon YM-10, Millipore, Molsheim, France) and hybridized on a custom-made 250 oligonucleotide microarray (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) inside a moisturized hybridization chamber (MWG Biotech AG) submersed in a water bath at 42°C for 48 h.

After washing, slides were scanned with the Affymetrix 428 Array Scanner (Affymetrix, Bedford, MA, USA) and signal intensities analyzed with the ImaGene® software (BioDiscovery, El Segundo, CA, USA). A prenormalization procedure on the raw microarray data scanned with a range of different amplification settings (gains) was performed with the MAVI® software (MAVI 2.6, MWG Biotech AG). Only genes with prenormalized intensities of 1.5-fold or higher above the background and detected in duplicate on a microarray were studied. The intensity for a specific amplification was then calculated by linear regression of the log signals. An algorithm operated by MAVI first makes the ratio distribution symmetric by taking the natural logarithm of the ratios. Subsequently, the mean is calculated and the exponent of the resulting value is taken as the normalization parameter. Because we worked with a custom-made oligonucleotide microarray, we did not normalize over the entire chips but restricted our calculation to any subgroup of spots. Expression ratios for a specific gene on one array were normalized by the average gene expression ratio of three housekeeping genes (GAPDH X01677; Tubulin NM_004389 and Beta actin NM_014183). Subsequently, gene expression ratios from each sample were calculated by using the average normalized ratio from each of the oligonucleotide microarrays (2, 4 or 8 values / experiment) for a specific RNA sample (pCRP to control values).

Statistical analyses were performed only on genes with detectable hybridization signals in a minimum of 50% of the hybridizations. The results are expressed as mean + SEM. To identify genes consistently up- or down-regulated by pCRP, the data were pooled for men and women and were subjected to a paired t-test (TMEV) both for women and men, with α set at 0.05. Comparisons between female and male groups exposed to pCRP were performed using unpaired t-test. For experiments other that those of microarray, the Kruskall Wallis test was followed by the Wilcoxon-Wilcox test for multiple pairwise comparisons.

Microarrays results are available online at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ under the accession number GPL1897.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)

Primers shown in Table 1 were designed from GenBank cDNA sequences using the PRIMER3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative PCR was performed using the QuantiTect SYBR Green PCR kit

(Qiagen) and LightCycler® technology (Roche Molecular Biochemicals). Relative quantification of target gene expression was performed using a mathematical model (16). PCR efficiencies were calculated using the Relative Quantification Software® from Roche Molecular Biochemicals (Version 1.0). PCR conditions were as follows: activation for 15 min at 95°C, amplification for 10 seconds (s) at 94°C, 15–20 s at 55–61°C and 10–15 s at 72°C (specifically designed for each primer pair), melting point analysis from 64–70°C up to 94°C and cooling for 30 s at 40°C.

Whole cell and nuclear protein extracts and immunoblot analysis

For human monocytes, total proteins were obtained as a dry pellet using Trizol (Invitrogen Corporation) and resuspended with Laemmli sample buffer. For THP-1 cells, total proteins were obtained using a cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals). Nuclear extracts were prepared from $9x10^4$ monocytes or $6x10^4$ THP-1 cells as described previously (17). To establish a positive control for LXRα protein detection, total proteins from rat liver were also prepared. Protein concentrations were determined by DC protein assay (Bio-Rad). Equal amounts of proteins were mixed with Laemmli sample buffer, heated to 100°C for 5 min, resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). Antibodies used were rabbit anti-LXRα, goat anti-NF-κB p65 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-phospho AKT, rabbit anti-AKT, mouse anti-phospho p42/44 MAPK, rabbit anti-p42/44 MAPK, rabbit anti-phospho-p38 MAPK, and mouse anti-p38 MAPK (Cell Signaling Technology). Revelation was performed by chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA). To investigate the proportions of monomeric versus pentameric isoforms of commercial pCRP and rCRP preparations, shown to have opposite (pro- versus anti-inflammatory) effects (18, 19), we performed non-denaturant (12%) polyacrylamide gel electrophoresis using 2–4 µg of commercial pCRP and rCRP in Tris-glycine buffer.

Fcγ receptor (FcγR) blocking

Purified CRP was used in all experiments. Endotoxin was removed from CRP with a detoxigel column (Pierce Biochemicals, Rockford, IL, USA). THP1 cells stimulated with CRP, were coincubated with polymyxin B (10 µg/ml) to insure that CRP-induced effects were distinct from those mediated by LPS. To block the binding of purified rCRP to FcγR type I (FcγRI) (CD64) or FcγR type II (FcγRII) (CD32), THP1 cells were preincubated 30 minutes with 2 µg/ml of monoclonal anti-CD64 (clone 10.1) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) or anti-CD32 (clone IV.3) (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) before adding rCRP and LXRα mRNA expression was measured 12 h later.

Results

Effects of CD14+ positive selection on monocyte activation

The following preliminary experiments were performed because of possible activation of monocytes upon isolation by CD14-positive selection. Immediately after plating, monocytes showed relatively high IL-1α, IL-6 and TNF-α mRNA expression. Twenty hours after plating, mRNA expression for these cytokines decreased significantly and remained subsequently unchanged for up to 48 h (data not shown). These results suggest that upon application of CRP, i.e. 20 h after plating, monocytes had recovered from the isolation procedure and adopted a stable phenotype.

Isoforms of commercially available CRP preparations

Analysed under non denaturant gel electrophoresis experiments, both pCRP and rCRP (Fig. 1A) appeared as pentameric isoforms exclusively with an apparent molecular weight of 120 kDa.

Time-dependent changes of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines after exposure to CRP

We exposed monocytes and THP1 cells to pCRP and rCRP for increasing durations (0, 2, 6, 12, and 24 h) The maximum level of

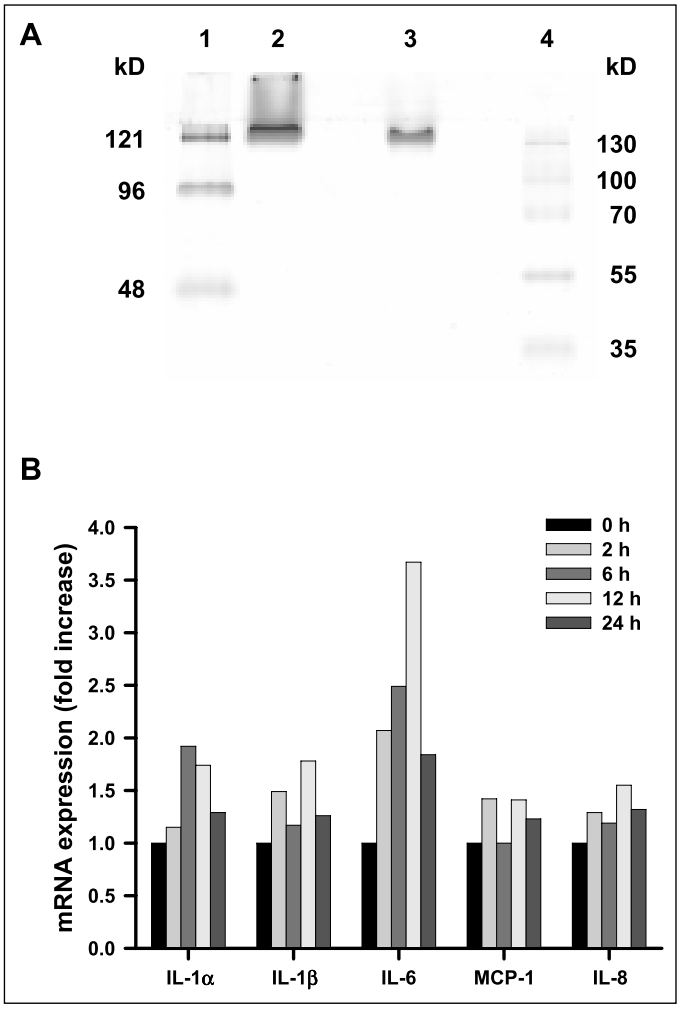


Figure 1: Isoforms of pCRP and cytokine expression. A) Isoforms of pCRP analyzed under non denaturant gel electrophoresis. Only the pentameric isoform of pCRP is detected in commercial pCRP (lane 2) and rCRP (lane 3). Lanes 1 and 4 are molecular weight markers. B) Representative time course experiment that shows that for several cytokines, the maximum level of mRNA expression was at 12 h. Human monocytes exposed to 25 µg of pCRP or vehicle for 0, 2, 6,12 and 24 h. mRNA expression was evaluated by Q-PCR.

Table 2: Genes for which expression increased at least 1.5 fold above control in pCRP-stimulated monocytes from men and women (cDNA array experiments).

Group[a]	GenBank accession	Gene[b]	Abbreviation	Ratio for men	Ratio for women
Chemokine	NM_001511	Gro protein alpha	GRO α	1.55	1.80
	NM_002089	Gro protein beta	GRO β	1.5	1.70
	NM_000584	Interleukin 8	IL-8		1.80
Chemokine receptor	NM_005201	CC motif receptor 8	CCR-8		1.70
	NM_003467	CXC motif receptor 4	CXCR-4	1.65	1.75
Cytokine	NM_000757	Macrophage colony stimulating factor 3	MCSF	1.55	1.50
	NM_000758	Granulocyte macrophage colony stimulating factor 2	GM-CSF		1.50
	NM_005746	Pre-B cell colony-enhancing factor	PBEF		1.55
	NM_000575	Interleukin 1 alpha	IL-1 α		1.80
	NM_000576	Interleukin 1 beta	IL-1 β		1.85
	NM_000600	Interleukin 6	IL-6	1.9	2.30
	NM_013371	Interleukin 19	IL-19	1.6	
Integrin	NM_000210	Integrin alpha 6	ITGA6		1.50
	NM_002211	Integrin beta 1	ITGB1		1.50
Enzyme	NM_000636	Manganese-dependent superoxide dismutate	SOD2 Mn	1.5	
Nuclear receptor	NM_005693	Liver X receptor alpha	LXR α	1.75	1.60
Protease or related factor	NM_002421	Matrix metalloproteinase type 1	MMP-1		1.65
Regulator of tissue invasion	NM_002575	Plasminogen activator inhibitor type 2	PAI-2	1.8	2.50
Signal transduction	NM_004987	Lim and senescent cell antigen-like domains 1	PINCH LIMS1		1.80
	NM_002750	Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	1.65	1.75
TGF-beta superfamily	NM_001105	Activin RIA	ACVR1		1.90

[a]Genes were grouped based on family or function. Many genes can be assigned to more than one group (e.g. transcription factors). [b]Genes were selected for a ratio ≥1.5 and a significant statistic ($p<0.05$).

mRNA expression for several cytokines such as IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 and MCP-1 was observed after 12 h. Therefore this time point was chosen to investigate the effects of CRP on monocyte gene expression (Fig. 1B)

Analysis of the effects of CRP on monocytes gene expression

The effects of pCRP at 25 μg/ml on mRNA expression were analysed separately for healthy men and women. Out of the 250 genes represented on the array, approximately 10% of them had modified expression upon exposure of human monocytes to pCRP.

In monocytes isolated from women, pCRP increased the expression of 19 genes (both pro- and anti-inflammatory), among which IL-6 and plasminogen activator inhibitor (PAI)-2 showed a more than two-fold increase (Table 2). In contrast, pCRP decreased the expression of macrophage inflammatory protein (MIP)1-β and alpha-2 macroglobulin (A2M) (Table 3).

In monocytes isolated from men, pCRP increased the expression of 10 genes (Table 2) and decreased the expression of a further nine (Table 3). Thus, there were more genes up-regulated by pCRP in monocytes isolated from women as compared to men and the level of induction was also greater in women than in men. For instance, PAI-2 mRNA expression was increased by 2.5 fold in women and 1.8 fold in men (Table 2).

Subsequent to the above microarrays raw-data analysis, genes were grouped according to their known functions. This allowed the identification of a subset of genes known to contribute to the pro-inflammatory reaction and whose expression was increased by pCRP. These genes belonged to the families of pro-inflammatory cytokines and chemokines (IL-1, IL-6, IL-8, Gro-α, Gro-β, PBEF), chemokine receptors (CCR-8 and CXCR-4), and integrins (α6 and β1). Also, pCRP up-regulated the expression of genes involved in arterial wall remodeling (matrix metalloproteinase –1 or MMP-1) and fibrinolysis (PAI-2) (Table 2). The effects of pCRP on several genes were confirmed by Q-PCR, for monocytes isolated from both women and men. Purified CRP increased the expression (% increase for women / men) of IL-1α (+42% / +33%), IL-1β (+42% / +39%), IL-6 (+100% / +117%), Gro-β (+85% / +78%), IL-8 (+54% / +47%), and PAI-2 (+74% / +116%) (Fig. 2A).

Purified CRP also modulated the expression of genes that contribute to the anti-inflammatory response. Purified CRP decreased mRNA expression of the chemokines MIP-1α and MIP-1β and the cytokine carrier A2M (Table 3). CRP also increased mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine activin RIA, the oxidation-protective enzyme manganese superoxide dismutase type 2 (SOD2 Mn) and LXRα (Table 2). Changes in mRNA expression analyzed by Q-PCR confirmed, in both

Table 3: Genes for which expression decreased in pCRP-stimulated monocytes from men and women (cDNA array experiments).

Group[a]	GenBank accession	Gene[b]	Abbreviation	Ratio for men	Ratio for women
Chemokine	NM_006273	Chemokine CC motif ligand 7	MCP-3	0.75	
	NM_002984	Small inducible cytokine A4 (SCYA4)	MIP-1 beta	0.75	0.75
Cell cycle regulators	NM_002467	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-myc	0.60	
Inflammation	M36501	Alpha 2 macroglobuline	A2M	0.70	0.70
Protease	NM_002426	Matrix metalloproteinase 12	MMP-12	0.50	
Secreted protein	NM_006682	Fibrinogen-like 2	FGL2	0.75	
Signal transduction	NM_002752	Mitogen-activated protein kinase 9	MAPK-9	0.65	
	NM_002502	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancerin B-cells 2	NFκB2	0.70	
	NM_002053	Guanylate binding protein 1	GBP1	0.65	

[a]Genes were grouped based on family or function. Many genes can be assigned to more than one group (e.g, transcription factors). [b]Genes were selected for a ratio ≥1.5 and a significant statistic ($p<0.05$).

women and men, the decreased expression (% variation for women / men) of MIP-1α (-30% / –46%), MIP-1β (-52% / –77%), A2M (-46% / –65%) and TNF-α (-22% / –35%), and the increased expression of ADM (+29% / +55%) (Fig. 2B). The behavior of TNF-α was different in cDNA and RT-PCR experiments. In women, TNF-α mRNA expression was not changed upon exposure to pCRP. In men, in the absence of CRP, mRNA expression for this cytokine was below the level of detection of the method.

Interactions between CRP and potential contaminants

Concern has been raised that the effects of pCRP could be related to at least three types of contaminants: immunoglobulins (20, 21), LPS (22) and sodium azide (23). The potential effects of contaminating immunoglobulins were investigated by studying if the effects of pCRP could be reproduced by rCRP in monocytes and THP-1 cells. Recombinant CRP had stronger effects on pro-inflammatory cytokine mRNA expression than pCRP in both cell types (data not shown and see additional results below). These results suggested that the effects of pCRP could be reproduced by rCRP and therefore, the effect of commercial pCRP was not due to contaminating immunoglobulins.

When THP-1 cells were incubated with 25 μg/ml rCRP for up to 24 h, the fold increase versus control for IL-1α mRNA expression was 24 in the absence of polymyxin B and 1.56 ($p < 0.01$) upon pre-incubation with polymyxin B. In contrast, polymyxin B had no effect when added to 2.5 μg/ml of rCRP (2.6 in the absence and 2.3 in the presence of polymyxin B).

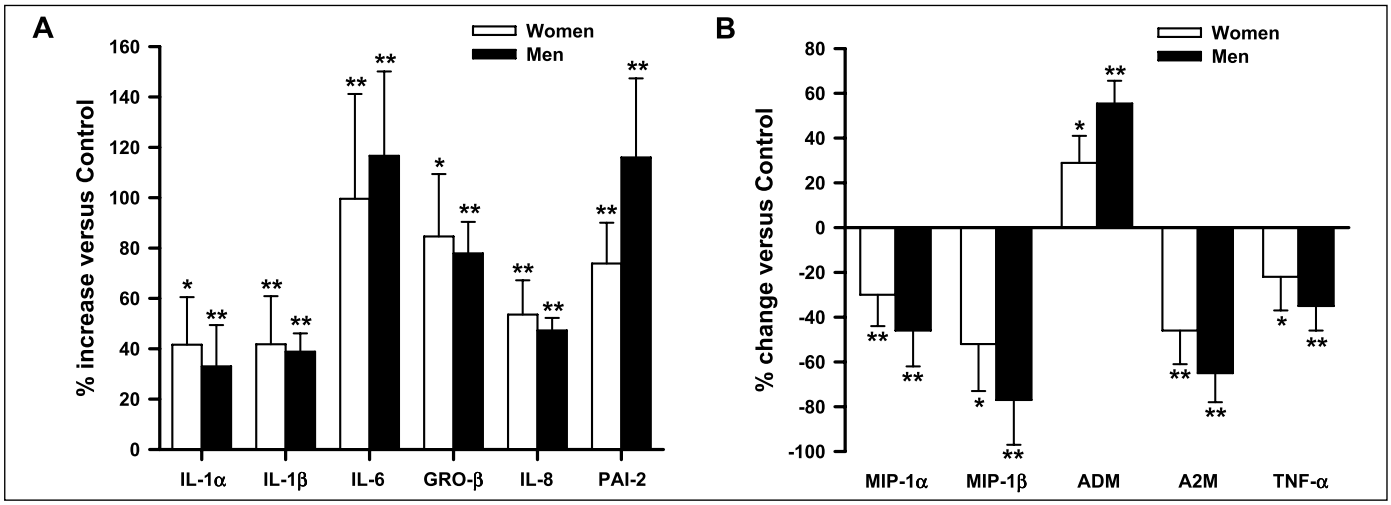


Figure 2: Quantitative PCR evaluation of the effects of pCRP on monocytes isolated from women (n=9) and men (n=9). Monocytes were exposed to 25 μg/ml pCRP or vehicle for 12 h. pCRP modified mRNA expression of pro-atherosclerotic and pro-inflammatory genes (A) as well as anti-atherogenic genes (B). Bar graphs show percentage variation in pCRP-exposed monocytes as compared to control monocytes. Results are mean ± SEM. *P<0.05 and **P<0.01 vs. control monocytes.

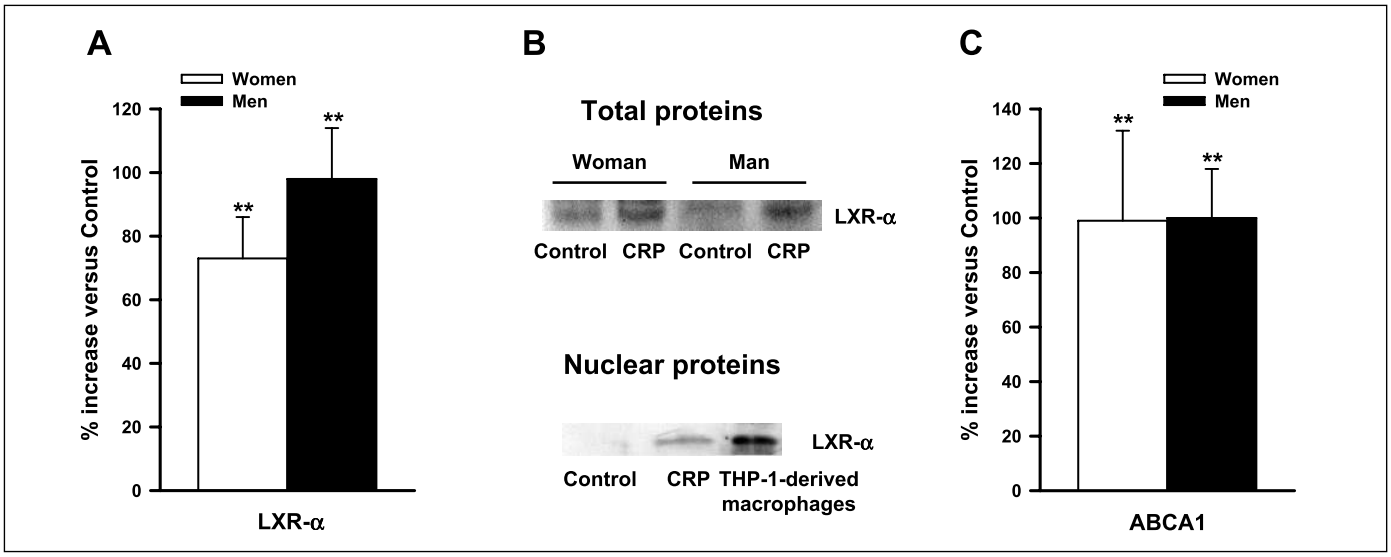


Figure 3: pCRP increases LXRα mRNA and protein expression and ABCA1 mRNA expression in monocytes. A) Monocytes isolated from women (n=9) and men (n=9) were exposed to 25 µg/ml purified CRP or vehicle for 12 h and LXRα mRNA expression was evaluated by Q-PCR. Bar graph shows percentage increase in pCRP-exposed monocytes as compared to control monocytes. Results are mean ± SEM. **P<0.01 vs. control monocytes. B) Western blot analysis of LXRα protein expression on total and nuclear proteins prepared from human monocytes exposed to 25 µg/ml pCRP or vehicle for 24 h. Nuclear extracts from THP-1-derived macrophages were used as a positive control for LXRα expression. Similar results were obtained in four independent experiments. C) ABCA1 mRNA expression was measured by Q-PCR in monocytes isolated from women (n=9) and men (n=9) exposed to 25 µg/ml pCRP or vehicle for 12 h. Bar graph shows percentage increase in pCRP-exposed monocytes as compared to control monocytes. Results are mean ± SEM. **P<0.01 vs. control monocytes.

When THP-1 cells were incubated with 25 µg/ml of pCRP, IL-1α mRNA expression was 4.6 in the absence and 4.9 in the presence of polymyxin B respectively; similar results were obtained for other proinflammatory cytokines (data not shown). Similarly, the pCRP-induced decrease of A2M and the increase of LXRα mRNA expression were not different in the absence or presence of 50 µg/ml polymyxin B (data not shown). These results suggested that there is LPS contamination of rCRP that may significantly affect the cytokine results when high concentrations of rCRP are used. In contrast, the effects of pCRP are not related to contamination.

The potential effect of contaminating sodium azide was investigated in two types of experiments. First, as indicated in *Material and methods*, both pCRP and rCRP were *de novo* purified. When THP-1 cells were treated with the sodium azide-free CRP preparations, similar effects as those of the commercial CRP preparations were observed (results not shown). Second, when THP-1 cells were incubated with 0.05% or 0.1% (w/vol) sodium azide, we observed a transient effect of sodium azide (maximum effect after 1.5 h of incubation) on mRNA expression of several proinflammatory cytokines such as IL-1β and TNF-α. The effect of sodium azide disappeared at later time points (after 3 h of incubation). The experiments demonstrated that the effects of CRP observed after 8 hours of incubation are sodium azide independent.

CRP increases LXRα expression and activates the LXRα signaling pathway

Microarray data revealed that exposure of monocytes to pCRP induced an up-regulation of the expression of LXRα mRNA in both women and in men (Table 2). This observation was validated by Q-PCR; pCRP increased LXRα mRNA expression by 72% in women and 97% in men (Fig. 3A). This effect on mRNA expression was also investigated at the protein level. Effectively, pCRP up-regulated LXRα protein expression in monocyte total cell extracts (Fig. 3B). Cytoplasmic in its latent state, LXRα is a transcription factor that requires nuclear translocation to be activated. To test whether pCRP induced also LXRα activation, nuclear extracts of pCRP-treated monocytes were prepared. The results demonstrated that pCRP triggers LXRα nuclear translocation thus arguing for its activation (Fig. 3B). LXRα regulates the expression of genes involved in cholesterol and fatty acid homeostasis including the gene for ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), especially in macrophages (24). We showed that pCRP increases ABCA1 mRNA expression by 99% in women and 100% in men using Q-PCR indicating activation of LXRα by CRP (Fig. 3C).

In order to confirm the effects of CRP on LXRα expression, the effects of two concentrations of pCRP (2.5 and 25 µg/ml) on THP-1 cells, a monocytic cell line that differentiates into macrophages upon exposure to PMA were investigated. The effects of pCRP on LXRα in THP-1 cells resulted in a dose-dependent increase of LXRα mRNA expression (Fig. 4A). In addition, pCRP increased LXRα protein expression in a time-dependent manner, both in whole cell lysates and nuclear extracts (Fig. 4B). Up-regulation of ABCA1 mRNA expression was found also in THP-1 cells confirming LXRα activation by pCRP in THP-1 cells (Fig. 4C). Interestingly, LPS, a non-specific inflammatory stimulus, did not change LXRα mRNA expression in THP-1 cells (data not shown) suggesting a specific induction of LXRα expression by pCRP. In addition, the regulation of LXRα expression by pCRP is specific to this LXR isoform, since pCRP

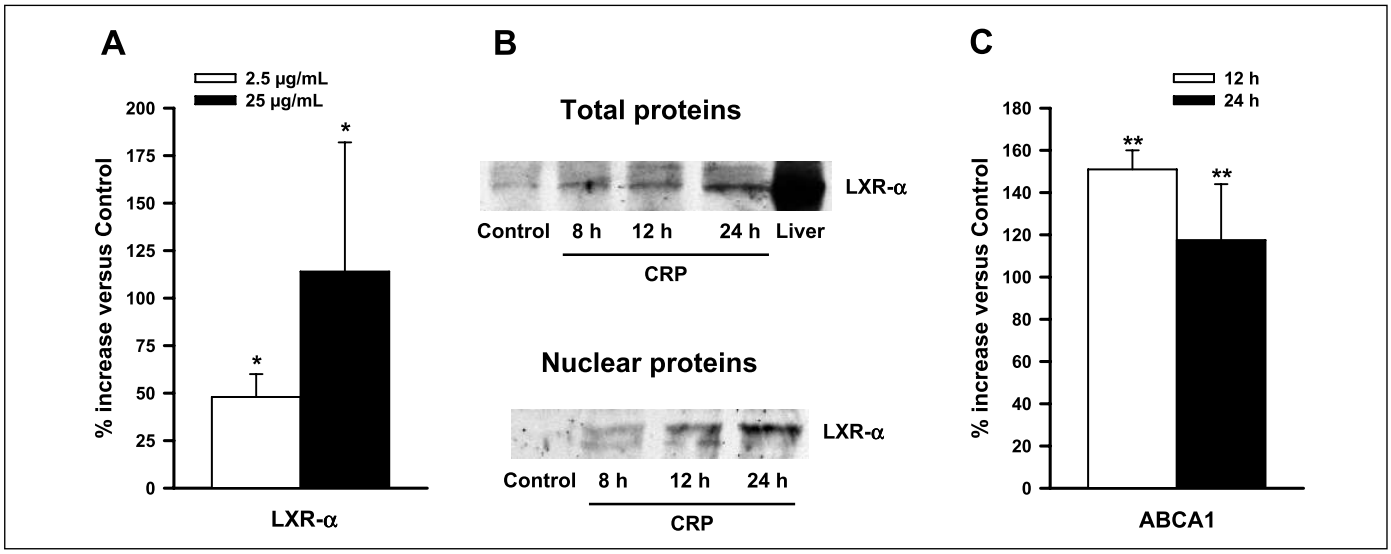


Figure 4: pCRP increases LXRα mRNA and protein expression in THP-1 cells. A) THP-1 cells were exposed to 2.5 or 25 µg/ml pCRP or vehicle for 12 h and LXRα mRNA expression was evaluated by Q-PCR. Bar graph shows the percentage of increase in pCRP-exposed THP-1 cells as compared to control THP-1 cells. Results are mean ± SEM. *P<0.05 vs. control. B) Western blot analysis of LXRα protein expression on total and nuclear proteins prepared from THP-1 cells exposed to 25 µg/ml pCRP for 8, 12 and 24 h or vehicle (control). Total protein extracts from rat liver were used as positive control. Similar results were obtained in four independent experiments. C) ABCA1 mRNA expression was measured by Q-PCR in THP1 cells exposed to 2.5 µg/ml pCRP or vehicle for 12 h and 24 h. Bar graph shows percentage increase in pCRP-exposed THP-1 cells as compared to control THP-1 cells. Results are mean ± SEM. **P<0.01 vs. control.

did not change LXRα mRNA expression in THP-1 cells as well as in monocytes (data not shown). Taken together, these results suggested that exposure of both human blood monocytes and THP-1 cells to pCRP results in increased expression and activation of LXRα.

The transduction signal pathway by which CRP activates LXRα mRNA expression in THP-1 cells was investigated. For this purpose rCRP was used at 2.5 µg/ml on THP-1 cells. Recombinant CRP induced a rapid phosphorylation of the extracellular signal-regulated MAP kinases (p42/44 MAPKs) and AKT (Fig. 5A) but not p38 MAPK (data not shown), indicating the activation of both MAP kinase and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathways by rCRP in THP-1 cells. Specific inhibition of the p42/44 MAPK pathway or the PI3K pathway using respectively PD98059 and Ly294002 prevented rCRP-induced LXRα mRNA upregulation whereas inhibition of the p38 MAPK pathway using SB203580 did not change LXRα expression-stimulated by rCRP (Fig. 5B). These data show that signal transduction through p42/44 MAPK and PI3K is necessary for rCRP-induced LXRα mRNA expression. The final investigation of whether rCRP causes NF-κB activation in THP-1 cells was performed by immunoblot analysis of NF-κB p65 in nuclear extracts of rCRP-treated THP1 cells. The results indicated that NF-κB p65 was rapidly translocated into the nucleus following pCRP treatment (Fig. 5*C*), thus arguing for its activation.

In order to document the specificity of CRP on the LXRα pathway, we performed several additional experiments. We investigated the effects of heat-denatured (boiling for 1 h) pCRP and rCRP before and after *de novo* purification to avoid potential contamination by LPS or sodium azide on LXRα mRNA expression in THP-1 cells. In all cases, heat-denatured CRP had effects that were indistinguishable from the vehicle whereas *de novo* purified (LPS-free and sodium azide-free) pCRP at a concentration of 5 µg/ml resulted in a 60 ± 10 % increase over vehicle of LXRα mRNA expression.

Finally, because most of the effects of CRP have been documented to be mediated through FcγR (25, 26), we investigated the specificity of *de novo* purified rCRP on the LXRα pathway by pre-incubating THP1 cells with anti-FcγRI (CD 64) and type II (CD 32) monoclonal antibodies. As shown in Figure 6, the anti-CD32 antibody attenuated significantly and the anti-CD64 antibody abolished rCRP-induced LXRα mRNA expression. The anti-CD64 antibody alone did not change the expression of LXRα.Taken together these results suggest that the effects of CRP on the LXRα pathway are mediated mainly through FcγRI.

Discussion

The main findings of this study are that (i) CRP modulated the expression of genes known to contribute not only to the pro-inflammatory but also to the anti-inflammatory response; and (ii) CRP increased the expression of LXRα, a gene known to be involved in the anti-inflammatory response and to have atheroprotective effects.

Confirmation of pro-inflammatory effects of CRP on monocyte biology

Several studies have documented the fact that in endothelial cells CRP exerts pro-inflammatory effects that could contribute to the pathophysiology of atherosclerosis (27, 28). Our results showed that CRP increased IL-1α, IL-1β and IL-6 mRNA expression in monocytes thus confirming its pro-inflammatory effects as demonstrated by other groups in a variety of cell types (29, 30). CRP increased also mRNA expression of: (i) IL –8 and MCP-1, two

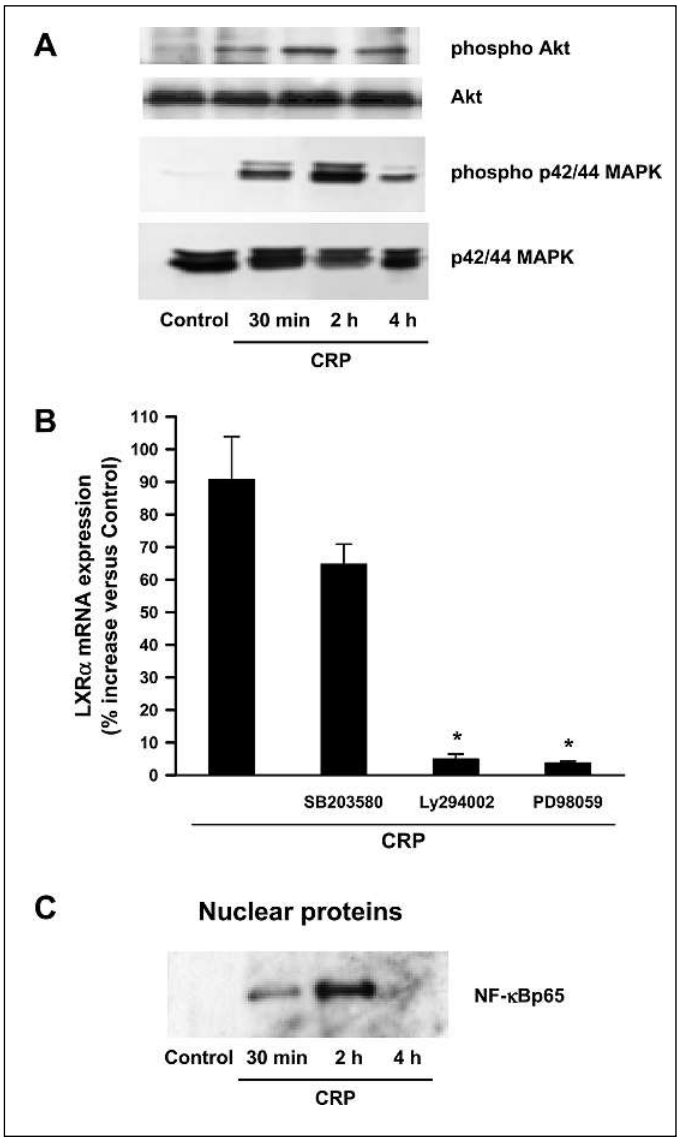


Figure 5: p42/44 and PI3 kinase pathway activations are necessary for CRP-induced LXRα expression and CRP activates NF-κB in THP-1 cells. A) rCRP activates p42/44 MAP Kinase and PI3 kinase pathways in THP-1 cells. Western-blot analysis of phospho-p42/44 MAPK, total p42/44 MAPK, phospho-AKT and total AKT on total protein extracts of THP-1 cells exposed to 2.5 µg/ml rCRP or vehicle for 30 min, 2 h and 4 h. Similar results were obtained in four independent experiments. B) Inhibition of p42/44 MAPK (PD98059) and PI3Kinase (Ly294002) but not p38 MAPK (SB203580) pathways prevented rCRP-induced LXRα mRNA expression. THP-1 cells were exposed to 2.5 µg/ml rCRP or vehicle for 12 h and LXRα mRNA expression was measured using Q-PCR. For all experiments, inhibitors were added at 10 µM 30 min before rCRP administration. C) CRP activates NF-κB in THP-1 cells. Western blot analysis of NF-κB p65 on nuclear proteins prepared from THP-1 cells exposed to 2.5 µg/ml rCRP or vehicle for 30 min, 2 h and 4 h. Similar results were obtained in four independent experiments.

molecules involved in monocyte recruitment (31, 32); (ii) Gro-α that promotes their adhesion on endothelial cells (33); and (iii) CCR-8 and CXCR-4, two receptors involved in monocyte/macrophage chemotaxis. Our results showed that the highest increase of mRNA related to CRP exposure concerned PAI-2. The effects of PAI-2 are described as both pro- and anti-atherogenic; pro-atherogenic through accumulation and deposition of fibrin in the arterial wall, and anti-atherogenic through inhibition of activation of the MMPs responsible for the development of atherosclerosis and the destabilization of plaque (34). Our results suggested that the pro-atherogenic effect of MMP-1 can be balanced by PAI-2, since PAI-2 inhibits the urokinase-type plasminogen activator (u-PA), a protease cleaving plasminogen into plasmin, which in turn activates pro- MMP-1 (35).

Anti-inflammatory effects of CRP on monocyte biology

We showed here that pCRP decreased the expression of chemokines MIP-1α and MIP-1β. In addition to being chemotactic for monocytes and lymphocytes, MIPs play a role in the synthesis of IL-1 (36). Together with another study showing that mice overexpressing human CRP are protected from experimental allergic encephalomyelitis via decreased expression of MIP-1α (37), our results suggest that inhibition of MIPs expression by pCRP could represent a point of control to limit an exaggerated inflammatory response (38).

The strongest mRNA downregulation observed was for A2M. Taylor et al. showed that A2M neutralizes the inhibitory effect exerted by transforming growth factor (TGF)-β on the synthesis of CRP induced by IL-6 (38). TGF-β is an anti-inflammatory cytokine overexpressed in atherosclerosis. CRP could exert anti-inflammatory and anti-atherogenic effects by repressing A2M expression. In addition, we showed that in monocytes isolated from women, pCRP induced overexpression of the activin A receptor, a member of the TGF-β superfamily which also plays an anti-inflammatory role.

Increased adrenomedullin (ADM) expression in macrophages of atherosclerotic lesions of the human aorta could have anti-atherogenic effects via inhibition of the proliferation and migration of smooth muscle cells in the arterial media and inhibition of oxidative stress (39, 40). For this marker, the cDNA array did not detect changes above 1.5 in both men and women which is consistent with the results obtained by RT-PCR in women (29%). The 55% increase in men was not detected by cDNA array but values close to the 1.5-fold threshold may not have been detected. This suggests that pCRP could exert anti-atherogenic effects by increasing ADM expression in human monocytes.

In humans, TNF-α has been identified in the arterial wall at different stages of atherosclerosis (41) and could be involved in the recruitment of inflammatory cells, vascular smooth muscle cell proliferation, and plaque rupture. In transgenic mice overexpressing human CRP, CRP had anti-inflammatory effects through inhibition of TNF-α production (37). Our results extended these observations and suggested that CRP did not change TNF-α mRNA expression in cultured monocytes (when mRNA expression was analyzed by cDNA array experiments) and resulted in a modest decrease when mRNA expression was analyzed by RT-PCR experiments. Whatever the method, the important message is that stimulation with CRP is not associated with increased mRNA expression of TNF-α. Our observation *in vitro* is consistent with a recent experiment *in vivo* in which human volunteers who received an intravenous injection of rec-

ombinant human CRP had a significant increase in plasma concentrations of cytokines such as IL-6 and IL-8 but no change in plasma concentration of TNF-α (42). Taken together these results suggest that through mechanisms that are not yet fully understood, CRP is associated with differential regulation of TNF-α and IL-6 pathways.

Effects of CRP on the expression and activation of LXRα

The LXRs are members of the nuclear receptor superfamily and play an important role in lipid homeostasis and fatty acid metabolism (24). LXRs are activated by oxysterols and other intermediates in the cholesterol biosynthetic pathway and reported to be present in atherosclerotic plaques (43). There are two LXRs, LXRα (restricted to the liver, adipose tissue and macrophages) and LXRβ (expressed ubiquitously) (24) that share considerable sequence homology and appear to respond to the same endogenous ligands although they are differentially regulated (44). LXRα is expressed in macrophages and foam cells within human atherosclerotic plaques (45). We showed that CRP increased LXRα mRNA and protein expression in monocytes isolated from both healthy men and premenopausal women as well as in THP-1 cells. Because of the similarity of the CRP-induced activation of the LXRα pathway in monocytes and in THP-1 cells, we used this cell line to investigate the mechanisms of the CRP-induced LXRα activation.

As shown in the Figure 1, both pCRP and rCRP were detected only in the pentameric isoform. In addition to the question of specific isoforms of CRP that we added, there is convincing evidence that the final biological effect will come from the isoform bound to the cell membrane rather than the isoform added to the culture medium. Therefore, we cannot determine which one of these isoforms actually mediates the effect of CRP whatever the storage conditions.

The effect of CRP was restricted to LXRα and was specific to CRP, since LXRβ was not increased, and LPS stimulation did not increase LXRα mRNA expression. In cultured macrophages, activation of LXRα induces ABCA1 expression (24). We provide further evidence, in both human monocytes and THP-1 cells, that CRP induces LXRα nuclear translocation and ABCA1 expression demonstrating activation of the LXRα signalling pathway by CRP.

We next tested the implication of phosphorylation pathways in the regulation of LXRα expression. We found that CRP induced the phosphorylation of p42/44 MAPK and Akt, but not p38 MAPK. In addition, pharmacological inhibition of p42/44 MAPK and PI3K pathways abolished the up-regulation of LXRα mRNA expression induced by CRP, whereas a p38 MAPK blocker had no significant effect. These results suggest that the increase of LXRα expression by CRP is mediated by activation of both p42/44 MAPK and PI3K pathways. Furthermore, we suggested that the CRP-mediated increase in LXRα mRNA expression was mediated mainly through the FcγRI (CD 64) (see Fig. 6). However, we cannot exclude that the expression of LXRα is dependent on FcγR since there was a partial inhibition in the presence of an anti-CD32 antibody.

The interaction of rCRP with FcγR and activation of p42/44 MAPK and PI3K pathways in our experiments was consistent with the known biology of CRP and its receptors (44). Our results suggest for the first time that CRP-induced activation of the LXRα pathway is mediated by FcγRI, which is usually associated with activation of p42/44 MAPK and PI3K pathways. Of interest, this effect was shown at low concentrations of rCRP (5 μg/ml; see Fig. 6).

Analysis of gene expression alone may represent some limitations of our study in terms of protein and functional consequences. For the first time, we showed that CRP-induced LXRα expression is regulated by MAP kinases. We have assayed in parallel LXRα and NF-κB because these two pathways act generally in opposite ways on inflammatory modulators. For instance, it has been recently demonstrated that NF-κB, but not LXR, mediate IL-1α signalling (46). Our finding showing that both NF-κB and LXRα increased was in agreement with the dual effect of CRP on inflammation. Our results did not exclude crosstalk between NF-κB, LXRα and other transcription factors.

The significance of CRP-induced activation of the LXRα pathway is so far purely speculative. As LXRα is implicated in reverse cholesterol transport (24), this effect of CRP could be atheroprotective. The involvement of LXRs in atheroprotection has been convincingly demonstrated in ApoE$^{-/-}$ mice. Both LXRα and LXRβ inhibit basal and cytokine-inducible expression of MMP-9 (47), which is known to be involved in atherosclerotic plaque instability. Of interest, it was suggested that LXRα is a

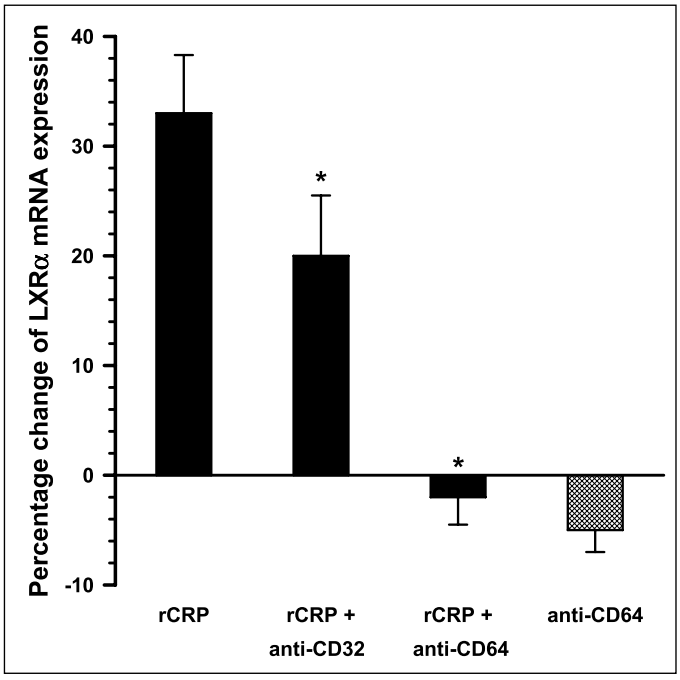


Figure 6: Effects of anti-CD32 (FcγRII) and anti-CD-64 (FcγRI) antibodies on rCRP-mediated increased expression of LXRα mRNA in THP-1 cells. For all the experiments, 2 μg/ml of anti-CD32 or anti-CD64 monoclonal antibodies were added before exposure of THP1 cells to 5 μg/ml of rCRP for 12 h. Results are expressed as mean ± SEM of percentage change of LXRα mRNA expression over vehicle derived from at least three independent experiments. * designates P <0.05 as compared to the absence of antibodies. Cross-hatched column indicated the effect of the anti-CD64 alone.

negative regulator of the macrophage pro-inflammatory response (43). Although atheroprotective effects of CRP have been reported (48) already, our results showing increased LXRα expression provide a new mechanism to explain these effects. We interpret the CRP-induced activation of the LXRα pathway as one of the possible mechanisms through which CRP exerts its anti-inflammatory effects. The anti-inflammatory effects of CRP have been demonstrated *in vivo*: mice were protected from the lethal effects of LPS and protection was mediated by the FcγRI and RIIb receptors through increased secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and decreased secretion of IL-12 (25).

The present findings suggest the possibility that there is a cross-talk between CRP and LXRα pathways that could reciprocally inhibit each other. We have demonstrated that CRP induced the expression of LXRα which is associated with a 100-fold increase in protein level in THP-1 cells. Activation of the LXRα pathway was recently demonstrated to suppress inflammatory genes expression in the liver, including the CRP gene (49). The anti-inflammatory effects of CRP have been documented previously (32, 50–54). Thus, the hypothesis that LXRα has a synergistic action with the anti-inflammatory effect of CRP involving a FcγR-dependent mechanism remains to be tested *in vivo*.

We have used the concentration of 2.5 μg/ml as it is known to be associated with a moderate risk for cardiovascular disease. This was also to demonstrate that this low concentration of CRP produces an increased expression of LXRα. Since it has been suggested that the actual concentration of CRP in atherosclerotic plaques may be much (10 fold) higher than in plasma, we also investigated the effect of CRP at a 25 μg/ml concentration. In order to complete the concentration-dependent effect of CRP, we showed that LXRα mRNA reached an intermediate value in response to 5 μg/ml CRP.

Differential effects of CRP on monocytes isolated from men and women

In an attempt to analyze separately the effects of CRP on monocytes isolated from women and from men, we showed that there were common CRP-induced motifs of gene expression changes and also gender-specific differences. Our results are even more interesting given the fact that no attempt was made to withdraw blood from female subjects at a fixed point of the estrous cycle. The effects of CRP are probably strong enough to attenuate any effects of the estrous cycle. In a recent paper, Sander et al. (55) showed that CRP concentration is associated with progression of carotid intima-media-thickness in women but not in men which is consistent with our findings. This study raises the possibility that exogenous estrogens medication could explain higher CRP levels in females as previously reported in the Framingham offspring study (56).

In summary, upon exposure of human monocytes to CRP, we observed changes in gene expression known to be associated with both the pro- and the anti-inflammatory responses. We speculate that the biological role of CRP in atherosclerosis is more complex than simply pro-inflammatory and pro-atherogenic. Induction of LXRα and activation of the LXR pathway may represent a novel mechanism of the biological action of CRP.

Acknowledgments

We thank Dr. Alain Tedgui, Unité INSERM U689, Université Paris VII, Hôpital Lariboisière Paris, France and Pr. Jean-Luc Balligand Pharmacology Unit, Department of Medicine, FATH/UCL 53.49, University of Louvain Medical School, 53, Avenue E. Mounier, B 1200 Brussels, Belgium for helpful comments and suggestions on the manuscript. We thank Prof. Simon Thornton, Université Henri Poincaré, for editing the manuscript and Dr Huguette Louis INSERM U684 for helpful comments. We thank Claude Meistelman, MD, Head, Department of Anesthesia and Intensive Care, Brabois Hospital, Nancy, France for financial support and helpful comments on the manuscript.

References

1. Faxon DP, Creager MA, Smith SC, Jr., et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. Circulation 2004; 109: 2595–604.
2. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science 2002; 296: 301–305.
3. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nat Med 2002; 8: 1218–1226.
4. Faxon DP, Fuster V, Libby P, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. Circulation 2004; 109: 2617–2625.
5. Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? Circulation 2004; 109: 2818–2825.
6. Wang TJ, Gona P, Larson MG, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. N Engl J Med 2006; 355: 2631–2639.
7. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 2003; 107: 499–511.
8. Asanuma Y, Oeser A, Shintani AK, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2003; 349: 2407–2415.
9. Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE. High sensitivity C-reactive protein as a disease activity marker in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2004; 31: 1095–1097.
10. Lowbeer C, Gutierrez A, Gustafsson SA, et al. Elevated cardiac troponin T in peritoneal dialysis patients is associated with CRP and predicts all-cause mortality and cardiac death. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 2178–2183.
11. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. J Clin Invest 2003; 111: 1805–1812.
12. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, et al. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2094–2099.
13. Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein increases cytokine responses to *Streptococcus pneumoniae* through interactions with Fcγ receptors. J Immunol 2006; 176: 7598–7604.
14. Paffen E, DeMaat MP. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? Cardiovasc Res 2006; 71: 30–39.
15. Baugh LR, Hill AA, Brown EL, et al. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. Nucleic Acids Res 2001; 29: E29.
16. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: e45.
17. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, et al. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca2+ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. J Exp Med 2003; 197: 1689–1699.
18. Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, et al. Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. Circulation 2004; 110: 2713–2720.
19. Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, et al. Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. Circ Res 2005; 97: 690–697.
20. Hundt M, Zielinska-Skowronek M, Schmidt RE. Lack of specific receptors for C-reactive protein on white blood cells. Eur J Immunol 2001; 31: 3475–3483.

21. Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, et al. C-reactive protein binding to FcgammaRIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. J Clin Invest 2000; 105: 369–376.
22. Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW. C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 1225–1230.
23. Liu C, Wang S, Deb A, et al. Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation. Circ Res 2005; 97: 135–143.
24. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. Mol Endocrinol 2003; 17: 985–993.
25. Mold C, Rodriguez W, Rodic-Polic B, et al. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. J Immunol 2002; 169: 7019–7025.
26. Williams TN, Zhang CX, Game BA, et al. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through FcγRII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 61–66.
27. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. Circulation 2003; 108: 1917–1923.
28. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, et al. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. Circulation 2003; 108: 2041–2048.
29. Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. Cytokine 1992; 4: 361–368.
30. Galve-de Rochemonteix B, Wiktorowicz K, Kushner I, et al. C-reactive protein increases production of IL-1α, IL-1β, and TNF-α, and expression of mRNA by human alveolar macrophages. J Leukoc Biol 1993; 53: 439–445.
31. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature 1999; 398: 718–723.
32. Tilg H, Vannier E, Vachino G, et al. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1β synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med 1993; 178: 1629–1636.
33. Hagiwara H, Mitsumata M, Yamane T, et al. Laminar shear stress-induced GRO mRNA and protein expression in endothelial cells. Circulation 1998; 98: 2584–2590.
34. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. Cardiovasc Res 2003; 59: 812–823.
35. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biological Chemistry 1997; 378: 151–160.
36. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13: 455–481.
37. Szalai AJ, Nataf S, Hu XZ, et al. Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. J Immunol 2002; 168: 5792–5797.
38. Taylor AW, Mortensen RF. Effect of α2-macroglobulin on cytokine-mediated human C-reactive protein production. Inflammation 1991; 15: 61–70.
39. Bunton DC, Petrie MC, Hillier C, et al. The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? Pharmacol Ther 2004; 103: 179–201.
40. Temmesfeld-Wollbruck B, Hocke AC, Suttorp N, et al. Adrenomedullin and endothelial barrier function. Thromb Haemost 2007; 98: 944–951.
41. Niemann-Jonsson A, Dimayuga P, Jovinge S, et al. Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor-alpha expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2205–2211.
42. Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Levels JH, et al. Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. Circ Res 2005; 96: 714–716.
43. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med 2003; 9: 213–219.
44. Prufer K, Boudreaux J. Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated. J Cell Biochem 2007; 100: 69–85.
45. Watanabe Y, Jiang S, Takabe W, et al. Expression of the LXRalpha protein in human atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 622–627.
46. Chen M, Li W, Wang N, et al. ROS and NF-kappaB but not LXR mediate IL-1beta signaling for the down-regulation of ATP-binding cassette transporter A1. Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292: C1493–501.
47. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, et al. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. J Biol Chem 2003; 278: 10443–1049.
48. Bhakdi S, Torzewski M, Paprotka K, et al. Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. Circulation 2004; 109: 1870–1876.
49. Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, et al. A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. Circ Res 2006; 99: e88–99.
50. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999; 340: 448–454.
51. Kovacs A, Tornvall P, Nilsson R, et al. Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13768–13773.
52. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. Mol Immunol 2001; 38: 189–197.
53. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 2575–2580.
54. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, et al. Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. J Clin Invest 1997; 100: 522–529.
55. Sander K, Horn CS, Briesenick C, et al. High-sensitivity C-reactive protein is independently associated with early carotid artery progression in women but not in men: the INVADE Study. Stroke 2007; 38: 2881–2886.
56. Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, et al. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. Circulation 2004; 110: 380–385.

© 2008 Schattauer GmbH, Stuttgart

Editorial Focus

Perplexity of monocyte responses to C-reactive protein (CRP)

János G. Filep
Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, University of Montreal, Montral, Quebec, Canada

C-reactive protein (CRP), a member of the pentraxin family, is one of the prototypic plasma biomarkers of inflammation (1, 2). The physiological roles of CRP in the innate immune response have, however, remained elusive as it possesses both pro- and anti-inflammatory actions (1, 2). Inflammation is pivotal in all phases of atherosclerosis from the nascent lesion through progression to the culmination in acute coronary syndromes (3). To date, over two dozen large-scale prospective clinical studies have reported that moderate elevations in base-line CRP levels predict, albeit to varying degrees, future cardiovascular disease and death across all levels of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and of the Framingham Risk Score (4, 5). CRP has been implicated in multiple aspects of atherogenesis and plaque vulnerability; however, whether CRP plays a direct causal role in these events remains controversial (reviewed in [6]).

For example, transgenic expression of human CRP in apolipoprotein E-deficient mice has been reported to accelerate atherogenesis (7, 8), to show no effect (9) or even to slow atherosclerosis development (10). *In vitro*, CRP induces release of pro-inflammatory interleukins IL-1, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor-α NF (11, 12) from human monocytes; promotes monocye adhesion to endothelial cells through upregulation of endothelial adhesion molecules (13, 14) and enhances phagocytosis of oxidized LDL (6). These observations are consistent with the role of monocytes in the initiation and progression of atherosclerosis (3). However, monocytes may have a more complex role in atherogenesis than previously thought. In this issue of *Thrombosis and Haemostasis*, Hanriot et al. (15) show that CRP modulates expression of genes known to mediate both pro- and anti-inflammatory responses. These novel observations raise the intriguing possibility that CRP could activate yet unidentified pathways in human monocytes.

Using a custom-made 250 oligonucleotide microarray for screening CRP regulated genes in monocytes isolated from apparently healthy men and women (aged 25 to 35 years), Hanriot et al. detected changes in approximately 10% of the genes represented on the microarray. The authors confirm previous studies on CRP induction of pro-inflammatory cytokine gene expression with the exception of TNF, which was unaffected by CRP, and show increased mRNA expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), Gro-β, the chemokine receptors CCR-8 and CXCR-4, and plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2). In concert with IL-8, MCP-1 and Gro-β facilitate monocyte recruitment and adhesion to endothelial cells, whereas CCR-8 and CXCR-4 mediate monocyte (and macrophage) chemotaxis. The function of PAI-2 appears to be more complex. PAI-2 promotes fibrin deposition in the arterial wall, thereby contributing to progression of the initial lesion, whereas it may stabilize more advanced plaques by inhibiting activation of matrix metalloproteinases, enzymes overexpressed in human atheromata (3).

While the concept of CRP's anti-inflammatory role is not new (reviewed in [1, 2]), Hanriot et al. also report CRP-induced changes in monocyte gene expression that are consistent with suppression of inflammation. Thus, the authors show that CRP attenuates expression of the monocyte/lymphocyte chemotactic proteins MIP-1α and MIP-1β and α2-macroglobulin, which antagonize the actions of the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor-β. Protection of mice overexpressing human CRP from allergic encephalomyelitis is mediated through reduction of MIP-1 (16). The most striking finding is that CRP increases expression of the nuclear receptor liver X receptor-α (LXR-α) and one of its target genes the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). ABCA1 promotes reverse cholesterol transport from macrophages in atherosclerotic plaques to high density lipoprotein (HDL) and suppresses genes involved in macrophage inflammatory signaling and apoptosis, thereby inhibiting atherosclerosis (17). CRP induction of LXR-α expression and activation is mediated through the high affinity IgG receptor FcγR1 (CD64) and, to lesser a degree, the low affinity IgG receptor FcγRII (CD32), and involves activation of both p42/44 MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways.

A critical issue whether CRP could effectively facilitate reverse cholesterol transport in monocytes (and macrophages) remains to be elucidated. The complexity of LXR-α responses makes it difficult to extrapolate the beneficial or deleterious effects of a target gene in isolation to human pathology when target genes are likely being modulated in concert. For example, an-

Correspondence to:
János G. Filep
Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital
University of Montreal
5415 boulevard de l'Assomption
Montreal, QC, Canada H1T 2M4
Tel.: +1 514 252 3400 ext. 3388, Fax: +1 514 252 3430
E-mail: janos.g.filep@umontreal.ca

Received February 6, 2008
Accepted February 6, 2008

Prepublished online February 14, 2008
doi:10.1160TH08-02-0072

Thromb Haemost 2008; 99: 461–462

other LXR-α target gene, sterol regulatory element binding protein-1c is involved in lipogenesis, leading to enhanced production of triglycerides, which are pro-atherogenic.

How would CRP then induce opposing actions? CRP-induced activation of NF-κB and LXR-α may signal for expression of pro- and anti-inflammatory genes, respectively. The authors provide limited information on the receptor(s) mediating NF-κB activation. CRP's pro-inflammatory actions on monocytes may be mediated through different receptors as reported for human neutrophils (18), an issue not addressed in this study.

Although Hanriot et al. present convincing control experiments to exclude the potentially confounding effects of sodium azide and LPS contamination present in commercial and recombinant CRP preparations, some concerns remain. In particular, it is still not known why recombinant CRP was somewhat more potent than *de novo* purified CRP. CRP affects LXR-α expression at clinically relevant concentrations, in particular at 2.5 μg/ml, which predict moderate risk (4). While vascular endothelial cells and smooth muscle cells may express CRP under certain circumstances (19, 20) it is uncertain whether CRP levels could be 10-times higher in the vessel wall than in the plasma as suggested by some investigators.

Hanriot et al. show similarities as well as striking gender differences in CRP-induced gene expression patterns in monocytes from men and women. In general, the number of genes affected by CRP is higher and the increases in PAI-2 and IL-6 mRNA expression appear to be more pronounced in women than men. These observations are interesting and can likely be attributed to the influence of endogenous estrogens, even though their biological significance is not known at the present time.

The sophisticated analysis presented by Hanriot et al. may reflect the complexity of monocyte responses to CRP. The plethora of changes raises the intriguing possibility that CRP modulation of monocyte gene expression may depend on the lesion type or different regions within a given atherosclerotic lesion, an issue that requires additional studies. Perhaps more global assessment of monocyte gene expression in patients with cardiovascular disease would identify individuals whose monocytes express a predominantly pro- or anti-inflammatory response to CRP. Furthermore, it remains to be investigated whether there is a molecular switch that directs pro-inflammatory versus anti-inflammatory actions of CRP and how this translates into the human pathology. These concerns notwithstanding, the provocative findings of Hanriot et al. highlight the complexity of monocyte gene expression in response to CRP and have potential significance in defining the role of modest plasma CRP elevations in cardiovascular disease.

References

1. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999; 340: 448–454.

2. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. J Biol Chem 2004; 279: 48487–48490.

3. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 2006; 6: 508–519.

4. Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol 2006; 47: C19-C31.

5. Danesh J, Wheeeler JG, Hirschfeld G, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. N Engl J Med 2004; 350: 1387–1397.

6. Scirica BM, Morrow DA, Verma S, et al. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? Circulation 2006; 113: 2128–2151.

7. Paul A, Ko KW, Li L, et al. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 2004; 109: 647–655.

8. Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, et al. Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. Circulation 2005; 112: 1016–1023.

9. Hirschfield GM, Gallimore JR, Kahan MC, et al. Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 8309–8314.

10. Kovacs A, Tornwall P, Nilsson R, et al. Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13768–13773.

11. Ballou CP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes. Cytokine 1992; 4: 361–368.

12. Xie L, Chang L, Guan Y , et al. CRP augments IL-8 secretion in human peripheral blood monocytes. J Cardiovasc Pharmacol 2005; 46: 690–696.

13. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation 2000; 102: 2165–2168.

14. Devaraj S, Davis B, Simon SI, et al. CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fcγ receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291: H1170-H1176.

15. Hanriot D, Bello G, Ropars A, et al. C-reactive protein induces pro- and anti-inflammatory effects, including activation of the liver X receptor α, on human monocytes. Thromb Haemost 2008; 99: 558-569.

16. Szalai AJ, Nataf S, Hu XZ, et al. Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. J Immunol 2002; 168: 5792–5797.

17. Scott J. The liver X receptor and atherosclerosis. N Engl J Med 2007; 357: 2195–2197.

18. Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, et al. Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. Circ Res 2005; 97: 690–697.

19. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. Circulation 2003; 108: 1930–1932.

20. Sun H, Koike T, Ichikawa T, et al. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. Am J Pathol 2005; 167: 1139–1148.

ELSEVIER

Atherosclerosis xxx (2008) xxx–xxx

ATHEROSCLEROSIS

www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

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

Gaëlle Bello [a,1], Frédéric Cailotto [a,1], Didier Hanriot [a], Marie-Nathalie Kolopp-Sarda [b], Véronique Latger-Cannard [c], Ketsia Hess [a], Faiez Zannad [a], Dan Longrois [a,d], Armelle Ropars [a,*]

[a] *U684 INSERM "stiffness, fibrosis, and cardiovascular risk", Faculty of Medicine, University of Nancy I, Vandoeuvre-les-Nancy, France*
[b] *Immunology laboratory, Faculty of Medicine, University of Nancy I, Vandoeuvre-les-Nancy, France*
[c] *Department of Biological Haematology, Centre Hospitalier Universitaire, Vandoeuvre-les-Nancy, France*
[d] *Department of Anaesthesia and Intensive Care, Centre Hospitalier Universitaire, Vandoeuvre-les-Nancy, France*

Received 25 July 2007; received in revised form 20 December 2007; accepted 21 December 2007

Abstract

C-reactive protein (CRP) is an independent predictor of atherosclerosis and its complications. Monocytes/macrophages are implicated in this complex disease which is, among other mechanisms, characterised by angiogenesis. The aim of this study was to analyse whether CRP plays a role in VEGF-A regulation by monocytic cells. Our findings show that CRP up-regulates VEGF-A mRNA expression and protein excretion in THP-1 cells in a concentration- and time-dependent manner. Furthermore, we studied the signaling pathway underlying this effect. CRP increases VEGF-A expression *via* a PI3-kinase and an extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 1/2 dependent pathway. Our results suggest that CRP could play a role in the angiogenesis process *via* immune cells such as monocytes.
© 2008 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: C-reactive protein; VEGF; Atherosclerosis; MAP kinase

1. Introduction

C-reactive protein (CRP) has been proposed as an independent marker for vascular wall inflammation and predictor of occurrence of atherosclerosis and its acute clinical complications. Numerous studies have demonstrated that high levels of CRP in apparently healthy individuals predicted cardiovascular events independently of other known risk factors [1,2]. In addition, reports are now emerging suggesting that CRP is not only a biomarker but could have direct deleterious effects such as promotion and/or maintenance of an inflammatory status and inflammation-associated atherosclerosis [3]. However, the mechanisms responsible for the direct effects of CRP in atherosclerosis are as yet incompletely characterised.

CRP has been shown to be localised in atherosclerotic lesions from humans and from experimental models of atherosclerotic disease and to be involved in aortic wall calcification [4]. Moreover, it has been described that CRP activates endothelial and smooth muscle cells of the vascular wall *via* cytokines, integrins, MMPs overproduction, and promotes their proliferation [5,6]. In another cell type involved in the pathogenesis of atherosclerosis such as monocytes, CRP induces the production of cytokines such as IL-1β, IL-6, and IL-8, increases the expression of MMP-1, promotes their migration, favours phagocytosis and the uptake of oxidised LDL (oxLDL) [7,8]. In human coronary artery lesions, CRP colocalises with macrophages and oxLDL [9].

It has been suggested that angiogenesis plays an important role in atherosclerosis initiation and progression. In fact, in atherosclerotic plaques, a neovascularisation process appears, characterised by an increase in microvessel density and proliferation of *vasa vasorum* [10,11]. These studies

* Corresponding author. Tel.: +33 383683632; fax: +33 383683639.
E-mail address: ropars@scbiol.uhp-nancy.fr (A. Ropars).
[1] Contributed equally to this work.

0021-9150/$ – see front matter © 2008 Published by Elsevier Ireland Ltd.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

UNCORRECTED PROOF

support the hypothesis that plaque neovascularisation could promote the progression of atherosclerosis and plaque rupture [12]. The most common angiogenic factors are members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family that are chemoattractants for monocytes/macrophages and smooth muscle cells, stimulate endothelial cell migration and proliferation, and mediate increased microvascular permeability [13,14]. Different VEGF forms have been found in atherosclerotic lesions especially VEGF-A [15].

As angiogenesis and monocytes are implicated in the pathophysiology of atherosclerosis, we investigated whether monocytic cells treated with CRP could increase their VEGF-A production, thus implying that CRP could be potentially proangiogenic. Our results suggest that CRP stimulates VEGF-A mRNA expression and protein excretion in THP-1 cells. This up-regulation is dependent on the activation of the PI3-kinase and ERK 1/2 pathway and independent of the p38 MAPK pathway.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Transduction signals inhibitors Ly294002, PD98059, SB202190, SB203580 and cycloheximide were purchased from Sigma–Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Purified CRP was provided from Sigma–Aldrich and recombinant CRP was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Sodium azide, dimethyl sulfoxide (DMSO), polymyxin B used as controls were purchased from Sigma–Aldrich.

For all experiments, sodium azide was removed from both commercial CRP with biospin columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and assayed for endotoxin contaminant by the Limulus assay (Sigma). Additional purification step through Detoxi-Gel Endotoxin Removal Columns (Pierce) was performed to remove endotoxin when necessary. The final endotoxin level of all CRP solutions used was below 0.08 EU/mL. The purified preparations were submitted to SDS-polyacrylamide gels to verify their quality, and their protein concentration was determined by DC protein assay (Bio-Rad).

2.2. Cell culture

The human monocytic leukaemia cell line THP-1 was a gift of Dr. E. Emilie (U131 INSERM, Clamart, France). Cells were cultured at 37 °C under 5% CO_2 in RPMI 1640 medium with 10% heat inactivated foetal calf serum (Eurobio, Courtaboeuf, France), 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate (all purchased from Sigma–Aldrich), 1× non-essential amino-acids (Gibco-BRL, Invitrogen, Baisley, UK).

2.3. RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured cells using Trizol reagent (Euromedex, Mundolsheim, France). For cDNA synthesis, 2 μg of total RNA, 40 units of Mu-MLV (MBI Fermentas, Euromedex), 2 mM dNTP (MBI Fermentas), 0.25 μM oligo dT15 (Invitrogen), RT 1× buffer, 10 units of RNAse inhibitor (MBI Fermentas) were transcribed 1 h at 37 °C. Oligonucleotides sequences used to amplify all VEGF-A isoforms (GenBank accession number AF022375) were respectively [16]: sense 5′-ggagggcagaatcatcacgaag-3′; antisense 5′-cacacaggatggcttgaagatg-3′ with the following PCR program: 5 min at 94 °C followed by 30 or 35 cycles each consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C and 10 min at 72 °C. For gamma actin (γ-actin, GenBank accession number M19283) oligonucleotides sequences were [17]: sense 5′ gccaacagagagaagatgac 3′ and antisense 5′aggaaggaaggctggaac 3′ and the PCR program was the same as the VEGF-A PCR program, except for the number of cycles (25 cycles) and the hybridisation temperature (56 °C).

An aliquot of these PCR products was loaded on a 1.5% agarose-ethidium bromide (BET) gel and quantified by densitometry analysis (Multi-Analyst, Bio-Rad). The VEGF-A mRNA levels were normalised to those of γ-actin mRNA levels.

2.4. Measurement of total VEGF-A by ELISA

After 24 h in culture, supernatants of THP-1 cells were harvested in sterile conditions, centrifuged to remove eventual dead cells. Total VEGF-A concentrations in the different THP-1 supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the VEGF R&D quantikine kit (R&D Systems, Lille, France). Assays were performed as recommended by the manufacturer's protocol and experiments were duplicated and independently repeated three to five times each.

2.5. Protein analysis and quantification

Cells were lysed during 15 min on ice with the cell lysis buffer from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) after a wash in ice-cold saline phosphate buffer. Extraction was performed following the manufacturer's recommendations in the presence of a complete protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The lysates were centrifuged at 16,000 × *g* for 15 min to remove cellular debris. Protein concentrations were determined by DC protein assay (Bio-Rad).

2.6. Western blotting analysis

All protein samples were resuspended with 2× Laemmli sample buffer (Sigma–Aldrich) and heated to 100 °C for 5 min. Equal amounts of proteins (40 μg) were subjected to

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

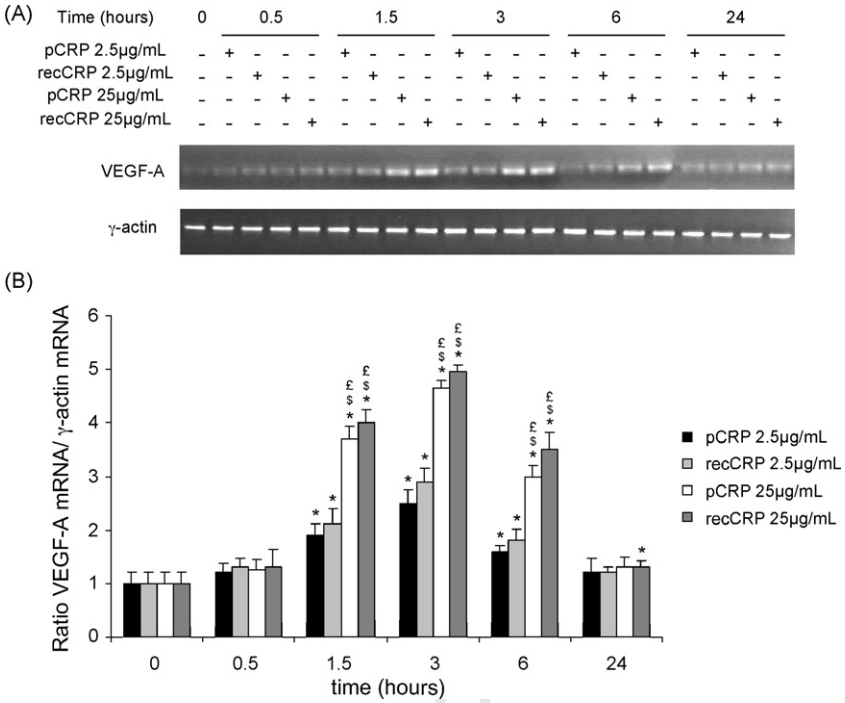


Fig. 1. CRP increases VEGF-A mRNA levels in THP-1 cells in a concentration- and time-dependent manner. THP-1 cells were incubated with purified (pCRP) or recombinant (recCRP) CRP at 2.5 or at 25 μg/mL for different time periods: 30 min, 1:30, 3, 6, and 24 h. After RNA extraction and cDNA expression, a PCR was carried out with specific primers for human gamma actin (γ-actin) and VEGF-A. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose-BET gel. (A): VEGF-A and γ-actin PCR products on 1.5% agarose-BET gels. (B): Ratios of VEGF-A mRNA/γ-actin mRNA. Arbitrary units were used and the mean value of 1 was attributed to the duration 0 min. The results shown are representative of three independent experiments. The error bars are the S.D. and "*"represents a significant difference ($P < 0.05$) between control (T_0) and CRP-treated cells, $^{£}$ $P < 0.05$ vs. pCRP 2.5 μg/mL, and $^{\$}$ $P < 0.05$ vs. recCRP2.5 μg/mL.

electrophoresis on 10% SDS-polyacryamide gel (Bio-Rad) and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Molsheim, France). After blocking for 2 h at room temperature with 5% non-fat-dry milk or BSA, membranes were incubated with an anti-phospho ERK 1/2 mouse (Cell Signaling Technology; 1/2000) or an anti-phospho p38 MAPK rabbit antibody (Cell Signaling Technology; 1/2000) at 4 °C overnight. Membranes were washed and then incubated for 1 h at room temperature with an anti-mouse (1/3000) or an anti-rabbit (1/5000) IgG-peroxidase conjugate (Jackson immunolaboratories, West Grove, USA). To determine the amounts of the phosphorylated ERK 1/2 or p38 MAPK, blots were stripped and reprobed using phosphorylation state-independent anti-ERK 1/2 total antibody (Cell Signaling Technology). Each membrane was subsequently washed and immunocomplexes were visualised by chemiluminescence (Pierce, Rockford, USA), exposed to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) and the signals were analysed by densitometry (Multi-Analyst, Bio-Rad).

2.7. Statistical and data analysis

All experiments were repeated independently a minimum of three times. All data are given as mean ± S.D. and a Mann–Whitney U test was used. A statistically significant difference was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. CRP increases total VEGF-A mRNA expression

THP-1 cells were incubated with purified (pCRP) or recombinant (recCRP) CRP at 2.5 or 25 μg/mL for different time periods. As shown in Fig. 1, pCRP or recCRP had increased VEGF-A mRNA expression in monocytic cells in the same manner compared to untreated cells. This up-regulation reached a peak at 3 h whatever the origin and the concentration of CRP used. At 3 h, VEGF-A mRNA levels had increased approximately 2.7-fold with both CRP at 2.5 μg/mL compared to unstimulated cells. This increase was concentration-dependent and reached approximately 4.6-fold with CRP at 25 μg/mL.

3.2. The effects on VEGF-A mRNA up-regulation are not due to endotoxin contamination and/or sodium azide

Many reports have shown that endotoxins and sodium azide could be responsible for the effects wrongly attributed to CRP, therefore we tested carefully the impact of these components. As it is known that endotoxins are hard to remove entirely, we used the antibiotic polymyxinB (polB) at 20 μg/mL in the presence of 25 μg/mL of recCRP to test an eventual action of residual endotoxins on VEGF-A mRNA levels. As shown in Fig. 2, even in the

UNCORRECTED

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

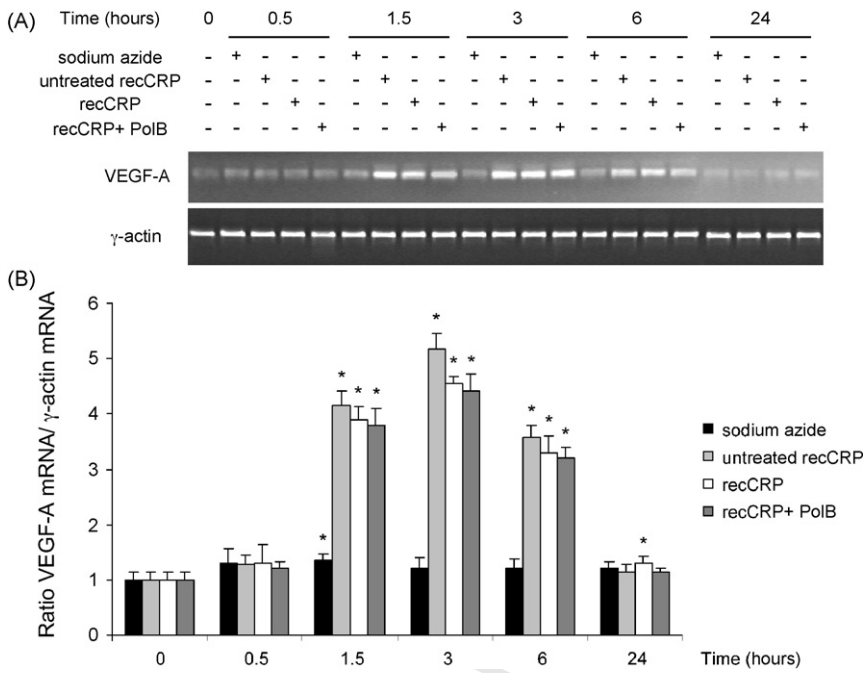


Fig. 2. Sodium azide and potential contaminant endotoxins of commercial CRP are not responsible for the increase in VEGF-A mRNA levels. THP-1 cells were incubated for 30 min, 1:30, 3, 6, and 24 h with 0.1% sodium azide or with sodium azide free CRP (recCRP) or with untreated CRP. In a same manner, THP-1 cells were incubated with polymyxinB at 20 μg/mL + recCRP at 25 μg/mL or with 25 μg/mL of recCRP alone. (A): VEGF-A and γ-actin PCR products on 1.5% agarose-BET gels. (B): Ratios of the VEGF-A mRNA/γ-actin mRNA. Arbitrary units were used and the mean value of 1 was attributed to the duration 0 min. The error bars are the S.D. and $P < 0.05$ was considered as significant. "*" $P < 0.05$ between CRP-treated cells vs. control (T_0). The experiment was repeated three times independently.

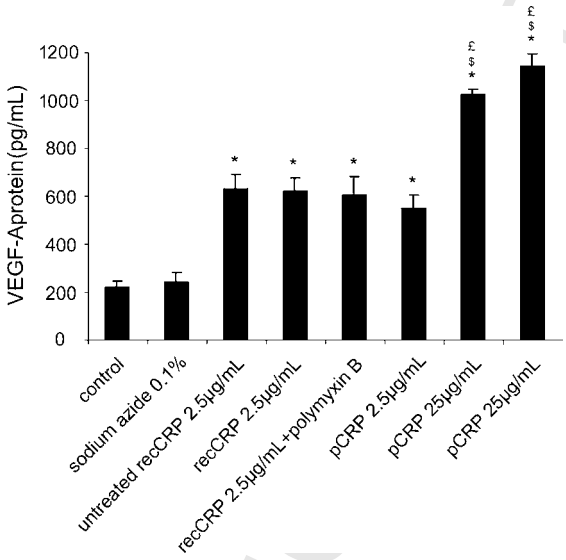


Fig. 3. CRP increases total VEGF-A protein concentration in the THP-1 cells supernatants in a dose-dependent manner. THP-1 cells were stimulated with pCRP or recCRP at 2.5 or at 25 μg/mL and culture supernatants were collected 24 h later for ELISA tests. This experiment was repeated in duplicate three to five times. Potential effects of 0.1% sodium azide and/or endotoxins on VEGF-A protein excretion increase were tested. The error bars are the S.D. and $P < 0.05$ was considered as significant. *$P < 0.05$ vs. control, £ $P < 0.05$ vs. pCRP 2.5 μg/mL, $ $P < 0.05$ vs. recCRP2.5 μg/mL.

presence of polymyxinB, CRP increased VEGF-A mRNA expression and the differences which appeared were not statistically significant between CRP alone and, CRP with polB.

In a same manner, THP-1 cells treated for different time periods with sodium azide at 0.1% (wt/vol), corresponding to the highest concentration found in CRP preparations, failed to increase VEGF-A mRNA expression (Fig. 2). Likewise sodium azide not removed exceptionally from CRP preparations was also tested (untreated CRP). No statistically significant differences appeared between untreated CRP and sodium azide-free CRP (recCRP) on VEGF-A mRNA up-regulation (Fig. 2).

3.3. CRP increases total VEGF-A protein secretion in THP-1 supernatants

THP-1 cells were treated with pCRP or recCRP at 2.5 or 25 μg/mL and supernatants were taken out 24 h later. ELISA tests were performed to analyse total VEGF-A. As for VEGF-A mRNA, the up-regulation of VEGF-A protein excretion by CRP was concentration-dependent. Purified and recombinant CRP used at 2.5 μg/mL increased about 2.6-fold VEGF-A protein production and about 4.9-fold at 25 μg/mL (Fig. 3).

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

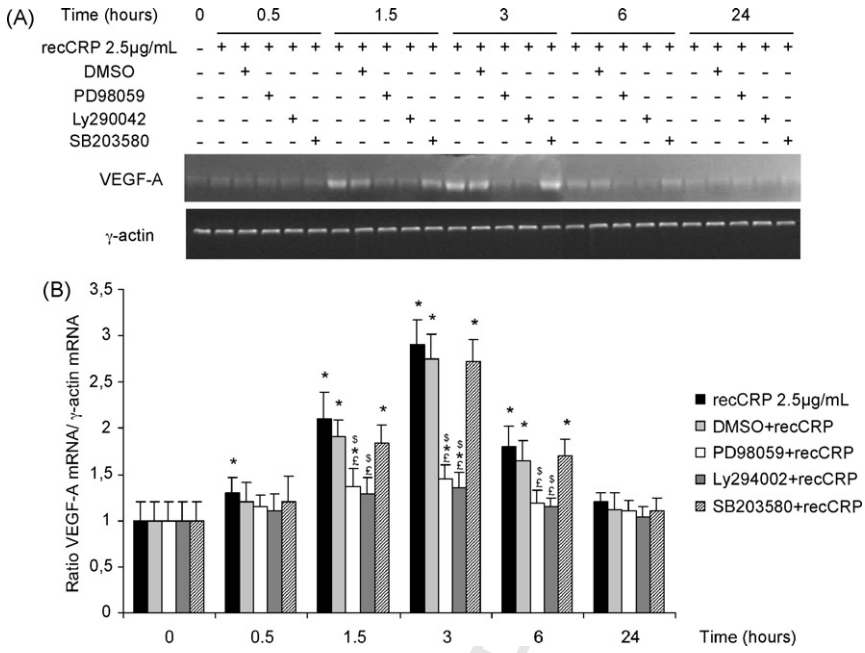


Fig. 4. PI3 kinase and ERK 1/2 inhibitors but not p38 MAPK inhibitors block the CRP-induced increase of VEGF-A mRNA expression. THP-1 cells were preincubated for 1 h at 37 °C with PD98059, a MEK 1 inhibitor, Ly294002, a PI3K inhibitor, SB203580, a p38 MAPK inhibitor, or with DMSO, a vehicle control, and then stimulated with 2.5 μg/mL recCRP for 30 min, 1:30, 3, 6, and 24 h. All inhibitors were used at 10 μM. (A): VEGF-A and γ-actin RT-PCR products loaded on a 1.5% BET-agarose gel. (B): ratios of VEGF-A mRNA/γ-actin mRNA. Arbitrary units were used and the mean value of 1 was attributed to the time period 0 min. The error bars are the S.D. and the experiment was repeated four times independently. "*" $P < 0.05$ CRP vs. control (T_0), $^{£}$ $P < 0.05$ vs. recCRP 2.5 μg/mL, $^{\$}$ $P < 0.05$ vs. DMSO + recCRP2.5 μg/mL.

The potential effects of residual sodium azide or endotoxins on VEGF-A protein excretion were also evaluated. No significant changes appeared in VEGF-A levels between recCRP, and recCRP + polB. Sodium azide at 0.1% (wt/vol) also failed to increase significantly VEGF-A protein levels.

3.4. *Effect of different inhibitors on VEGF-A mRNA and protein increase induced by CRP in THP-1 cells*

This study was performed on monocytic cells in the presence of 2.5 μg/mL of recCRP (Fig. 4). Pre-treatment of THP-1 cells with Ly294002, a PI3K inhibitor, or with PD98059, a MEK1 inhibitor, practically abolished the CRP-increased VEGF-A mRNA. This study was confirmed at the protein level with ELISA experiments, since the increase in VEGF-A excretion induced by CRP (609 ± 55 pg/mL) compared to control (220 ± 28 pg/mL) was practically abrogated in presence of these inhibitors: 245 pg/mL (±40) with Ly294002 and 268 pg/mL (±33) with PD98059 (Fig. 5). On the other hand, the p38 MAPK inhibitors, SB202190 or SB203580, failed to inhibit VEGF-A mRNA and protein up-regulation initiated by CRP (Figs. 4 and 5). So, CRP activates the PI3K and ERK 1/2 pathway but not the p38 MAPK pathway to up-regulate VEGF-A production in monocytic cells. We further investigated if this CRP-increased VEGF-A expression in culture supernatants

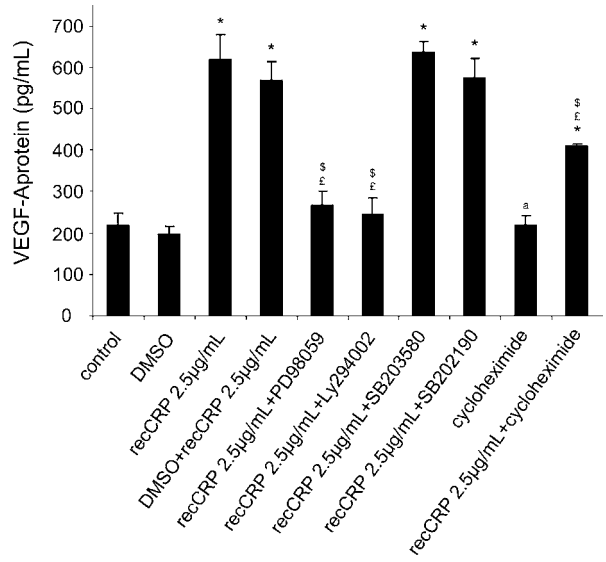


Fig. 5. The CRP-induced increase of VEGF-A protein excretion can be blocked by PI3K and ERK 1/2 inhibitors as cycloheximide but not MAPK p38 inhibitors. THP-1 cells were pre-treated with an inhibitor (10 μM each) for 1 h and then incubated with recCRP at 2.5 μg/mL. Culture supernatants were collected 24 h later for ELISA tests. Data are presented as the mean ± S.D. of experiments repeated independently three to five times in duplicate. *$P < 0.05$ vs. control (T_0), $^{£}$ $P < 0.05$ vs. recCRP 2.5 μg/mL, $^{\$}$ $P < 0.05$ vs. DMSO + recCRP2.5 μg/mL, and ^{a} $P < 0.05$ vs. recCRP 2.5 μg/mL + cycloheximide.

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

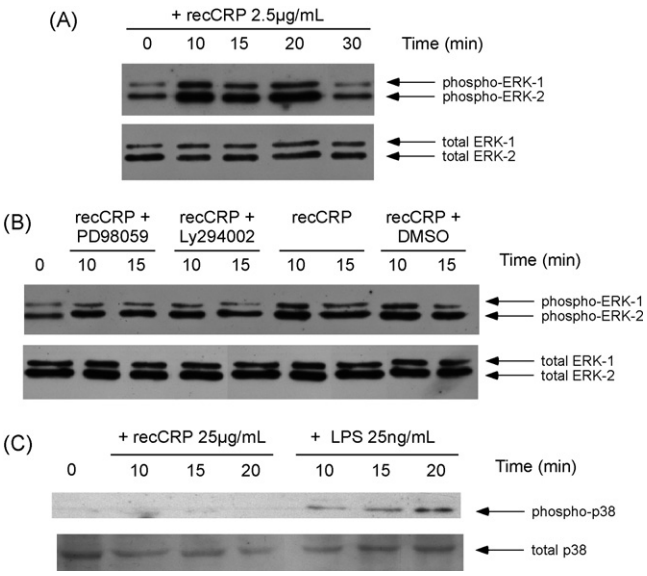


Fig. 6. Effects of CRP on p42/p44 MAPK and p38 MAPK phosphorylations in THP-1 cells. THP-1 cells were incubated with recCRP at 2.5 μg/mL for 0, 10, 15, 20, and 30 min (A). THP-1 cells were preincubated for 1 h at 37 °C with PD98059, Ly294002 or SB203580 at 10 μM each or with DMSO and then stimulated with 2.5 μg/mL CRP for 10 and 15 min (B). Thirdly, THP-1 cells were incubated with recCRP 2.5 μg/mL or with 25 ng/mL of LPS (positive control) for 10, 15 and 20 min (C). In all experiments, total cell proteins were separated by SDS-PAGE and analysed by Western blotting. Phosphorylation (Pi) of p42/44 MAPK (A, B) or p38 MAPK (C) was studied respectively by using an anti-phospho-p42/44 MAPK mouse or an anti-phospho-p38 MAPK rabbit antibody. Densitometric analyses were performed to study the relative changes in the phosphorylation status. To control protein loading, membranes were stripped and reprobed with an anti-total-p42/44 (A, B) or -p38 (C) MAPK rabbit antibody. The experiments shown are representative of three experiments.

was due to *de novo* protein expression. In the presence of cycloheximide, a protein expression inhibitor, the VEGF-A increase mediated by CRP was reduced by about half (44%) (Fig. 5).

3.5. Analysis by Western blotting of the CRP signaling pathway

To corroborate further these findings, we performed Western blotting analyses to study the ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways. THP-1 cells were pre-treated with PD98059, Ly294002 or SB203580 and 1 h later, recCRP was added to the medium then cells were taken out at different time periods. The results shown in Fig. 6 confirm that CRP used the ERK 1/2 signaling pathway to induce its effects. When either the PI3K inhibitor Ly294002 or the MEK1 inhibitor PD98059 were added, CRP was unable to activate THP-1 cells *via* the ERK 1/2 pathway. In contrast, the p38 MAPK signaling pathway was not stimulated in THP-1 cells because no phosphorylated p38 MAPK was observed. Thus, Western blotting analyses were in agreement with RT-PCR and ELISA experiments.

4. Discussion

Recent studies have shown that CRP is not only a powerful marker of cardiovascular events but that it exerts directly a proatherogenic effect on the vasculature. Biopsies of the atherosclerotic plaques show that CRP, macrophages, complement, LDL and angiogenic factors like VEGF-A are present. However, the precise molecular mechanisms and chronology of events underlying this response have yet to be elucidated. For example, CRP could induce effects in monocytes that are thereafter the origin of macrophages found in atherosclerotic plaques.

In these plaques, a neovascularisation process appears especially in the thickened intima and media of the vascular wall and, an outgrowth of the *vasa vasorum* is generally observed.

As immune cells like monocytes are able to produce VEGF, we investigated the possibility that CRP regulates their VEGF-A production. The concentrations of CRP employed in this study, 2.5 and 25 μg/mL, correspond respectively to moderate and elevated risk of developing cardiovascular events. We showed that upon CRP stimulation, monocytic cells are able to up-regulate their VEGF-A expression and this increase was independent of the source of CRP used. This effect was concentration- and time-dependent, was characterised by increased VEGF-A mRNA expression, and at least to some extent, *de novo* protein synthesis. Previous studies had demonstrated that CRP can indirectly favour VEGF production in endothelial cells by up-regulating MCP-1 [18]. This chemokine in turn is responsible also for mitogenic effects on vascular smooth muscle cells [19,20] and stimulates the migration of monocytes through endothelial layers *via* increased β2-integrin expression [21]. VEGF favours smooth muscle and endothelial cell migration, a process implicated in neovascularisation, in atheroma plaque formation and in its destabilisation [22]. Taken together, these findings support the hypothesis that very early in the disease, immune cells like monocytes stimulated chronically with "elevated" CRP concentrations could enhance their VEGF-A production, favouring also activation of endothelial and smooth muscle cells of the vascular wall. It could promote the creation of new vessels as seen in *vasa vasorum* of atherosclerotic plaques, as well as monocytes migration through the vascular wall and their differentiation into macrophages.

As an increasing number of studies have demonstrated that certain effects attributed to CRP are in fact due to sodium azide and/or endotoxins present in commercial CRP preparations, we tested these components on VEGF-A production [23,24]. THP-1 cells incubated with sodium azide failed to increase significantly VEGF-A expression. The effects of contaminants such as endotoxins have been tested for two reasons: endotoxins may be present in commercial CRP preparations and endotoxins are known to activate VEGF expression in immune cells [25]. When it was necessary, detoxi-gel columns were used to remove this component and the Limulus assay was applied to check this purification

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

(<0.08 EU/mL). The effect of residual endotoxins was tested by adding polymyxinB (at 20 μg/mL) in the culture medium of THP-1 cells in the presence of CRP. The VEGF-A increase was not attenuated by addition of polymyxinB. Incubation of THP-1 cells with 15 pg/mL of LPS (corresponding to the limit of 0.08 EU/mL of the Limulus assay) had no significant impact on VEGF-A mRNA level (data not shown). Likewise, it is known that LPS stimulates the p38 MAPK pathway in monocytes, however, addition of CRP failed to activate this pathway [26]. This negative result was not due to a technical problem because in the presence of LPS, p38 MAPK protein was phosphorylated in THP-1 cells. Taken together, these data indicate that neither sodium azide nor endotoxins are responsible for the observed effects on VEGF-A increase in monocytic cells.

Furthermore, we studied the signaling pathway used by CRP in monocytic cells to increase VEGF-A production. This up-regulation is PI3K- and ERK 1/2- dependent, because cells respectively pre-treated with the inhibitors Ly294002 and PD98059 failed to increase VEGF-A production in response to CRP. This inhibition was seen at both mRNA and protein levels. We tested next if CRP also activated the p38 MAPK pathway. We found that both p38 MAPK inhibitors, SB202190 and SB203580 were unable to block the increase in VEGF-A levels initiated by CRP, at least at the time periods and at the concentrations studied. The slight inhibitory effect observed was similar to that obtained with DMSO and was not statistically significant. The Western blotting experiments confirmed the data obtained by RT-PCR and ELISA tests. It is interesting to note that activation of PI3K and ERK 1/2 pathways to enhance or induce VEGF-A levels is shared by different cell types such as aortic smooth muscle cells [27,28].

The observation that CRP activates PI3K and ERK 1/2 pathway to increase VEGF-A levels suggests that CRP could bind to Fcgamma receptors (FcγR) present on immune cells to induce this effect. In fact, numerous studies have demonstrated that CRP binds to FcγRI and FcγRII [29,30] and Williams et al. have shown that CRP uses the FcγRII receptor present in U937 cells to enhance MMP-1 expression *via* an ERK1/2 signaling dependent pathway [31]. As THP-1 cells have both these receptors [32], we hypothesise that CRP could increase VEGF-A expression in THP-1 cells *via* binding to its FcγRs. Preliminary experiments with the use of the anti-CD32 or the anti-CD64 antibody in competition with CRP have shown that CRP was able to use both FcgammaRI and FcgammaRIIa to induce this increase in VEGF-A expression in THP-1 cells (data not shown).

It remains to be determined whether CRP is able to increase other VEGF forms, such as VEGF-C and –D found in atherosclerotic lesions, in monocytes/macrophages and in other cell types [33] and is able to up-regulate VEGF receptors.

In conclusion, our results show that CRP, as well as being implicated in inflammation and in thrombosis, could also promote very early angiogenesis *via* its effects in immune cells such as the monocytes. In "normal" cases of repair such as bone repair [34] CRP could play a positive role by favouring angiogenesis, and in deleterious cases such as atherosclerosis it could promote growth of the *vasa vasorum*.

Acknowledgments

We thank Dr. D. Emilie for the gift of the THP-1 cells and Dr. A. Bianchi for the gift of inhibitors. We would like to thank Pr M. Dauça, Pr S. N. Thornton and Dr. E. Wéber for helpful comments on the manuscript. We would like to thank Dr. H. Louis, Dr. I. Abdelmoutaleb, and M. Siest for technical assistance. The authors declare that no conflict of interest exists between them.

This work was financially supported by the Région Lorraine and the CIC (Clinical Investigation Center) of Dommartin les Toul (France).

References

[1] Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. Circulation 1998;98:731–3.

[2] Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. Ital Heart J 2001;2:804–6.

[3] Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, et al. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. Circulation 2003;108:512–5.

[4] Warrier B, Mallipeddi R, Karla PK, Lee CH. The functional role of C-reactive protein in aortic wall calcification. Cardiology 2005;104:57–64.

[5] Hattori Y, Matsumura M, Kasai K. Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. Cardiovasc Res 2003;58:186–95.

[6] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation 2000;102:2165–8.

[7] Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. Cytokine 1992;4:361–8.

[8] Zhou P, Thomassen MJ, Pettay J, Deodhar SD, Barna BP. Human monocytes produce monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in response to a synthetic peptide derived from C-reactive protein. Clin Immunol Immunopathol 1995;74:84–8.

[9] Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. Circulation 2001;103:1194–7.

[10] Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:4736–41.

[11] Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, Langille BL. Experimental angiogenesis of arterial *vasa vasorum*. Cell Tissue Res 2002;307:303–13.

[12] Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. Circulation 2004;110:2032–8.

[13] Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med 1990;172:1535–45.

[14] Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. Microvasc Res 1999;58:128–36.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

[15] Panutsopulos D, Papalambros E, Sigala F, et al. Protein and mRNA expression levels of VEGF-A and TGF-beta1 in different types of human coronary atherosclerotic lesions. Int J Mol Med 2005;15:603–10.
[16] Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. Cancer Res 2004;64:7822–35.
[17] Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. J Biol Chem 2000;275:29731–6.
[18] Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. Circulation 2001;103:2531–4.
[19] Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. Blood 2005;105:1405–7.
[20] Parenti A, Bellik L, Brogelli L, Filippi S, Ledda F. Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;286:H1978-1984.
[21] Heil M, Clauss M, Suzuki K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. Eur J Cell Biol 2000;79:850–7.
[22] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:2054–61.
[23] van den Berg CW, Taylor KE, Lang D. C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:e168–71.
[24] Pepys MB, Hawkins PN, Kahan MC, et al. Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. Circ Res 2005;97:e97–103.
[25] Sakuta T, Matsushita K, Yamaguchi N, et al. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. J Med Microbiol 2001;50:233–7.
[26] Itaya H, Imaizumi T, Yoshida H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Thromb Haemost 2001;85:171–6.
[27] Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, Tomari S, Nagata M. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002;290:177–84.
[28] Tanabe K, Hirade K, Ishisaki A, et al. Possible involvement of p44/p42 MAP kinase in retinoic acid-stimulated vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 2004;175:245–51.
[29] Marnell LL, Mold C, Volzer MA, Burlingame RW, Du Clos TW. C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells. J Immunol 1995;155:2185–93.
[30] Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. J Exp Med 1999;190:585–90.
[31] Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:61–6.
[32] Fleit HB, Kobasiuk CD. The human monocyte-like cell line THP-1 expresses Fc gamma RI and Fc gamma RII. J Leukoc Biol 1991;49:556–65.
[33] Nakano T, Nakashima Y, Yonemitsu Y, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries. Hum Pathol 2005;36:330–40.
[34] Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, et al. Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. J Gene Med 2003;5:560–6.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Bello G, et al., C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells *via* a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway, Atherosclerosis (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.046

Molecular and Cellular Endocrinology 245 (2005) 67–76

MCE
Molecular and Cellular Endocrinology
www.elsevier.com/locate/mce

Retinoic acid amplifies the host immune response to LPS through increased T lymphocytes number and LPS binding protein expression

Carole Seguin-Devaux [a], Didier Hanriot [a], Michèle Dailloux [b], Véronique Latger-Cannard [c], Faiez Zannad [a], Paul-Michel Mertes [a,d], Dan Longrois [a,d,*], Yvan Devaux [a]

[a] *Unité mixte UHP - INSERM U684, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, BP 184, Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France*
[b] *Laboratory of Microbiology, Centre Hospitalier et Universitaire, Nancy, France*
[c] *Laboratory of Haematology, Centre Hospitalier et Universitaire, Nancy, France*
[d] *Departments of Anesthesia and Intensive Care, Centre Hospitalier et Universitaire, Nancy, France*

Received 21 May 2005; received in revised form 26 August 2005; accepted 17 October 2005

Abstract

Vitamin A deficiency is associated with increased susceptibility to infection but the effects of Vitamin A supplementation on host response to pathogens are controversial. This study investigated the mechanisms by which all-trans retinoic acid (atRA) modulates the host immune response in an experimental model of Vitamin A supplementation before and after challenge with LPS in rats. We show here that a supplementation with five daily injections of 10 mg/kg atRA increased the number of T lymphocytes in the peripheral blood. In addition, we show that atRA increased the expression of the LPS binding protein (LBP), a component of the LPS recognition system. The retinoic acid receptor (RAR)α agonist Ro 4060-55 but not the pan-retinoid X receptors (RXRs) agonist Ro 2573-86 mimicked the effects of atRA on LBP expression suggesting that atRA enhances LBP expression through a RARα-mediated pathway. In order to investigate the significance of increased LBP expression we challenged atRA-supplemented rats with the Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* (LM) that activates the immune response independently from LBP. In sharp contrast to our previous observations that atRA supplementation enhances IFN-γ expression and NOS2 pathway activation in LPS-challenged rats [Devaux, Y., Grosjean, S., Seguin, C., David, C., Dousset, B., Zannad, F., Meistelman, C., de Talancé, N., Mertes, P.M., Ungureanu-Longrois, D., 2000. Retinoic acid and host–pathogen interactions: effects on inducible nitric oxide synthase in vivo. Am. J. Physiol. 279, E1045–E1053], atRA did not increase the LM-induced IFN-γ expression and NOS2 pathway activation. Overall, these data demonstrate that although atRA induces a "priming" of the immune system characterized by increased T lymphocytes number and LBP expression, the profile of the immune response depends on the inflammatory/infectious stimulus. These results could explain why Vitamin A supplementation could have beneficial/neutral or deleterious effects according to the identity of the infectious pathogen.
© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Vitamin A; Lipopolysaccharide; *Listeria monocytogenes*; T cells; LPS binding protein

1. Introduction

Vitamin A deficiency has been convincingly shown to be associated with increased susceptibility to infection. Under certain circumstances, supplementation with Vitamin A has been reported to decrease the incidence and severity of infectious disease, which gained its name as the "anti-infective" vitamin (Semba, 1999; Villamor and Fawzi, 2000). While the majority of trials have reported beneficial effects of Vitamin A supplementation, others have reported that Vitamin A supplementation had neutral (Barreto et al., 1994; Binka et al., 1995; Fawzi et al., 1998; Nacul et al., 1998) or even, in some circumstances, deleterious effects (Stansfield et al., 1993; Stephensen et al., 1998) on the incidence or course of infection. The beneficial versus detrimental or neutral effects of Vitamin A supplementation probably depend on factors, such as the host Vitamin A status before the supplementation (Vitamin A deficient or replete subjects), the hormonal status of the host, the timing of supplementation

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 15 41 66; fax: +33 3 83 15 36 88.
E-mail address: d.longrois@chu-nancy.fr (D. Longrois).

0303-7207/$ – see front matter © 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mce.2005.10.006

(prophylaxis or therapy of infectious diseases), the chemical identity of the Vitamin A derivative, the endpoints used to assess the effects of supplementation (Villamor and Fawzi, 2000; Rosales, 2002; Fawzi et al., 2003) and also the pathogens and the organs involved. In addition, several regimens of supplementation have been reported, such as unique large doses, large but spaced doses and frequently repeated small doses, the last being probably the most efficient (Villamor and Fawzi, 2000).

The mechanisms that mediate the "anti-infectious" effects of Vitamin A supplementation are thought to be related to changes in the host inflammatory and immune (both innate and adaptive) responses thus suggesting a stereotyped immune modulating effect of Vitamin A supplementation. Among the effectors of the innate immune response, Vitamin A and its active metabolite, all-trans retinoic acid (atRA), modulate the expression and/or activity of several pathways involved in the host response to pathogens, such as the enzymes responsible for prostanoids biosynthesis, i.e. phospholipases A2 (Hope et al., 1990) and cyclooxygenases (Nüsing et al., 1995; Hill et al., 1996; Devaux et al., 2001), the inducible nitric oxide synthase (NOS2) (Devaux et al., 2000; Austenaa and Ross, 2001) as well as several cell types, such as neutrophils, monocytes/macrophages and natural killer (NK) cells (Semba, 1998; Erickson et al., 2000). Vitamin A also modulates the adaptive immune response and specifically the biology of dendritic cells (Geissmann et al., 2003), the antigen-mediated activation of T lymphocytes (Friedman et al., 1993; Iwata et al., 2003; Ertesvag et al., 2002) as well as B cells differentiation and immunoglobulin production (Blomhoff et al., 1992).

In previous studies we investigated the effects of atRA on several components of the innate immune response, such as NOS2 pathway, an important actor of the host response to infectious stimuli. We demonstrated that atRA supplementation in rats in vivo enhanced the LPS-induced activation of the NOS2 pathway (Devaux et al., 2000), in sharp contrast to the in vitro data reported by several groups (Hirokawa et al., 1994; Mehta et al., 1994; Datta and Lianos, 1999; Datta et al., 2001; Motomura et al., 1997) including ours (Grosjean et al., 2001). To explain the differences between in vivo and in vitro effects of atRA supplementation on the NOS2 pathway, we hypothesized that atRA may amplify the host response in vivo through mechanisms absent in vitro. We report here that atRA increased T lymphocytes number in the peripheral blood. In addition, we observed that atRA enhanced the expression of the LPS binding protein (LBP), a component of the LPS recognition system. Our results suggest that enhancement of LBP expression by atRA depends on retinoic acid receptor (RAR)α, since the RARα agonist Ro-4060-55 but not the pan-retinoid X receptors (pan-RXRs) agonist Ro 2573-86 mimicked the effects of atRA on LBP expression.

We attempted to investigate the significance of the atRA-mediated enhancement of LBP expression by challenging atRA-supplemented rats with the Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* (LM) that activates the host immune response through mechanisms independent from LBP. In sharp contrast to our previously published results showing that atRA increased the LPS-induced IFN-γ expression and NOS2 pathway activation, atRA did not modify the activation of these two components of innate immunity when the infectious agent was LM.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemicals and reagents were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) unless specified otherwise. *Salmonella typhimurium* LPS (Lot 96H4021) was dissolved in 0.9% (w/v) NaCl at a concentration of 4 mg/mL and stored at 4 °C. The previously characterized (Dramsi et al., 1997) LM strain EGD-E was kindly provided by Dr. Pascale Cossart. Aliquots of 10^9 colony forming units (CFU) LM in 0.9% (w/v) NaCl containing 20% glycerol were prepared and stored at −80 °C. Preliminary experiments were performed to document that bacteria viability and number were not significantly altered by storage. The RARα agonist Ro 4060-55 and the pan-RXRs agonist Ro 2573-86 were provided by Dr. R. Klaus (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). atRA, RARα and RXRs agonists were dissolved in 5% (v/v) DMSO and cold first pressure olive oil at a concentration of 10 mg/mL; aliquots were stored protected from light at −20 °C. Experiments involving retinoids were conducted under reduced light conditions. LPS and retinoids were administered i.p. in 500 μL volumes.

2.2. Experimental protocols

Male Wistar Kyoto rats (250–350 g) were housed and treated in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [1996 (7th ed.) Washington, DC: National Academy Press, aka National Research Council Guide].

2.2.1. Experiments with lipopolysaccharide

Rats were randomly divided into six groups ($n = 10$ in each group) as follows. For 5 consecutive days, rats received daily i.p. injections (10 mg/kg b.w.) of atRA (atRA and atRA + LPS groups), Ro-4060-55 (RARα group) or Ro 2573-86 (RXRs group). Rats from LPS and control groups received olive oil plus 5% DMSO in the same conditions. On day 5, rats from LPS and atRA + LPS groups were injected i.p. with LPS (4 mg/kg b.w.) and rats from control, atRA, RARα and RXRs groups with the same volume (i.e. 500 μL) of 0.9% (w/v) NaCl. Six hours thereafter, rats were anesthetized with 100 mg sodium thiopental (Nesdonal®, Rhône Poulenc Rorer, Paris, France) i.p., and the thorax and abdomen were dissected. Whole blood samples were recovered by cardiac puncture. Four milliliters were collected into heparinized tubes (Vacutainer®, Becton Dickinson, Meylan, France), centrifuged at 600 × *g* for 10 min and the plasma was stored at −70 °C. Tissue samples from liver, kidney and spleen were excised, rapidly rinsed in ice-cold saline, frozen in liquid nitrogen and stored at −70 °C until analysis.

2.2.2. Experiments with the facultative intracellular Gram-positive bacteria L. monocytogenes

Rats were divided in two groups: rats from atRA + LM group ($n = 5$) received five daily i.p. injections of atRA (10 mg/kg b.w.), whereas rats from LM group ($n = 5$) received olive oil plus 5% (v/v) DMSO under the same conditions. On day 5, rats from both groups were infected with 10^9 CFU LM i.p. and were sacrificed 24 h later. Rats were anesthetized, the thorax and abdomen were dissected, and samples from liver and spleen were recovered as described above. Additional samples from liver and spleen were harvested and freshly assayed for bacterial load. The dose of 10^9 CFU LM given intraperitoneally corresponds to the LD_{50} (Peress et al., 1985).

2.3. Measurement of bacterial load

After weighing, liver and spleen samples were homogenized in 2 mL 0.9% (w/v) NaCl with a potter, 10 μL aliquots were plated onto blood-gelose and CFU were counted after 24 h of growth at 37 °C. Each sample was assayed in triplicate, undiluted and diluted 10-fold. Results are expressed in CFU/g tissue.

2.4. Analysis of blood cells by flow cytometry

Differential white blood cells counts were obtained using a hematological counter (H2 Technicon, Bayer, France). Peripheral blood cells were double-stained with mAb directly conjugated either to fluoresceine isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). This assay was performed in 100 μL samples of whole blood with 10 μL of mAb solution for 30 min at room temperature and in the dark. Two-color staining was performed to determine the number of T helper (Th) lymphocytes ($CD5^+/CD4^+$) and NK cells ($CD5^-/CD161^+$). All mAb were mouse anti-rat IgG1 and were purchased from Serotec Ltd. (Oxford, UK): CD5 mAb (clone OX-19), CD4 mAb (clone W3/25) and CD161 mAb (clone 10/78). The mAb IgG1-FITC and IgG1-PE (clone F8-11-13, Serotec) served as isotypic controls. Red blood cells were then lysed with IOTest® three lysing solution (Beckman Coulter, Marseille, France) for 10 min at room temperature. The samples were washed, centrifuged at 300 × *g* for 5 min, and suspended in CellWash® (Becton Dickinson, Meylan, France). Samples were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and data were acquired and analyzed with CellQuest® software. The lymphocytes were identified by their low forward and side scatters and gated. Flow cytometry analysis was performed on 10,000 events.

2.5. Analysis of mRNA expression by semi quantitative RT-PCR

Messenger RNA expression of the housekeeping gene β-actin, IL-2, IFN-γ, NOS2 and several components of the host LPS recognition system (TLR4, CD14, MD-2 and LPS binding protein) was assessed by semi quantitative RT-PCR. The amplimer sequences, Genbank accession numbers and lengths of the expected PCR products are presented in Table 1. Amplification cycle numbers and annealing temperatures were optimized for each amplimer pair. Preliminary experiments were performed to document that the PCR was completed during the exponential phase of amplification and that the amplification was linear. The identity of the PCR products was confirmed by sequencing using ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit and ABI PRISM™ 310 (PE Applied Biosystems). The PCR products were separated on a 2% agarose gel and densitometric analysis of the resulting bands was performed with a Bio-Rad Gel Doc 1000® (Bio-Rad Laboratories). Results were expressed as a ratio of the optical density of the band of the PCR product of interest to that of β-actin.

2.6. Measurement of IL-2 and LBP concentration

Concentration of IL-2 was determined in the plasma and liver homogenates by ELISA using a commercially available kit following the manufacturer's instructions (R&D Systems Europe, Lille, France). LBP plasma concentration was measured by ELISA using a kit from HyCult Biotechnology b.v. (Uden, The Netherlands).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the StatView IV software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Results are expressed as mean ± S.E.M. Comparisons between two groups were performed with the Mann–Whitney test. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of supplementation with atRA on peripheral blood count and T lymphocytes subsets

In the peripheral blood of rats from all groups, monocytes and eosinophils populations corresponded to 1–4% of total leukocytes and atRA did not modify these percentages (data not shown). Supplementation with atRA increased the number of circulating leukocytes, neutrophils and lymphocytes in the peripheral blood compared with the control group (Fig. 1A). Since we previously reported that atRA supplementation in rats resulted in increased LPS-induced IFN-γ expression (Devaux et al., 2000), we sought to determine which cell population could be responsible for this effect. T lymphocytes and natural killer cells are the main producers of IFN-γ. We therefore performed flow cytometry experiments using markers specific for natural killer cells (CD161) and T lymphocytes (CD5). These experiments revealed that atRA increased the number of circulating $CD5^+$ cells from 3.4 ± 0.4 to $5.7 \pm 0.3 \times 10^9$ cells/L blood ($p = 0.0012$), but not the number of $CD5^-$ cells (Fig. 1B). Natural killer cells number was not modified by atRA (not shown). To more accurately characterize the lymphocyte population targeted by atRA, we performed double staining using markers specific for the following populations of T lymphocytes: Th lymphocytes ($CD5^+/CD4^+$), Tc/s lymphocytes ($CD5^+/CD8^+$) and $T_{TCR\gamma/\delta}$ lymphocytes ($CD5^+/TCR\gamma/\delta^+$). Supplementation with atRA increased the number of circulating Th lymphocytes ($CD5^+/CD4^+$) and Tc/s lymphocytes ($CD5^+/CD8^+$) but not T lymphocytes bearing the TCRγ/δ (Fig. 1C). Taken together, these results show that atRA induces a doubling of the number of circulating T cells and that these cells are mainly Th lymphocytes.

3.2. All-trans retinoic acid enhances IL-2 expression in the liver

T cells are activated by interaction between T cell receptor (TCR) and antigens displayed on the surface of antigen presenting cells (APCs), and this, together with a second costimulatory signal, triggers a cascade of events that culminates in IL-2 production which drives the cells to proliferate (Robey and Allison, 1995). We hypothesized that the effect of atRA on Th cells number was consecutive to an increase of IL-2 production by T cells. However, IL-2 concentration in the plasma was not modified by atRA supplementation (Fig. 2A). We reasoned that this discrepancy between enhanced T cells number and absence of increased plasma IL-2 concentration may result from a rapid consumption of IL-2 by T cells leading to T cell proliferation. We stained T cells with CD25, the IL-2 receptor α (IL-2Rα), because binding of IL-2 to its receptor induces increased IL-2Rα expression. Only a minority of T lymphocytes (between 2 and 3%) carried out CD25 (Fig. 2B), and this was not modified by atRA. To further our understanding of the relationship between atRA and IL-2, we next evaluated IL-2 mRNA expression in lymphoid and non-lymphoid organs by SQ RT-PCR. Although IL-2 mRNA was expressed in the spleen and in the kidney, this expression was not modified by atRA (Fig. 2C). Subsequently, we studied IL-2 mRNA expression in the liver since we previously reported that atRA increased the LPS-induced IFN-γ expression in this organ (Devaux et al., 2000). While below the detection threshold of the assay in control rats, IL-2 mRNA expression was readily detectable following atRA supplementation (Fig. 2C). This increase was accompanied by a three-fold up-regulation of IL-2 protein expression, as measured by ELISA of liver homogenates (Fig. 2D). These data suggest that the IL-2/IL-2 receptor pathway is not involved in atRA-mediated T cell proliferation in peripheral blood but IL-2 expression is up-regulated in the liver

Table 1
List of mRNAs of interest, expected size of amplified cDNAs, sequence of nucleotide primers and Genbank accession numbers

mRNA of interest and size of expected amplified cDNA	Primer sequences (sense and antisense 5′ → 3′)	Genbank accession number
β-Actin, 232 bp	GGACTTCGAGCAGGAGATGG GCACCGTGTTGGCGTAGAGG	U07786
IL-2, 456 bp	AGTCCTGCAAGCATGTACAG GCTTTGACAGATGGCTATCC	M22899
NOS2, 578 bp	GATCAATAACCTGAAGCCCG GCCCTTTTTTGCTCCATAGG	X76881
IFN-γ, 489 bp	AGCTCTGAGACAATGAGTG CCAGAATCAGCACCGACTC	AF010466
TLR4, 555 bp	CGCTTTCAGCTTTGCCTTCATTAC TGCTACTTCCTTGTGCCCTGTGAG	AF057025
CD14, 501 bp	TCACAATTCACTGCGGGATA GATCCCGAGGATCAAAATCA	AF087943
MD-2, 509 bp	TGGTCTTCCTGGCGAGTTT GCGGTGAATGATGGTGAAAT	AB018550
LBP, 500 bp	AAAGAGCAGGCACTGTGGTT CTCACTTGCACAGACCTCCA	NM017208

following atRA supplementation and can lead to enhanced IFN-γ production in this organ.

The main producers of IL-2 are T lymphocytes. We therefore hypothesized that the increased IL-2 expression in the liver of atRA-supplemented rats was consecutive to T cells infiltration in that organ. To test this, liver sections were subjected to haematoxylin and eosin staining. No infiltrated leukocytes were visible in liver sections from either control or atRA-supplemented animals (not shown). These data suggest that T cells are not responsible for enhanced IL-2 production in the liver of atRA-supplemented rats.

3.3. *All-trans retinoic acid modulates the expression of several components of the LPS recognition system in the liver*

Recognition of LPS by the innate immune system involves binding of LPS to the macrophage-expressed CD14 by LBP. Because LBP is produced by hepatocytes, a reservoir of Vitamin A in the liver, we hypothesized that atRA could modify LBP production. Supplementation with atRA induced a two-fold increase of LBP mRNA expression in the liver (Fig. 3). The LPS signaling pathway involves a complex formed by LPS, CD14, MD-2 and TLR4 together with other proteins, such as CD11c and CD18 integrins, CD55, HSP 70 and 90 among others (Triantafilou and Triantafilou, 2002). We investigated potential effects of atRA on some of the above-cited components of the LPS recognition system. Supplementation with atRA did not modify the expression of CD14, MD-2 and TLR4. While LBP and CD14 mRNA expression was up-regulated following LPS treatment, TLR4 mRNA expression was down-regulated. In addition, atRA increased the LPS-induced CD14 expression (Fig. 3). Therefore, these data show that supplementation with atRA induces a priming of the immune response to LPS through enhanced LBP expression.

3.4. *A RARα agonist but not a pan-RXRs agonist mimicks the effects of atRA on LBP expression*

We have previously reported that atRA enhances LPS-induced NOS2 activation through a RARα-dependent mechanism (Seguin-Devaux et al., 2002). Herein, we sought to investigate whether the atRA-mediated enhancement of LBP expression also involved a RARα-dependent pathway. To test this, rats were supplemented with the RARα agonist Ro 4060-55 or the pan-RXRs agonist Ro 2573-86 for 5 days. We observed that the RARα agonist but not the pan-RXRs agonist mimicked the effects of atRA on LBP mRNA expression in the liver (Fig. 4A) and LBP concentration in the plasma (Fig. 4B).

3.5. *The effects of atRA supplementation on the IFN-γ and NOS2 pathways depend on the stimulus*

The present data showing enhanced LBP expression following atRA supplementation suggest that the immune response to LPS may be stimulated by atRA and may explain the increased IFN-γ expression and NOS2 activation in LPS-treated rats (Devaux et al., 2000). To get some insight on the importance of the enhancement of LBP expression by atRA on host–pathogen interactions, atRA-supplemented rats were infected with the Gram-positive bacteria LM. Preliminary experiments were performed to document that the bacterial load was maximal in the liver and spleen 24 h following infection, and that this was correlated with IFN-γ and NOS2 expression in these organs (not shown). Thus, 24 h after infection with LM, the bacterial load was measured in the liver and spleen and was found similar between these two organs and between atRA-supplemented and vehicle-supplemented rats (Fig. 5A). In striking contrast with our previous results obtained when rats were challenged with LPS, NOS2 and IFN-γ mRNA expression in the liver and spleen were not significantly different between rats from atRA

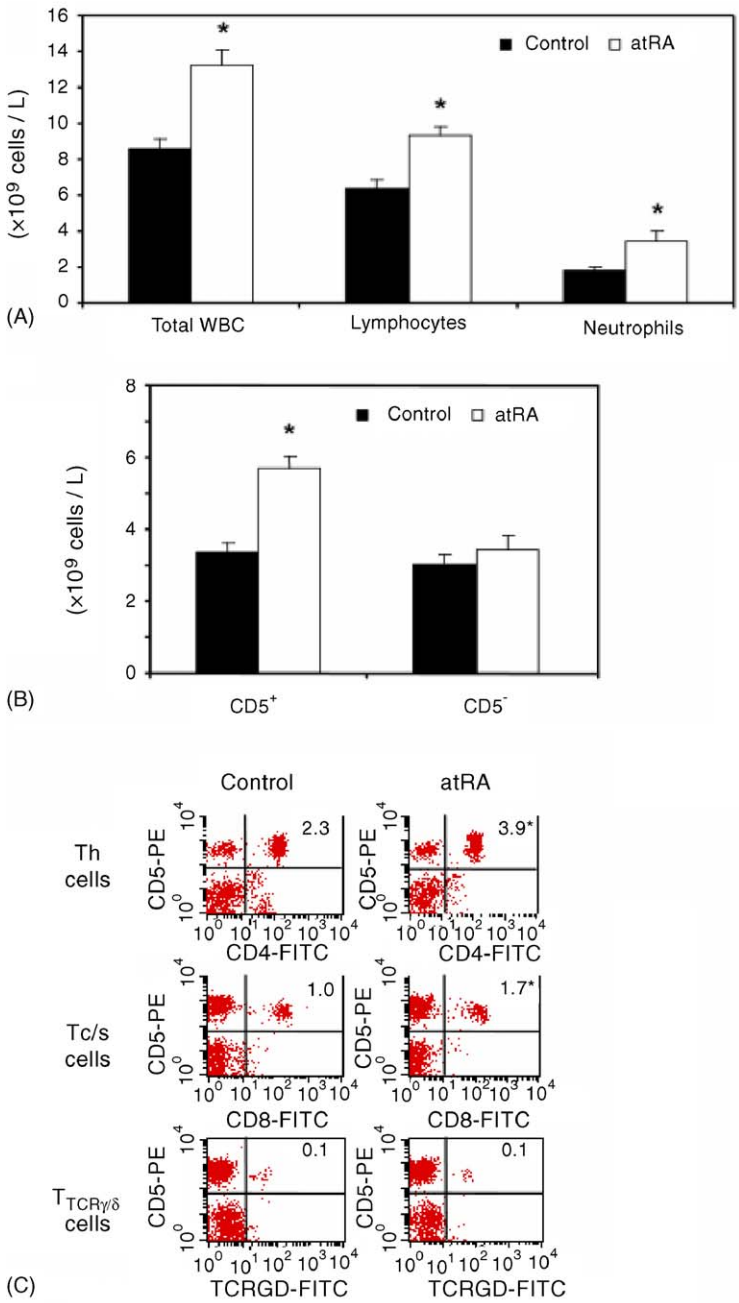


Fig. 1. Supplementation with atRA enhances peripheral blood T lymphocytes number. Rats received 10 mg/kg atRA (atRA) or vehicle (control) daily for 5 days. (A) Peripheral blood count revealed that atRA supplementation enhanced the numbers of circulating leukocytes, lymphocytes and neutrophils. (B) Flow cytometry analysis showed that atRA increased the number of circulating $CD5^+$ cells but not the number of $CD5^-$ cells. Values are mean ± S.E.M. (C) atRA increased the numbers of circulating Th ($CD5^+/CD4^+$) and Tc/s ($CD5^+/CD8^+$) lymphocytes. γ/δ T cells ($CD5^+/TCR\gamma/\delta^+$) number was not modified by atRA. Cell numbers ($\times 10^9$ cells/L blood) indicated on the upper right corner of each dot-plot were deduced from the peripheral blood count and the percentage of double positive cells. Results are expressed as means ± S.E.M. $^*p < 0.05$ vs. control.

and atRA + LM groups. Rather than an increase of NOS2 and IFN-γ expression, atRA had a tendency to decrease the LM-triggered activation of these two components of innate immunity (Fig. 5B and C). These data show that the immune response of the host after supplementation with atRA depends on the stimulus and suggest that the increased LBP expression can explain the deleterious effect of atRA supplementation in LPS-stimulated rats.

4. Discussion

The results of the present study show that supplementation with atRA in rats induces a “priming” of the host immune response characterized by increased number of circulating T lymphocytes and increased expression of one component of the host LPS recognition system, the LPS binding protein. The enhanced LBP expression is probably responsible for the

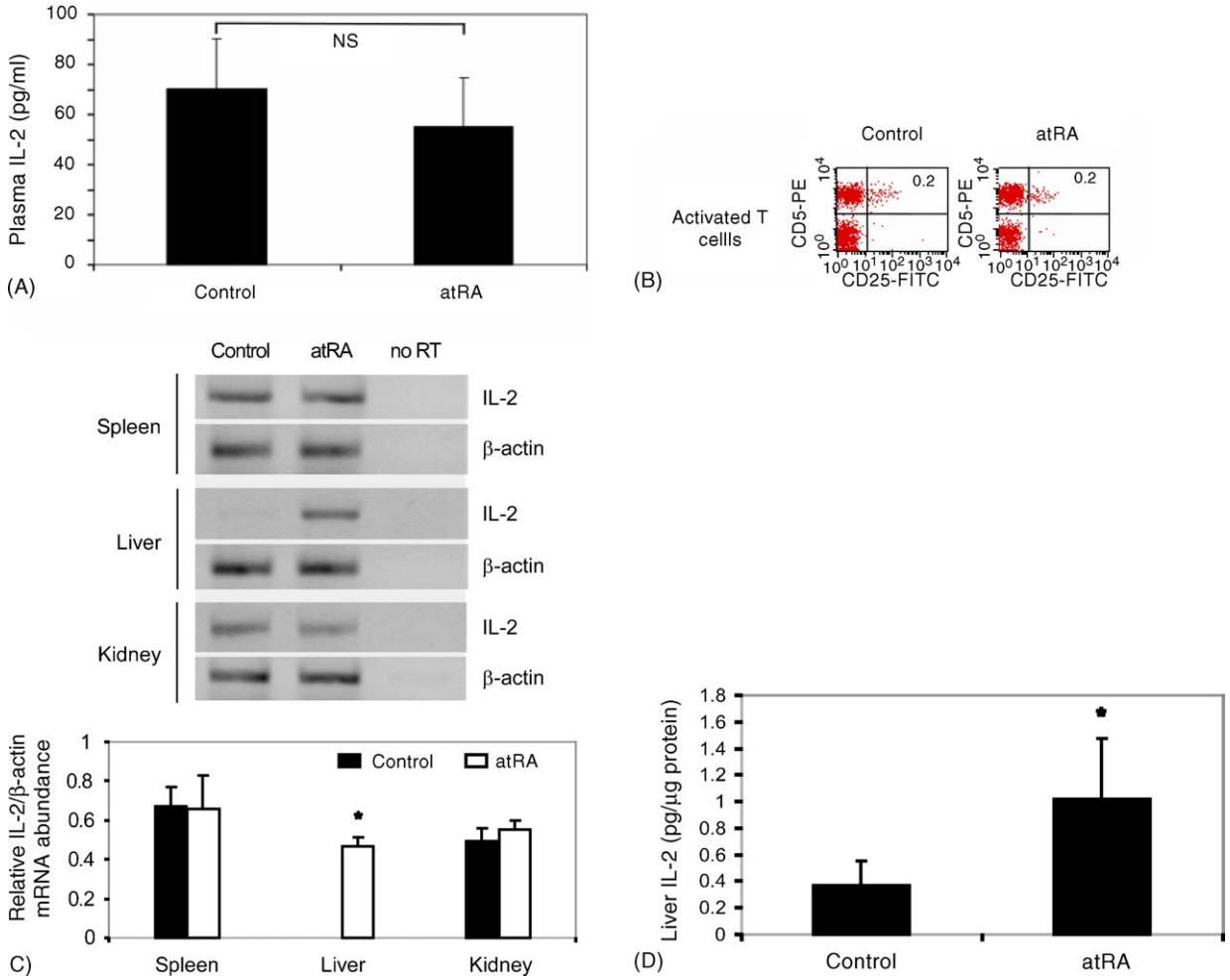


Fig. 2. Supplementation with atRA increases IL-2 production in the liver. Rats received 10 mg/kg atRA (atRA) or vehicle (control) daily for 5 days. (A) atRA did not significantly modify IL-2 plasma concentration. Plasma IL-2 concentration was measured by ELISA and is expressed as mean ± S.E.M. (pg/mL). NS: not significant. (B) The number of $CD5^+/CD25^+$ T cells in the peripheral blood was similar between control and atRA-supplemented rats. Cell numbers ($\times 10^9$ cells/L blood) indicated on the upper right corner of each dot-plot were deduced from the peripheral blood count and the percentage of double positive cells. (C) While undetectable under basal conditions, IL-2 mRNA expression in the liver was induced following atRA supplementation as determined by SQ RT-PCR. The absence of amplification product when reverse transcriptase RT was omitted (−RT) attested for the absence of genomic DNA contamination in the extracted RNA. A representative profile is shown (upper panel). Densitometric analysis was performed and IL-2 mRNA expression in the liver is expressed as the mean of relative IL-2/β-actin mRNA abundance ± S.E.M. (lower panel). ND: not detected. (D) IL-2 protein expression in the liver was also increased by atRA, as evaluated by ELISA. Results are mean ± S.E.M. (pg/µg protein). $^*p < 0.05$ vs. control.

divergent effects of atRA supplementation on NOS2 and IFN-γ pathways between LPS- and *L. monocytogenes*-challenged rats.

In preliminary experiments, we observed that a single dose of 10 mg/kg atRA did not show any effect on IL-2, LBP expression and circulating T cells number (not shown). This is in agreement with the study of van Pelt and de Rooij (1991) where replicate doses of atRA are necessary to have biological effects. Potential toxicity associated with the protocol of atRA supplementation used in this study, i.e. five daily injections of 10 mg/kg atRA, has been discussed elsewhere (Devaux et al., 2000). A toxic effect of atRA is unlikely since replicate doses of atRA had no effect on rat behavior, mortality or on visual inspection of the peritoneal cavity. In addition, there were no signs of hypervitaminosis A, such as weight loss, hair loss or skin scaling. These observations are in agreement with Look et al. (1995) who showed toxic effects of atRA in mice only after 7 days of supplementation with 100 mg/kg/day. The rat model of non-lethal endotoxemia has been previously characterized by members of our group (Boczkowski et al., 1996; Sambe et al., 1998). Preliminary experiments revealed that the dose of 4 mg/kg LPS and the time course of 6 h following LPS administration used in this study were a good compromise between a non-lethal protocol and a significant effect, particularly on LBP expression.

The first observation consistent with a priming of the host immune response concerns the increased number of circulating T lymphocytes. Our in vivo results suggest that supplementation with atRA is responsible for increased number of circulating T lymphocytes, mostly $CD4^+$ T lymphocytes. This result is in agreement with a previous study showing that repletion of Vitamin A-deficient rats with atRA is able to restore the number of blood lymphocytes (Zhao and Ross, 1995). Due to the known effects of Vitamin A on hematopoesis, atRA may have a

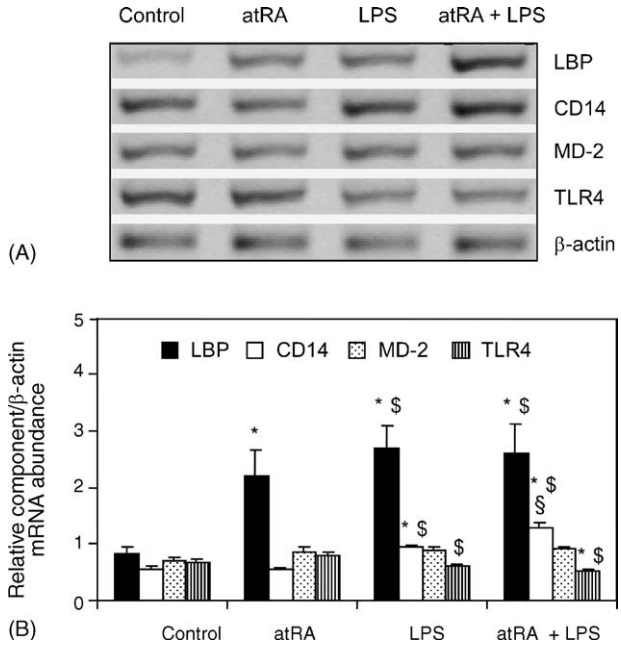


Fig. 3. Effects of atRA and LPS on mRNA expression of the different components of the LPS recognition system in the liver. Rats received 10 mg/kg atRA (atRA) or vehicle (control) daily for 5 days and were challenged with LPS (LPS) or vehicle (atRA + LPS). LBP, CD14, MD-2 and TLR4 mRNA expression was evaluated by SQ RT-PCR. atRA induced a two-fold increase of liver LBP mRNA expression and LPS enhanced LBP, CD14 and TLR4 expression. LPS challenge resulted in higher CD14 expression in atRA-supplemented than in non-supplemented rats. (A) A representative RT-PCR profile is shown. (B) Densitometric analysis. The optical density values of the PCR products of interest were divided by that of the β-actin product. Results are expressed as mean ± S.E.M. $^{*,\$,\S}p < 0.05$ vs. control, atRA and LPS groups, respectively.

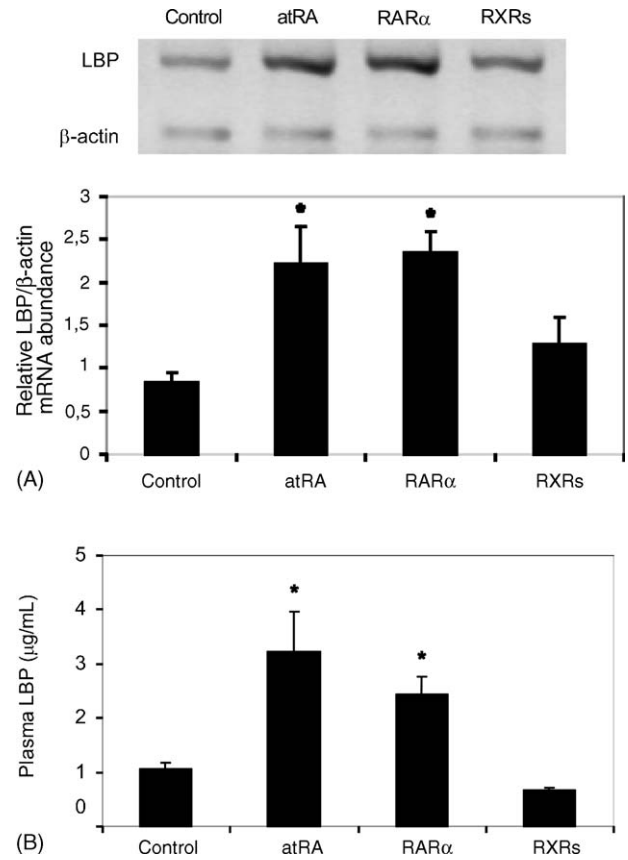


Fig. 4. Effects of atRA on LBP expression are mimicked by a RARα but not a pan-RXRs agonist. Rats were supplemented with 10 mg/kg of atRA, the RARα agonist Ro-4060-55 or the pan-RXRs agonist Ro 2573-86 for 5 days. (A) atRA and the RARα but not the pan-RXRs agonist induced a more than two-fold increase of liver LBP mRNA expression. A representative RT-PCR profile of rat liver LBP mRNA expression is shown (upper panel). The optical density value of the LBP PCR product was divided by that of the β-actin product (lower panel). (B) atRA and the RARα but not the pan-RXRs agonist induced a three-fold increase of plasma LBP concentration. LBP plasma concentration was determined by ELISA and is expressed in μg/mL. Results are mean ± S.E.M. $^{*}p < 0.05$ vs. control group.

non-specific effect on the entire population of leukocytes in this experimental model. However, a global effect of atRA on leukocytes is unlikely since the numbers of circulating B lymphocytes and monocytes were not modified by atRA supplementation.

To investigate the mechanism involved in the increased T lymphocytes number in the peripheral blood of atRA-supplemented rats, we investigated the IL-2 pathway. IL-2 concentration in the plasma was not different between control and atRA-supplemented rats. However, IL-2 secretion in T cells is difficult to measure due to rapid internalization of secreted IL-2 once it binds its receptor (Fujii et al., 1986). Therefore, we investigated CD25 expression, the IL-2Rα, by flow cytometry and we found that IL-2Rα expression was not modified by atRA supplementation. Assuming that IL-2Rα expression is increased consequently to IL-2 binding, our results indicate that the IL-2/IL-2Rα pathway is not involved in atRA-mediated T cell proliferation. Ertesvag et al. (2002) reported that the proliferative effect of atRA on cultured human T lymphocytes was associated with increased secretion of IL-2 but that IL-2 secretion by itself cannot fully explain the proliferative effects of atRA. In addition, these authors failed to detect any increase of IL-2Rα expression by atRA (Ertesvag et al., 2002). These in vitro results are consistent with our in vivo observations showing that atRA supplementation did not modify IL-2Rα expression.

The design of our experiments does not allow us to assert that the increased circulating T lymphocytes number is due to increased proliferation or inhibition of apoptosis. Both stimulation of the cell cycle (Ertesvag et al., 2002) and inhibition of apoptosis (Toth et al., 2001; Engedal et al., 2004) have been shown to mediate the proliferative effects of atRA on activated T lymphocytes in vitro. A correlation between the abilities of atRA to inhibit apoptosis of T lymphocytes and to increase IL-2 production has been reported (Engedal et al., 2004) and RARα binding by the synthetic agonist CD336 inhibited apoptosis induced by anti-CD3 or a specific Ag (Szegezdi et al., 2003).

The relationship between atRA and IL-2 has been investigated in several organs in the present study. We chose the spleen as a lymphoid organ and the kidney as a non-lymphoid organ. We also investigated IL-2 expression in the liver, since hepatocytes are known to be a reservoir of Vitamin A and because we previously observed that the main effect of atRA on IFN-γ expression was located in the liver (Devaux et al., 2000). Although, atRA enhanced IL-2 expression in the liver, atRA had no effect on IL-2 expression either in the spleen or in the kidney. In addition,

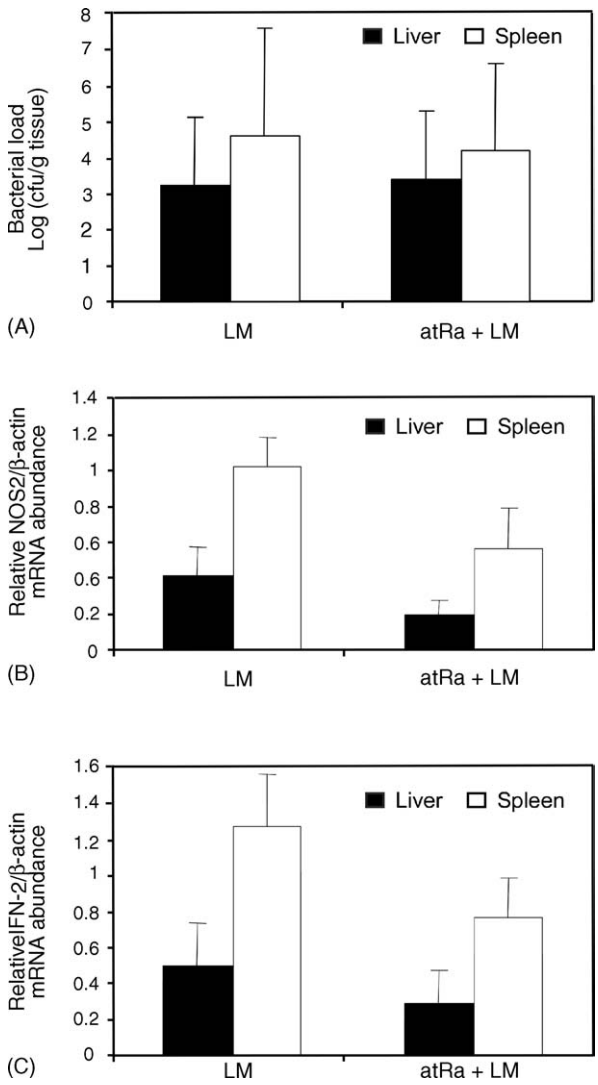


Fig. 5. atRA does not modulate IFN-γ and NOS2 expression in *Listeria monocytogenes*-infected rats. Rats were supplemented with 10 mg/kg atRA (atRA + LM group, $n = 5$) or vehicle (LM group, $n = 5$) daily for 5 days before infection with 10^9 CFU LM i.p., and were sacrificed 24 h after. (A) LM burden in the liver and spleen was similar between atRA-supplemented and vehicle-supplemented rats. Organs were weighed, homogenized and plated onto blood-gelose. CFU were counted after 24 h and bacterial load is expressed in log (CFU/g tissue). Although not statistically significantly ($p > 0.05$), atRA had a tendency to decrease NOS2 (B) and IFN-γ (C) mRNA expression in the liver and spleen. IFN-γ and NOS2 mRNA expression was estimated by SQ RT-PCR. Densitometric analysis was performed and the optical density values of the IFN-γ and NOS2 PCR products were divided by that of the β-actin product. Results are expressed as mean ± S.E.M.

liver sections from atRA-supplemented rats did not display any infiltrated cells, whereas examination of liver sections from LPS-treated rats revealed a strong infiltration of inflammatory cells. These results suggest that lymphocytes are not implicated in the induction of IL-2 expression by atRA in the liver, but rather a cell type specific to the liver. IL-2 expression has been shown in hepatocytes from transplanted rat liver and was correlated with IFN-γ expression (Lord et al., 2001). Together with the existing literature, our results suggest that hepatocytes may be responsible for IL-2 expression following atRA supplementation.

The second result consistent with a "priming" of the host immune response after atRA supplementation involves the increased liver mRNA and plasma concentration of LBP. The molecular mechanisms of LPS recognition by the host have been reviewed (Heine and Lien, 2003). In the plasma, LPS is recruited to soluble CD14 by LBP and the complex LPS/LBP binds the macrophage membrane-bound CD14 and the TLR4/MD-2 complex. This latter complex serves as the LPS signaling receptor which activates a cascade of molecular pathways leading to the activation of the transcription factor NF-κB regulating cytokine production by immune cells (Heine and Lien, 2003). Whereas CD14, MD-2 and TLR4 liver mRNA expression was not modified by atRA, a significant increase of LBP liver mRNA expression and plasma concentration was induced by atRA. The critical importance of LBP in the host LPS recognition system is documented. LBP knocked-out mice are unable to fight infection by LPS or Gram-negative bacteria (Jack et al., 1997) and LBP greatly enhances the ability of LPS to bind to CD14 (Wright et al., 1990). Thus, LBP can be considered as a limiting factor of the host response to LPS. Our results demonstrate for the first time that atRA supplementation in vivo increased LBP mRNA and protein expression. This effect is specific of LBP since the expression of the other components of LPS recognition system (CD14, MD-2 and TLR4) was not modified by atRA.

The mechanisms of the atRA-mediated increase in LBP mRNA and protein expression are not known. Retinoids, such as atRA, modulate gene transcription by direct binding to their cognate receptors and subsequently to RARE or by protein–protein interactions with different transcription factors, such as the AP-1 complex, SP-1, NF-κB and STAT3. The rat LBP promoter contains several putative consensus sequences, such as SP-1, NF-κB, GRE, STAT-3, IRF2, GATA, C/EBP, c-jun and c-myc (Kirschning et al., 1997). A regulatory element that was found to be crucial for transcription and activation of the LBP gene is the APRE/STAT3 binding site (Schumann et al., 1996). Interestingly, Yan et al. (2002) reported that STAT3 showed interactions with RAR enhanceosome proteins, such as RARα, in pulmonary epithelial cells. Using the AliBaba2 program for predicting transcription factor binding sites (http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html), we found that the LBP gene promoter has a putative RA response element (RARE). Our results suggest that atRA enhancement of LBP transcription involves RARα. However, whether RARα interacts with STAT3 or directly binds to a putative RARE in the LBP promoter in our experimental model is not known.

Consistently with a previous report (Payne et al., 1992), our results show that LPS increases CD14 mRNA expression in rat liver in vivo. Additionally, they suggest for the first time that, whereas atRA had no effect alone, it enhanced the LPS-induced increase of CD14 mRNA expression in the rat liver. There was no major effects of RA supplementation on MD-2, TLR2 and TLR4, whereas their mRNA expression before and after stimulation with LPS is consistent with previous studies (Akashi et al., 2000; Matsuguchi et al., 2000; Matsumura et al., 2000).

Using different pro-inflammatory/infectious stimuli, we show that the effect of atRA on LBP expression is critical, since it provides an explanation why atRA enhances NOS2 and IFN-

γ expression when the infectious stimulus is LPS, a component of the bacterial wall of Gram-negative bacteria (Devaux et al., 2000), but not when the stimulus is the Gram-positive bacteria LM. Also, our results provide an explanation for the opposite effects of atRA on NOS2 pathway in several monocellular cultures, such as smooth muscle cells, vascular endothelial cells or cardiac myocytes (Hirokawa et al., 1994; Mehta et al., 1994; Datta and Lianos, 1999; Datta et al., 2001; Motomura et al., 1997; Grosjean et al., 2001) and in vivo (Devaux et al., 2000; Seguin-Devaux et al., 2002). Effectively, we show here in vivo that atRA supplementation activates at least two other cell types, lymphocytes and hepatocytes. Importantly, our results showing enhanced production of LBP by atRA highlight the critical role of hepatocytes in the modulation of the immune response.

In conclusion, we show here that supplementation with atRA triggers a "priming" of the host immune system which affects cellular and non-cellular components of the immune responses. These results contribute to characterize the modulatory effects of Vitamin A on host–pathogen interactions and specifically the situations where Vitamin A supplementation can be beneficial for host survival.

Acknowledgements

C. Seguin-Devaux and Y. Devaux were supported by grants from the Association de Recherche et d'Information Scientifique en Cardiologie and the Association des Infirmiers et Médecins Anesthésistes-Réanimateurs.

References

Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., Miyake, K., 2000. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. J. Immunol. 164, 3471–3475.

Austenaa, L.M., Ross, A.C., 2001. Potentiation of interferon-gamma-stimulated nitric oxide production by retinoic acid in RAW 264.7 cells. J. Leukoc. Biol. 70, 121–129.

Barreto, M.L., Santos, L.M., Assis, A.M., Araújo, M.P., Farenzena, G.G., Santos, P.A., Fiaccone, R.L., 1994. Effect of Vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infections in young children in Brazil. Lancet 344, 228–231.

Binka, F.N., Ross, D.A., Morris, S.S., Kirkwood, B.R., Arthur, P., Dollimore, N., Gyapong, J.O., Smith, P.G., 1995. Vitamin A supplementation and childhood malaria in northern Ghana. Am. J. Clin. Nutr. 61, 853–859.

Blomhoff, H.K., Smeland, E.B., Erikstein, B., Rasmussen, A.M., Skrede, B., Skjonsberg, C., Blomhoff, R., 1992. Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. J. Biol. Chem. 267, 23988–23992.

Boczkowski, J., Lanone, S., Ungureanu-Longrois, D., Danialou, G., Fournier, T., Aubier, M., 1996. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. J. Clin. Invest. 98, 1550–1559.

Datta, P.K., Lianos, E.A., 1999. Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells. Kidney Int. 56, 486–493.

Datta, P.K., Reddy, R.S., Lianos, E.A., 2001. Effects of all-trans-retinoic acid (atRA) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and transforming growth factor beta-1 production in experimental anti-GBM antibody-mediated glomerulonephritis. Inflammation 25, 351–359.

Devaux, Y., Grosjean, S., Seguin, C., David, C., Dousset, B., Zannad, F., Meistelman, C., de Talancé, N., Mertes, P.M., Ungureanu-Longrois, D., 2000. Retinoic acid and host–pathogen interactions: effects on the inducible nitric oxide synthase in vivo. Am. J. Physiol. 279, E1045–E1053.

Devaux, Y., Seguin, C., Grosjean, S., de Talance, N., Schwartz, M., Burlet, A., Zannad, F., Meistelman, C., Mertes, P.M., Ungureanu-Longrois, D., 2001. Retinoic acid and lipopolysaccharide act synergistically to increase prostanoid concentrations in rats in vivo. J. Nutr. 131, 2628–2635.

Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L., Cossart, P., 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. Infect. Immun. 65, 1615–1625.

Engedal, N., Ertesvag, A., Blomhoff, H.K., 2004. Survival of activated human T lymphocytes is promoted by retinoic acid via induction of IL-2. Int. Immunol. 16, 443–453.

Erickson, K.L., Medina, E.A., Hubbard, N.E., 2000. Micronutrients and innate immunity. J. Infect. Dis. 182 (Suppl. 1), S5–S10.

Ertesvag, A., Engedal, N., Naderi, S., Blomhoff, H.K., 2002. Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. J. Immunol. 169, 5555–5563.

Fawzi, W.W., Mbise, R.L., Fataki, M.R., Herrera, M.G., Kawau, F., Hertzmark, E., Spiegelman, D., Ndossi, G., 1998. Vitamin A supplementation and severity of pneumonia in children admitted to the hospital in Dar es Salaam, Tanzania. Am. J. Clin. Nutr. 68, 187–192.

Fawzi, W.W., Msamanga, G.I., Wei, R., Spiegelman, D., Antelman, G., Villamor, E., Manji, K., Hunter, D., 2003. Effect of providing vitamin supplements to human immunodeficiency virus-infected, lactating mothers on the child's morbidity and $CD4^+$ cell counts. Clin. Infect. Dis. 36, 1053–1062.

Friedman, A., Halevy, O., Schrift, M., Arazi, Y., Sklan, D., 1993. Retinoic acid promotes proliferation and induces expression of retinoic acid receptor-alpha gene in murine T lymphocytes. Cell. Immunol. 152, 240–248.

Fujii, M., Sugamura, K., Sano, K., Nakai, M., Sugita, K., Hinuma, Y., 1986. High-affinity receptor-mediated internalization and degradation of interleukin 2 in human T cells. J. Exp. Med. 163, 550–562.

Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P., Dy, M., 2003. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. J. Exp. Med. 198, 623–634.

Grosjean, S., Devaux, Y., Seguin, C., Meistelman, C., Zannad, F., Mertes, P.M., Kelly, R.A., Ungureanu-Longrois, D., 2001. Retinoic acid attenuates inducible nitric oxide synthase (NOS2) activation in cultured rat cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 33, 933–945.

Heine, H., Lien, E., 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. Int. Arch. Allergy Immunol. 130, 180–192.

Hill, E.M., Bader, T., Nettesheim, P., Eling, T.E., 1996. Retinoid-induced differentiation regulates prostaglandin H synthase and cPLA2 expression in tracheal epithelium. Am. J. Physiol. 270, L854–L862.

Hirokawa, K.O., Shaughnessy, K.M., Ramrakha, P., Wilkins, M.R., 1994. Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. Br. J. Pharmacol. 113, 1448–1454.

Hope, W.C., Patel, B.J., Fiedler Nagy, C., Wittreich, B.H., 1990. Retinoids inhibit phospholipase A2 in human synovial fluid and arachidonic acid release from rat peritoneal macrophages. Inflammation 14, 543–559.

Iwata, M., Eshima, Y., Kagechika, H., 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. Int. Immunol. 15, 1017–1025.

Jack, R.S., Fan, X., Bernheiden, M., Rune, G., Ehlers, M., Weber, A., Kirsch, G., Mentel, R., Furll, B., Freudenberg, M., Schmitz, G., Stelter, F., Schutt, C., 1997. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. Nature 389, 742–745.

Kirschning, C.J., Au-Young, J., Lamping, N., Reuter, D., Pfeil, D., Seilhamer, J.J., Schumann, R.R., 1997. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. Genomics 46, 416–425.

Look, J., Landwehr, J., Bauer, F., Hoffmann, A.S., Bluethmann, H., LeMotte, P., 1995. Marked resistance of RAR gamma-deficient mice to the toxic effects of retinoic acid. Am. J. Physiol. 269, E91–E98.

Lord, R., Goto, S., Pan, T., Chiang, K., Chen, C., Sunagawa, M., 2001. Peak protein expression of IL-2 and IFN-gamma correlate with the peak rejection episode in a spontaneously tolerant model of rat liver transplantation. Cytokine 13, 155–161.

Matsuguchi, T., Musikacharoen, T., Ogawa, T., Yoshikai, Y., 2000. Gene expressions of toll-like receptor 2, but not toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. J. Immunol. 165, 5767–5772.

Matsumura, T., Ito, A., Takii, T., Hayashi, H., Onozaki, K., 2000. Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes. J. Interferon Cytokine Res. 20, 915–921.

Mehta, K., McQueen, T., Tucker, S., Pandita, R., Aggarwal, B.B., 1994. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. J. Leukoc. Biol. 55, 336–342.

Motomura, K., Sakai, H., Isobe, H., Nawata, H., 1997. Effects of retinoids on the production of tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells in vitro: evidence for participation of retinoid X receptor signalling pathway. Cell. Biochem. Funct. 15, 95–101.

Nacul, L.C., Arthur, P., Kirkwood, B.R., Morris, S.S., Cameiro, A.C., Benjamin, A.F., 1998. The impact of Vitamin A supplementation given during a pneumonia episode on the subsequent morbidity of children. Trop. Med. Int. Health 3, 661–666.

Nüsing, R.M., Mohr, S., Ullrich, V., 1995. Activin A and retinoic acid synergize in cyclooxygenase-1 and thromboxane synthase induction during differentiation of J774.1 macrophages. Eur. J. Biochem. 227, 130–136.

Payne, J.B., Nichols, F.C., Peluso, J.F., 1992. The effects of interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide on CD14 expression in human monocytes. J. Interferon Res. 12, 307–310.

Peress, N.S., Gruenewald, R., Carioto, L.A., 1985. Intra-ocular and CNS listeriosis following systemic infection in Wistar rats with chronic serum sickness. Exp. Eye Res. 41, 145–157.

Robey, E., Allison, J.P., 1995. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. Immunol. Today 16, 306–310.

Rosales, F.J., 2002. Vitamin A supplementation of Vitamin A deficient measles patients lowers the risk of measles-related pneumonia in zambian children. J. Nutr. 132, 3700–3703.

Sambe, A., Ungureanu-Longrois, D., Danialou, G., Lanone, S., Benessiano, J., Aubier, M., Boczkowski, J., 1998. Role of nitric oxide on diaphragmatic contractile failure in *Escherichia coli* endotoxemic rats. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 119, 167–175.

Schumann, R.R., Kirschning, C.J., Unbehaun, A., Aberle, H.P., Knope, H.P., Lamping, N., Ulevitch, R.J., Herrmann, F., 1996. The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. Mol. Cell. Biol. 16, 3490–3503.

Seguin-Devaux, C., Devaux, Y., Latger-Cannard, V., Grosjean, S., Rochette-Egly, C., Zannad, F., Meistelman, C., Mertes, P.M., Longrois, D., 2002. Enhancement of the inducible NO synthase activation by retinoic acid is mimicked by RARalpha agonist in vivo. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283, E525–E535.

Semba, R.D., 1998. The role of Vitamin A and related retinoids in immune function. Nutr. Rev. 56, S38–S48.

Semba, R.D., 1999. Vitamin A as “anti-infective” therapy, 1920–1940. J. Nutr. 129, 783–791.

Stansfield, S.K., Pierre Louis, M., Lerebours, G., Augustin, A., 1993. Vitamin A supplementation and increased prevalence of childhood diarrhoea and acute respiratory infections. Lancet 342, 578–582.

Stephensen, C.B., Franchi, L.M., Hernandez, H., Campos, M., Gilman, R.H., Alvarez, J.O., 1998. Adverse effects of high-dose Vitamin A supplements in children hospitalized with pneumonia. Pediatrics 101, E3.

Szegezdi, E., Kiss, I., Simon, A., Blasko, B., Reichert, U., Michel, S., Sandor, M., Fesus, L., Szondy, Z., 2003. Ligation of retinoic acid receptor alpha regulates negative selection of thymocytes by inhibiting both DNA binding of nur77 and synthesis of bim. J. Immunol. 170, 3577–3584.

Toth, R., Szegezdi, E., Reichert, U., Bernardon, J.M., Michel, S., Ancian, P., Kis-Toth, K., Macsari, Z., Fesus, L., Szondy, Z., 2001. Activation-induced apoptosis and cell surface expression of Fas (CD95) ligand are reciprocally regulated by retinoic acid receptor alpha and gamma and involve nur77 in T cells. Eur. J. Immunol. 31, 1382–1391.

Triantafilou, M., Triantafilou, K., 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. Trends Immunol. 23, 301–304.

van Pelt, A.M., de Rooij, D.G., 1991. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in Vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. Endocrinology 128, 697–704.

Villamor, E., Fawzi, W.W., 2000. Vitamin A supplementation: implications for morbidity and mortality in children. J. Infect. Dis. 182 (Suppl. 1), S122–S133.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 249, 1431–1433.

Yan, C., Naltner, A., Martin, M., Naltner, M., Fangman, J.M., Gurel, O., 2002. Transcriptional stimulation of the surfactant protein B gene by STAT3 in respiratory epithelial cells. J. Biol. Chem. 277, 10967–10972.

Zhao, Z., Ross, A.C., 1995. Retinoic acid repletion restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in Vitamin A-deficient rats. J. Nutr. 125, 2064–2073.

Extracellular Matrix Turnover and Inflammatory Markers Independently predict Functional Status and Outcome in Chronic Heart Failure

Collagen markers predict functional capacity

Anca Radauceanu[1,10], MD; Camille Ducki[1,10], PharmD; Jean-Marc Virion[1,10], MSc, Patrick Rossignol[1,7,8,9,10], MD, PhD; Ziad Mallat[2], MD, PhD; John McMurray[3], MD, FACC; Dirk J. Van Veldhuisen[4], MD, FACC; Luigi Tavazzi[5], MD, FACC; Douglas L. Mann, MD, FACC[6]; Josette Capiaumont-Vin[1,8,10], PhD; Minjiang Li[7,8], MD; Didier Hanriot[7,8], PhD; Faiez Zannad[1,7,8,9,10], MD, PhD

[1] INSERM, Centre d'Investigation Clinique 9501, Dommartin-lès-Toul, F-54201, France

[2] INSERM, U689, Paris, F-75010, France

[3] Western Infirmary, Cardiology, Dumbarton Road, Glasgow G11 6NT, Scotland, United Kingdom

[4] Department of Cardiology, Thoraxcenter, University Medical Centre Groningen, University of Groningen, The Netherlands

[5] Fondazione IRCCS, Policlinico san Matteo, Pavia, Italy

[6] Baylor College of Medicine, Texas Heart Institute/St. Luke's Episcopal, Houston, Texas

[7] INSERM, U684, Nancy, F-54500, France ;

[8] Université Henri Poincaré, Nancy, F-54000, France

[9] CHU de Nancy, Hôpital Brabois, Department of Cardiology, Nancy, F-54000, France

[10] CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, Nancy, F-54000, France

This study was funded by Wyeth as the sponsor of the RECOVER trial and by CIC-INSERM-

CHU of Nancy for the biomarker substudy.

Address for correspondence:

Professor Faiez ZANNAD

Centre d'Investigation Clinique (CIC) CHU-INSERM,

Hôpital Jeanne d'Arc, BP 90303, F-54201 DOMMARTIN-LES-TOUL, France

Telephone: + 33 (0)3 83 65 66 25

Fax: + 33 (0)3 83 65 66 19

Email: f.zannad@chu-nancy.fr

ABSTRACT

Background: Inflammatory pathways may promote extracellular matrix (ECM) remodeling, and chronic heart failure (CHF) progression. The relationship between markers of inflammation and of ECM remodeling, and their influence on functional status and outcomes has not been examined in a large cohort of CHF patients.

Methods and Results: We measured baseline blood serum collagen [amino-terminal propeptide of collagen III (PIIINP), metalloproteinase 1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)] and inflammatory [C-reactive protein (hsCRP), interleukin (IL)-18, IL-10] markers in 1009 patients enrolled in the Research into Etanercept CytOkine Antagonism in VentriculaR dysfunction (RECOVER) trial.

A positive correlation was detected between the two classes of markers (PIIINP to IL-18, MMP-1 and TIMP-1 to CRP, TIMP-1 to IL-18, MMP-1 to IL-10). In the adjusted multivariable model including all biomarkers, only PIIINP ($p = 0.03$) and MMP-1 ($p = 0.048$) were independent predictors of 6-minute walk test (6-MWT) whereas in another model including only inflammatory biomarkers, IL-18 was an independent predictor. PIIINP ($p=0.001$) was the only biomarker independently associated with death and CHF hospitalization.

Conclusion: The independent associations of PIIINP and MMP-1 with 6-MWT and PIIINP with CHF morbi-mortality suggest that excessive ECM turnover may be associated with functional capacity deterioration and poor outcome.

Keywords: collagen, remodeling, inflammation, exercise

Abbreviations List

ACE = angiotensin converting enzyme

ANOVA = analysis of variance

CRP = C-reactive protein

ECM = extracellular matrix

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

IL = interleukin

LVEF = left ventricular ejection fraction

MMP-1 = matrix metalloproteinase 1

PIIINP = amino-terminal propeptide of type III collagen

PWV = pulse wave velocity

RALES = Randomized Aldactone Evaluation Study

SD = standard deviation

TIMP-1 = tissue inhibitor of metalloproteinase-1

NYHA = New York Heart Association

RECOVER = Research into Etanercept CytOkine antagonism in VEntriculaR dysfunction trial

TNF-α = tumor necrosis factor - α

Introduction

Large community-based prospective studies have shown that systemic and cytokine-mediated markers of inflammation independently predict the development of heart failure [1-4]. Elevated circulating levels of proinflammatory cytokines have also been observed in patients with heart failure and are associated with worse outcome [5-7]. Several lines of evidence from experimental animal models and human failing hearts suggest that excessive activation of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-α (TNF-α) may promote adverse structural remodeling through alterations in extracellular matrix (ECM) [8-10] and may contribute to adverse left ventricular (LV) remodeling in pressure-overloaded heart [11]. ECM turnover is an essential process in cardiac remodelling, hypertensive cardiac hypertrophy, dilated cardiomyopathy and following myocardial infarction [12]. We and others have shown that serum markers of collagen turnover, in close interplay with a matrix metalloproteinases (MMPs)/tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) imbalance, are associated with heart failure presence and outcome [13-16].

The relationship between circulating cytokine-mediated markers of inflammation and ECM biomarkers have not been studied in patients with heart failure, and their relative contribution to heart failure severity and outcome is not known. To address these questions, we assessed pre-specified inflammatory and ECM remodeling markers in patients with moderate to severe chronic heart failure enrolled in the Research into Etanercept CytOkine antagonism in VEntriculaR dysfunction trial (RECOVER) [17]. Based on our previous data on heart fibrosis biomarkers, we focused on collagen type III turnover, which we monitored by measuring N terminal type III collagen peptide (PIIINP), and on MMP-1 and its main tissue inhibitor TIMP-1. Among the MMPs, MMP-1 has indeed the highest affinity for fibrillar collagen and preferentially

degrades collagen I and III [18]. Among the cytokine pathways involved in heart remodelling, based on our previous data, we focused on interleukine(IL)-18 [19]. Additionally, we selected IL-10, which we[20] and others [21] have shown to be a regulator of MMP/TIMP activities. The acute phase reactant C-reactive protein was chosen both as an indicator of the inflammation at the systemic level, and because of its relationships with the IL-6 and TNF pathways. Altered circulating levels of all of these ECM [13, 22] and inflammatory biomarkers [19 23-25] have been associated with heart failure in humans.The objective of this study was to evaluate the relationship between markers of inflammation and ECM remodeling, and their relative contribution to functional capacity and clinical outcomes.

Methods

Patient population

Patients enrolled in the RECOVER trial were included in this analysis. RECOVER was a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-center clinical trial of the TNF-α antagonist etanercept in patients with chronic heart failure [17]. Briefly, patients were included if they met the following eligibility criteria: age 18 to 85 years; New York Heart Association (NYHA) class II to IV for at least 2 months regardless of etiology; left ventricular ejection fraction (LVEF) ≤ 30%; treated with stable, optimal heart failure therapy for at least 3 months; and 6-minute walk distance of < 375 m (or < 425 m if hospitalized for heart failure within the previous 6 months). Patients were excluded from participation if they had severe infection within 1 month, surgically correctable causes of heart failure, other serious illness, acute myocardial infarction or hospitalization within 3 months, and recent (3 months) or planned surgery/coronary revascularization. The primary endpoint of RECOVER was the composite of all cause mortality or hospitalization for or with heart failure. The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The RECOVER protocol was reviewed and approved

by the ethics committee at each participating center, and all patients provided written informed consent. The trial was stopped early because of futility, and the results have been published [17].

Biochemical measurements

Collagen and inflammatory biomarkers were analyzed from stored serum samples. Blood samples were collected and processed immediately for all patients at baseline. Serum was separated by means of centrifugation at 3500 RPM for 10 minutes, and it was then frozen at -80°C until analysis.

Serum concentrations of PIIINP were measured with a radioimmunoassay from a commercially available kit provided by Pharmacia Upjohn Diagnostic (Guyancourt, France). The sensitivity (lower detection limit) was 0.2 μg/L. Manufacturer reference values ranged from 2.3 to 6.4 μg/L. Serum levels of MMP-1 and its natural inhibitor TIMP-1 were measured using established enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) from Amersham Biosciences (Orsay, France). The lower limit of detection for MMP-1 and TIMP-1 were 1.7 and 1.25 ng/mL, respectively. The manufacturer reference values were < 1.7 ng/mL for MMP-1, and 852 to 1417 ng/mL for TIMP-1 (serum sample diluted from 1/20 to 1/80 before assay).

CRP, IL-18, and IL-10 were measured using established analytical techniques. CRP was measured with a validated, high-sensitivity assay (hsCRP) from DPC (La Garenne Colombes, France). The lowest observed level was 0.02 mg/dL, and we assigned this value to those patients with undetectable levels. The mean level of hsCRP according to manufacturer assay characteristics was 0.14 mg/dL. IL-18 was measured by ELISA obtained from Immunotech (Beckman Coulter, Marseille, France). The detection limit was 12.5 pg/mL, and the manufacturer reference values ranged from 36.1 to 257.8 pg/mL. IL-10 was measured using commercial ELISA human kits available from R&D Systems Europe (Lille, France). The minimum detectable concentration of human IL-10 was 0.1 pg/mL. Manufacturer reference

values were < 5.16 pg/mL. All samples were analyzed in duplicate. The inter- and intra-assay variability ranged from 3% to 10% for all assays.

Data collection

Baseline variables were collected at the time of randomization, and they included socio-demographics (age, sex), clinical characteristics (etiology, NYHA class, 6-minute distance walked, body mass index, heart rate, LVEF, diastolic and systolic blood pressure), co-morbidities and risk factors (smoking, diabetes mellitus, hyperlipidemia, cancer, renal disease), laboratory measurements (serum sodium, serum creatinine), and concomitant medications (diuretics, ACE inhibitors, angiotensin II receptor blockers, β-blockers, spironolactone, digoxin, statins, antiplatelet agents, antiarrhythmics). Patients were followed to assess all-cause deaths and hospitalizations for or with heart failure.

Data analysis

Data were analyzed irrespective of treatment allocation (etanarcept or placebo) because etanercept had no effect on outcome. Moreover, variables included in analysis were collected at the time of randomization, before the administration of study treatments.

Baseline characteristics were analyzed descriptively. Continuous variables were reported as mean ± standard deviation (SD), and discrete variables were reported as a percentage of the total. The Pearson correlation coefficient was used to evaluate the correlations between serum levels of inflammatory markers (hsCRP, IL-18, and IL-10) and collagen ECM remodeling markers (PIIINP, MMP-1, and TIMP-1). Functional capacity was assessed using a 6-minute walking test. The relationship between functional capacity and serum levels of inflammatory and ECM remodeling markers was analyzed using multivariate models. IL-10 was not included in these models because of the small number of patients with IL-10 data. Two sets of models were investigated in a hierarchical fashion. First, a multivariable model adjusted for clinical predictors

and fitted with inflammatory markers was constructed. Significant clinical predictors of the 6-minute walk distance were selected by using ad hoc methods for univariate analysis (Pearson correlation, ANOVA, Chi-square test, t-test) and stepwise linear multiple regression including the following variables: age, sex, body mass index (< 25, 25-30, > 30), LVEF, NYHA class (III vs. II, IV vs. II), heart rate, diastolic blood pressure, systolic blood pressure, serum creatinine, serum sodium, idiopathic/ischemic/valvular/alcoholic etiology, hypertension, history of myocardial infarction, diabetes mellitus, hyperlipidemia, smoking, renal disease, cancer, duration of heart failure, diuretics, ACE inhibitor, angiotensin II receptor blockers, β-blockers, spironolactone, digitalis, antiplatelet therapy, antiarrhythmics. Second, a multivariable model was constructed with adjustment for clinical predictors and fitted with both inflammatory markers and markers of ECM remodelling. Baseline predictors of survival and heart failure hospitalization-free survival were estimated using Cox models. All clinical variables listed above were tested for their association with survival and heart failure hospitalization-free survival using univariate and stepwise multivariable Cox analysis. The independent prognostic significance of inflammatory and ECM remodeling markers were tested in a stepwise multivariable Cox analysis adjusted for significant clinical variables. All computations were carried out with SAS/stat software version 8.2 (Cary, NC, 1999-2001). Statistical significance was established at a level of $p < 0.05$.

Results

Biomarker data were available from 1009 patients, of which 62% had an ischemic etiology and 70% had NYHA class III heart failure symptoms (**Table 1).**

<u>Relationship Between Serum Levels of Collagen Turnover and Inflammatory Biomarkers</u>

PIIINP, MMP-1, TIMP-1, CRP, and IL-18 were measured in all patients. The anti-inflammatory cytokine IL-10 was measured in fewer patients (n=337) because of serum availability.

A positive correlation was observed between the individual synthesis and degradation collagen

biomarkers PIIINP, MMP-1, and TIMP-1, as well as between the inflammatory markers CRP and IL-18 (**Table 2**).

A trend toward a negative association between IL-10 and the pro-inflammatory markers CRP and IL-18 was observed. A significant positive correlation was detected between the two classes of markers, including PIIINP to IL-18, MMP-1 and TIMP-1 to CRP, TIMP-1 to IL-18, and MMP-1 to IL-10) (**Table 2**). Using the MMP-1/TIMP-1 ratio did not significantly alter these results (data not shown).

Relationship Between 6 Minute Walk Distance and Serological Markers

On univariate analysis, the 6-minute walk distance was inversely associated with collagen and inflammatory markers, except for IL-10 (**Table 3**). The relationship between 6 minute walk distance and PIIINP and MMP-1 is shown in **Figure 1**.

The multivariate analysis of a model fitted with clinical variables revealed that NYHA class, age, sex, heart rate (all $p < 0.0001$), ischemic etiology ($p = 0.01$) and β-blocker use ($p = 0.04$) were independent predictors of 6-minute walk distance. This model predicted 24% of the variability in the 6-minute walk test. After the multivariable model was adjusted for these predictors and fitted with the inflammatory biomarkers (**Table 4**), IL-18 was an independent predictor of 6-minute walk distance. CRP did not remain in the model. When the model was fitted with all inflammatory and collagen markers and adjusted for clinical predictors, only PIIINP and MMP-1 were associated with the 6-minute walk distance, and TIMP-1, CRP, and IL-18 dropped out of the model. This multivariable-adjusted model predicted 28% of the variability in the 6-minute walk distance. Using the MMP-1/TIMP-1 ratio instead of MMP-1 or TIMP-1 separately did not significantly alter these results (data not shown).

Survival analysis

The mean duration of follow-up was 16 ± 0.16 months. The cumulative 1-year survival

rate was 89% (95% CI, 86% - 92%), and event-free survival was 78% (95% CI, 74% - 82%) **(Figures 2 and 3).**

The univariate Cox analysis revealed that NYHA class, LVEF, age, heart failure duration, diastolic and systolic blood pressure, heart rate, 6 minute walk distance, serum sodium, serum creatinine, treatment with a β-blocker, spironolactone, antiarrhythmic agent, and digitalis were associated with event-free survival. PIIINP was the only biomarker that independently predicted all cause mortality and heart failure hospitalization when all biomarkers were entered in the adjusted stepwise multivariable Cox model (**Table 5**).

Discussion

This study confirms that PIIINP, a measure of collagen turnover, was an independent predictor of all cause mortality and heart failure hospitalization, even after adjusting for other clinical variables. Importantly, the ECM remodeling markers PIIINP and MMP-1 were both independent predictors of functional status as assessed by the 6-minute walk test. Although the inflammatory marker IL-18 was also a significant predictor of 6-minute walk distance, it was no longer significant when the collagen markers were added to the model. These results provide new evidence to support the concept that ECM remodeling is an important factor in heart failure pathophysiology, symptoms, and disease progression. Relationships were detected between inflammatory responses and ECM remodeling [10, 11, 26-28]. These data suggest that key interactions occur between these systems that may influence the heart failure syndrome. To the best of our knowledge, our data are the first in a large cohort of patients with heart failure to evaluate the interplay between inflammatory markers and markers of ECM remodelling.

<u>Markers of ECM remodelling: Serum PIIINP, MMP-1 and TIMP-1</u>

PIIINP serum levels are produced from the combined effects of collagen degradation and synthesis [29]. In experimental heart failure models, mechanical load increases collagen synthesis by fibroblasts, as indicated by an increase in procollagen type III mRNA [30]. Moreover, synthesis of collagen III has been shown to be predominantly enhanced in severe and/or decompensated cardiomyopathy of various origins [31, 32]. Although not exclusively derived from the myocardium, serum levels of PIIINP closely correlate with myocardial collagen types III and I in patients with chronic heart failure [31]. PIIINP is the most frequently used marker of ECM turnover [33]. Our group previously reported increased PIIINP levels in various conditions, such as heart failure, exercise ischemia, and high cardiovascular risk [13-15]. The prognostic value of serum PIIINP levels in patients with heart failure have been reported in previous studies [13, 31, 34, 35]. In the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES), a baseline PIIINP level > 3.85 μg/l was associated with poor outcome [13]. Serum PIIINP provides additional information about outcome, independently of other strong predictors such as left ventricular systolic function, neurohormonal activation, and exercise capacity, suggesting that PIIINP levels may reflect also the peripheral consequences of neurohormonal activation [34]. In the present study, which design did not include a control group, average serum PIIINP levels were 4.6 ± 2.3 μg/L. This value is similar to PIIINP concentrations reported in dilated cardiomyopathy [34], although other studies have observed slightly higher levels, up to 5 to 6 μg/L [13, 31]. In a recent study, we found that PIIINP serum levels were on average 3.5 ± 0.31 μg/L in normal adult subjects, 4.2 ± 0.25 μg/L in hypertensive patients with diabetes ($p < 0.05$ vs control), and 4.9 ± 2.5 μg/L in heart failure patients ($p < 0.05$ vs control, $p < 0.05$ vs hypertension with diabetes) [14]. This suggests that our results maybe extrapolated to other patient populations with heart failure.

In the present study, because of limitations of blood sample volume, we did not specifically assess collagen peptides associated either with collagen synthesis (such as Procollagen type I C-

terminal propeptide (PICP) and aminoterminal propeptides of type-I procollagen (PINP) [36], or a marker of collagen type I degradation such as Type I pyridinoline cross-linked C-terminal telopeptide (ICTP) [37]. However, the MMP-1 and TIMP-1 levels we measured are frequently used as biomarkers of collagen degradation [37], and we recently reported that MMP-1 levels are significantly lower in chronic heart failure and hypertensive diabetic patients than in controls [14]. Lopez *et al*. recently showed that increased serum MMP-1:TIMP-1 ratio is associated with left ventricular dilatation and systolic dysfunction in heart failure hypertensive patients [38]. In the present study, neither TIMP-1 nor the MMP-1:TIMP-1 ratio were significantly associated with outcomes, whereas MMP-1 was significantly associated with the 6 Minute Walk Distance, independently from PIIINP levels. Difference in the study populations (i.e hypertensive vs. mainly ischemic heart failures) may have contributed to these discrepancies.

Inflammatory Markers: Serum IL-18, IL-10 and CRP

IL-18 is a newly discovered proinflammatory cytokine member of the IL-1 family, and it is processed from an inactive form by caspase-1. IL-18 acts directly on inflammatory and cardiovascular cells, and it induces the production of interferon γ in mononuclear cells [39]. Elevated IL-18 plasma levels have been reported in patients with advanced heart failure of ischemic or nonischemic origin [40, 41]. Experimental and clinical data suggest that IL-18 activity may represent a potential pathway in the pathophysiology of heart failure [19]. In large prospective trials, IL-18 was independently associated with coronary events, and it predicted death from cardiovascular causes in patients with coronary artery disease [42, 43]. The human studies in heart failure that have focused on IL-18 included relatively few patients [19, 40, 41]. This study is the first to evaluate IL-18 specifically in relation to ECM remodeling markers.

Acute phase reactive protein CRP is an IL-6 –mediated inflammation marker which has been shown to independently predict heart failure prognosis and functional capacity [24, 25]. Among patients with CHF who underwent cardiac resynchronization therapy (CRT) [44], only those patients with reversal remodeling and no clinical events exhibited a reduction in CRP and IL-6 levels. Thus, the reverse remodeling induced by CRT might contribute to the reduction of inflammatory status.

Il-10 is an anti-inflammatory cytokine that suppresses the inflammatory response by inhibition of transcription factor NF-kB, thereby acting as a down-regulator of cell-mediated immune responses [23]. In experimental studies, IL-10 was shown to modulate expression of metalloproteinases and their inhibitors [21].

Potential Mechanisms for the Influence of Inflammation and Collagen Deposition on Functional Status and Outcome

These findings suggest that cardiac fibrotic remodeling may represent the local expression and the common pathway of systemic neurohormonal and inflammatory activation. Cardiac fibrosis is associated with impaired functional status and poor outcomes. Collagen deposition may affect functional capacity in different ways. Cardiac fibrosis is a major determinant of diastolic dysfunction [34, 35, 45] and pumping capacity and it may provide the structural substrate for arrhythmogenecity, thus potentially contributing to the progression of congestive heart failure (CHF) and to sudden death. Additionally, in a recent study, serum PIIINP was independently related to aortic stiffness as assessed by pulse wave velocity, suggesting that increased fibrosis might involve not only the left ventricle but also the aorta independently of age or underlying atherosclerosis [46].

Limitations

Serial measurements of the tested variables were not collected. Because of its observational, cross-sectional design, these findings are hypothesis-generating.

The anti-inflammatory cytokine IL-10 could not be included in multivariate models, since only one third of the study population had measurements for this marker. Some samples were lost, therefore only 1009 patients among the 1123 enrolled in RECOVER were included in this study.

Measurements of other more established markers of heart failure (norepinephrine, BNP, ANP) were not available. Further studies are needed to develop optimal multi-marker prognostic models with potential use for the stratification of patients with CHF.

Conclusions

Biomarkers of collagen synthesis and degradation were independent predictors of functional status in patients with moderate to severe heart failure. In addition, PIIINP was a significant predictor of death and heart failure hospitalization in this large patient cohort. Importantly, PIIINP predicted functional capacity and outcome when all inflammatory and remodeling markers were simultaneously considered. These results suggest that cardiac fibrotic remodeling may represent an "intermediate phenotype" reflecting both inflammatory and neurohormonal activation. Serum PIIINP may be a "global surrogate marker" for worsening heart failure. To test this hypothesis, specific studies are needed to evaluate serum PIIINP changes according to clinical severity and in response to cardioreparative and antifibrotic therapies.

Acknowledgements

We would like to thank all the patients and all the investigators of the RECOVER trial, who made possible this work by providing the present clinical data. Many thanks to the company Wyeth Research who provided us with samples and database, and to ARISC (Association de Recherche et Information Scientifique en Cardiologie, Département de Cardiologie, CHU Nancy, France) for grant and assistance.

REFERENCES

1. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K,et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation.* 2003;108(19):2317-2322.
2. Ingelsson E, Arnlov J, Sundstrom J, Lind L. Inflammation, as measured by the erythrocyte sedimentation rate, is an independent predictor for the development of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(11):1802-1806.
3. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res.* 2002;91(11):988-998.
4. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ,et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2003;107(11):1486-1491.
5. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2000;102(25):3060-3067.
6. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201-1206.
7. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D,et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(2):391-398.
8. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, et al The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):537-544.
9. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:81-101.
10. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation.* 2001;104(7):826-831.
11. Sun M, Chen M, Dawood F, Zurawska U, Li JY, Parker T,et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation.* 2007;115(11):1398-1407.
12. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-262.
13. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation.* 2000;102(22):2700-2706.
14. Alla F, Kearney-Schwartz A, Radauceanu A, Das Dores S, Dousset B, Zannad F. Early changes in serum markers of cardiac extra-cellular matrix turnover in patients with uncomplicated hypertension and type II diabetes. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(2):147-153.
15. Radauceanu A, Moulin F, Djaballah W, Marie PY, Alla F, Dousset B, et al. Residual stress ischaemia is associated with blood markers of myocardial structural remodelling. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(4):370-376.

16. Jordan A, Roldan V, Garcia M, Monmeneu J, de Burgos FG, Lip GY, et al. Matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1, in systolic heart failure: relation to functional data and prognosis. *J Intern Med.* 2007;262(3):385-392.

17. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, et al. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation.* 2004;109(13):1594-1602.

18. D'Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(3):97-101.

19. Mallat Z, Heymes C, Corbaz A, Logeart D, Alouani S, Cohen-Solal A, et al. Evidence for altered interleukin 18 (IL)-18 pathway in human heart failure. *FASEB J.* 2004;18(14):1752-1754.

20. Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A, Levy BI. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res.* 2001;89(3):259-264.

21. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2304-2310.

22. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. MR. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation.* 2006;113(17):2089-2096.

23. Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A, Daniel WG, Garlichs CD. Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure. *Clin Sci (Lond).* 2003;105(1):45-50.

24. Yin WH, Chen JW, Jen HL, Chiang MC, Huang WP, Feng AN, et al. Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J.* 2004;147(5):931-938.

25. Windram JD, Loh PH, Rigby AS, Hanning I, Clark AL, Cleland JG. Relationship of high-sensitivity C-reactive protein to prognosis and other prognostic markers in outpatients with heart failure. *Am Heart J.* 2007;153(6):1048-1055.

26. Diwan A, Dibbs Z, Nemoto S, DeFreitas G, Carabello BA, Sivasubramanian N, et al. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation.* 2004;109(2):262-268.

27. Trescher K, Bernecker O, Fellner B, Gyongyosi M, Schafer R, Aharinejad S, et al. Inflammation and postinfarct remodeling: overexpression of IkappaB prevents ventricular dilation via increasing TIMP levels. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):746-754.

28. Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):61-66.

29. Jensen LT, Host NB. Collagen: scaffold for repair or execution. *Cardiovasc Res.* 1997;33(3):535-539.

30. Chapman D, Weber KT, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res.* 1990;67(4):787-794.

31. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated

cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol.* 1995;75(14):913-918.

32. Mukherjee D, Sen S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1991;88(4):1141-1146.

33. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003;3(1):1-30.

34. Cicoira M, Rossi A, Bonapace S, Zanolla L, Golia G, Franceschini L, et al. Independent and additional prognostic value of aminoterminal propeptide of type III procollagen circulating levels in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 2004;10(5):403-411.

35. Rossi A, Cicoira M, Golia G, Zanolla L, Franceschini L, Marino P, et al. Amino-terminal propeptide of type III procollagen is associated with restrictive mitral filling pattern in patients with dilated cardiomyopathy: a possible link between diastolic dysfunction and prognosis. *Heart.* 2004;90(6):650-654.

36. Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Sanchez E, Larman M, Martinez Ubago JL, et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation.* 2004;110(10):1263-1268.

37. Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, et al. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation.* 1998;98(6):535-540.

38. Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R, Larman M, Diez J. Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(1):89-96.

39. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(3):483-486.

40. Naito Y, Tsujino T, Fujioka Y, Ohyanagi M, Okamura H, Iwasaki T. Increased circulating interleukin-18 in patients with congestive heart failure. *Heart.* 2002;88(3):296-297.

41. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Inomata T, Machida Y, Osada K, Izumi T. Circulating levels of interleukin 18 reflect etiologies of heart failure: Th1/Th2 cytokine imbalance exaggerates the pathophysiology of advanced heart failure. *J Card Fail.* 2002;8(1):21-27.

42. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, et al. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation.* 2002;106(1):24-30.

43. Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, et al. Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation.* 2003;108(20):2453-2459.

44. Michelucci A, Ricciardi G, Sofi F, Gori AM, Pirolo F, Pieragnoli P, et al. Relation of inflammatory status to major adverse cardiac events and reverse remodeling in patients undergoing cardiac resynchronization therapy. *J Card Fail.* 2007;13(3):207-210.

45. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation.* 2007;115(7):888-895.

46. Bonapace S, Rossi A, Cicoira M, Franceschini L, Golia G, Zanolla L, et al. Aortic distensibility independently affects exercise tolerance in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2003;107(12):1603-1608.

Table 1. Baseline characteristics

Baseline characteristics	**RECOVER study patients (n = 1009)**
Age, y	64.5 ± 10.5
Male, %	77
History of heart failure, y	4.3 ± 4.4
Etiology, % Ischemic	62
Idiopathic	25
LVEF, %	24 ± 5
Six-minute walk distance, m	283 ± 77
NYHA class, % II	26
III	71
IV	3
SBP, mmHg	123 ± 18
DBP, mmHg	75 ± 10
Heart rate, bpm	74 ± 12
BMI, Kg/m^2	27 ± 4.7
Serum sodium, mmol/l	140 ± 3
Serum creatinine, μmol/l	106.2 ± 36
Comorbidity, %	

Hypertension	45
Diabetes mellitus	28
Hyperlipidemia	45
Treatment, %	
Diuretic	99
ACE inhibitor	89
β-blocker	64
Spironolactone	36
Angiotensin II receptor blocker	13
Digoxin	54
Statins	33
Antiplatelet agent	81

Values are expressed as mean ± SD or percentages

Table 2. Correlation Between Baseline Circulating Levels of Biomarkers

	Serum levels	**PIIINP**	**MMP-1**	**TIMP-1**	**CRP**	**IL-18**
		Pearson Correlation Coefficient				
PIIINP, μg/l	4.61 ± 2.26	-				
MMP-1, ng/ml	9.78 ± 7.07	0.10**	-			
TIMP-1, ng/ml	1478.4 ± 556.1	0.32**	0.09**	-		
CRP, mg/dl	0.68 ±0.74	0.05	0.13**	0.16**	-	
IL-18, pg/ml	442.14 ± 204.62	0.13**	0.02	0.15**	0.07*	-
†IL-10, pg/ml	1.93 ± 2.05	0.08	0.13*	0.02	- 0.06	-0.02

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

†IL-10 was measured in 337 patients, all other biomarkers were measured in 1009

Table 3. Univariate Clinical and Serological Predictors of 6 Minute Walk Distance

Clinical predictors	**r**	**p value**
Age, y	-0.20	0.51
BMI, Kg/m^2	0.002	0.93
LVEF, %	0.03	0.29
Heart rate, bpm	-0.13	< 0.0001
SBP, mmHg	0.015	0.64
DBP, mmHg	0.02	0.58
Creatinine, μmol/l	-0.02	0.51
Sodium, mmol/l	0.07	0.02
Serological marker		
PIIINP	-0.12	0.0003
MMP-1	-0.14	< 0.0001
TIMP-1	-0.12	0.0003
CRP	-0.12	< 0.0001
IL-18	-0.08	0.01
IL-10	0.02	0.66

Table 4. Multivariate Predictors of 6 Minute Walk Distance: (A) Inflammatory Markers, (B) Inflammatory and Collagen Markers

(A) Clinically-adjusted model with inflammatory markers	**Multivariable β-coefficient**	**P value**
Age	- 0.92	< 0.0001
Sex, men vs. women	35.82	< 0.0001
NYHA class, III vs II	-42.40	< 0.0001
IV vs II	- 132.61	< 0.0001
Ischemic heart failure	- 9.66	0.04
Baseline heart rate	- 0.75	< 0.0001
IL-18	- 0.02	0.04
(B) Clinically-adjusted model with inflammatory and collagen markers		
Age	- 0.69	0.006
Sex, men vs. women	35.04	< 0.0001
NYHA class, III vs II	-54.36	< 0.0001
IV vs II	- 148.05	< 0.0001
Ischemic heart failure	- 13.40	0.012
Baseline heart rate	- 0.55	0.009
PIIINP	- 2.23	0.033
MMP-1	- 0.70	0.048

Table 5. Independent Predictors of Heart Failure Hospitalization and Death

	Heart failure hospitalization		**Death**	
	HR (95%CI)	**P value**	**HR (95%CI)**	**P value**
Age, y	1.02 (1-1.04)	0.03	-	
BMI, Kg/m^2	-		0.91 (0.85-0.98)	0.007
NYHA, III vs II	1.67 (0.88-3.16)	0.1	1.27 (0.49-3.29)	0.6
IV vs II	5.17 (2.09-12.82)	0.0004	5.12 (1.42-18.51)	0.01
SBP, mmHg	0.98 (0.96-0.99)	< 0.0001	-	
DBP, mmHg	-		0.95 (0.92-0.98)	0.001
Heart rate, bpm	1.02 (1.01-1.03)	0.008	1.05 (1.02-1.07)	0.0001
6-MW distance, m	0.99 (0.99-1)	0.08	0.99 (0.99-1)	0.10
Digitalis	2.15 (1.42-3.28)	0.0003	1.55 (0.80-2.99)	0.2
Antiarrhythmic agent	1.84 (1.18-2.86)	0.007	-	
PIIINP, μg/l	1.14 (1.05-1.23)	0.001	1.18 (1.07-1.30)	0.001

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Six-minute distance walked across tertiles of baseline collagen synthesis marker PIIINP (top) and degradation marker MMP-1 (bottom). P (trend) < 0.001.

Figure 2. Kaplan-Meier hospitalization-free survival curve according to tertiles of PIIINP baseline levels (µg/l).

Figure 3. Kaplan-Meier heart failure survival curve according to tertiles of PIIINP baseline levels (µg/l).

Figure 1

Figure 1

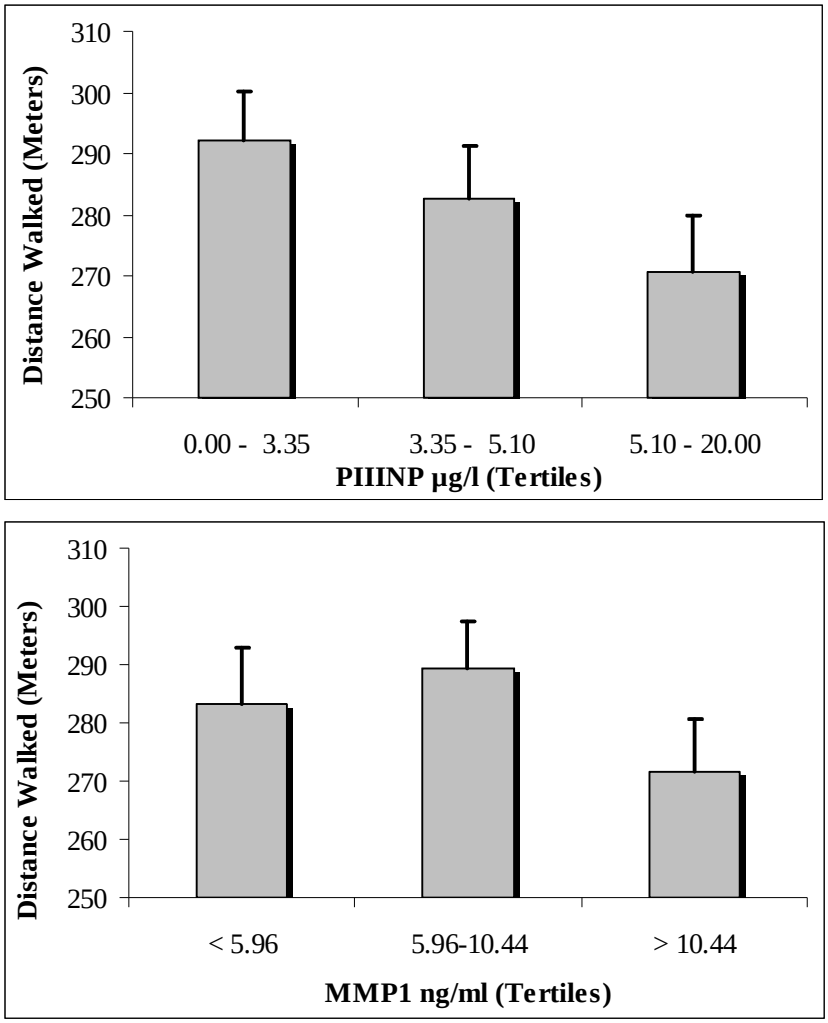


Figure 2

Figure 2

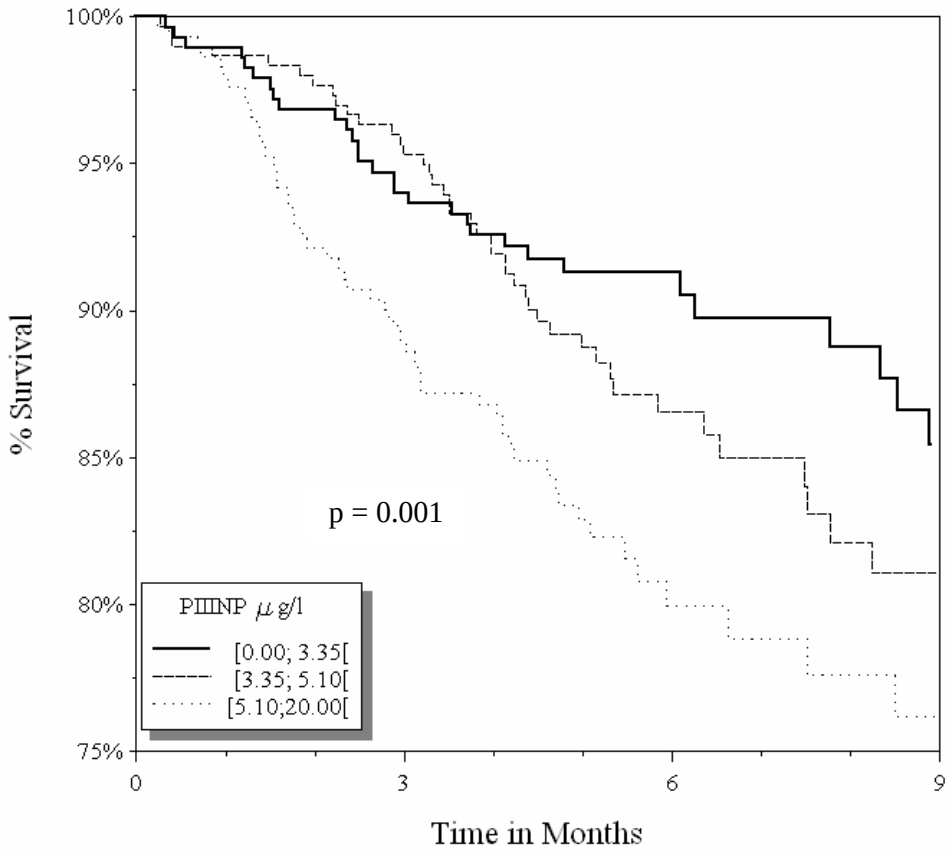
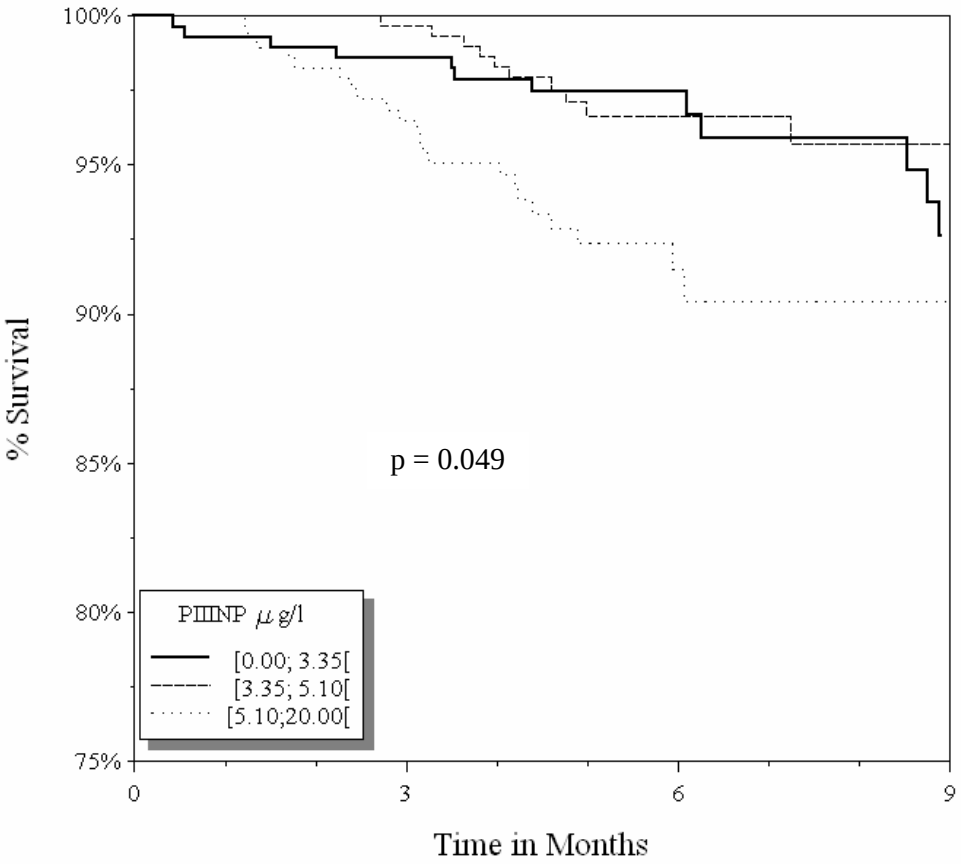


Figure 3

Figure 3



RESUME DE LA THESE

NOM : HANRIOT

PRENOM : DIDIER

TITRE DE LA THESE :

EFFETS DE LA PROTEINE C REACTIVE SUR LA BIOLOGIE DU MONOCYTE HUMAIN DANS L'ATHEROSCLEROSE A TRAVERS UNE ANALYSE DU TRANSCRIPTOME

DIRECTEUR DE THESE : DAN LONGROIS

But : L'inflammation joue un rôle important dans la pathophysiologie de l'athérosclérose. Des marqueurs non spécifiques de l'inflammation tels que la Protéine C-Réactive (CRP) sont associés à un risque élevé de développer l'athérosclérose ou des complications aigues. Par sa capacité à se différencier en macrophage et à interagir avec différents types cellulaires, le monocyte joue un rôle essentiel dans l'athérogenèse. Afin de mieux caractériser le lien causal entre CRP et athérosclérose, nous avons étudié les effets de la CRP sur plusieurs aspects de la biologie du monocyte humain. **Matériel et Méthodes :** Les monocytes isolés du sang périphérique d'hommes jeunes (n=9) et de femmes pré ménopausées (n=9) en bonne santé ont été purifiés par gradient de Ficoll et sélection positive CD14, mis en culture pendant une nuit puis exposés à la CRP purifiée (25 µg/ml) pendant 12 ou 24 h. Une puce à oligonucléotides réalisée à façon par nos soins et contenant 250 gènes a permis d'effectuer le profilage de l'expression génique des monocytes traités ou non par la CRP. Les variations d'expression de certains gènes ont été confirmées par PCR quantitative et western blot. **Résultats et Discussion :** Nos résultats montrent que la CRP augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6, et des chimiokines IL-8 et Gro-beta. En revanche, la CRP diminue l'expression des MIP-1alpha, MIP-1beta et de l'alpha 2 macroglobuline. De plus, nous rapportons ici pour la première fois que la CRP augmente l'expression génique du récepteur nucléaire Liver X Receptor (LXR) alpha, facteur de transcription dont le rôle dans l'athérosclérose n'a été que récemment suggéré. Par western blot, nous montrons que l'augmentation d'expression du LXR alpha est suivie de sa translocation nucléaire. En conclusion, cette thèse montre que la CRP exerce à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires sur les monocytes humains *ex-vivo*. Nos résultats sont en faveur d'un rôle anti-athérogénique de la CRP de part son effet précédemment inconnu sur le LXR alpha.

MOTS CLES : ATHEOSCLEROSE - CRP – LXR ALPHA - MONOCYTE – PUCES A OLIGONUCLEOTIDES

DATE DE SOUTENANCE : 07 AVRIL 2008

PUBLICATIONS :

- **Publication n°1:**

C-Reactive Protein induces pro- and anti-inflammatory effects, including activation of the liver X Receptor, on human monocytes.

Didier HANRIOT, Gaëlle BELLO, Armelle ROPARS, Carole SEGUIN-DEVAUX, Gaël POITEVIN, Sandrine GROSJEAN, Véronique LATGER-CANNARD, Yvan DEVAUX, Faiez ZANNAD, Véronique REGNAULT, Patrick LACOLLEY, Paul-Michel MERTES, Ketsia HESS and Dan LONGROIS.

Acceptée dans "Thrombosis and Haemostasis" (Thromb Haemost 2008; 99: 558–569)

A fait l'objet d'un Focus Editorial (Thromb Haemost 2008; 99: 461–462)

- **Publication n°2:**

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

Gaëlle BELLO and Frédéric CAILOTTO, Didier HANRIOT, Marie-Nathalie KOLOPP-SARDA,Véronique LATGER-CANNARD, Ketsia HESS, Faiez ZANNAD, Dan LONGROIS and Armelle ROPARS.

Acceptée dans "Atherosclerosis" (2008).

- **Publication n°3:**

Retinoic acid amplifies the host immune response to LPS through increased T lymphocytes number and LPS binding protein expression.

Carole SEGUIN-DEVAUX, Didier HANRIOT, Michèle DAILLOUX, Véronique LATGER-CANNARD, Faiez ZANNAD, Paul-Michel MERTES, Dan LONGROIS, Yvan DEVAUX.

Acceptée dans "Molecular and Cellular Endocrinology"

(Molecular and Cellular Endocrinology 245 (2005) 67–76)

- **Publication n°4:**

Extracellular Matrix Turnover and Inflammatory Markers Independently predict Functional Status and Outcome in Chronic Heart Failure. Collagen markers predict functional capacity.

Anca RADAUCEANU, Camille DUCKI, Jean-Marc VIRION, Ziad MALLAT, John McMURRAY, Dirk van VELDHUISEN, Luigi TAVAZZI, Josette CAPIAUMONT-VIN, Minjiang LI, Didier HANRIOT, Faiez ZANNAD.

Soumise à « Journal of Cardiac Failure ».

But : L'inflammation joue un rôle important dans la pathophysiologie de l'athérosclérose. Des marqueurs non spécifiques de l'inflammation tels que la Protéine C-Réactive (CRP) sont associés à un risque élevé de développer l'athérosclérose ou des complications aigues. Par sa capacité à se différencier en macrophage et à interagir avec différents types cellulaires, le monocyte joue un rôle essentiel dans l'athérogenèse. Afin de mieux caractériser le lien causal entre CRP et athérosclérose, nous avons étudié les effets de la CRP sur plusieurs aspects de la biologie du monocyte humain. **Matériel et Méthodes :** Les monocytes isolés du sang périphérique d'hommes jeunes (n=9) et de femmes pré ménopausées (n=9) en bonne santé ont été purifiés par gradient de Ficoll et sélection positive CD14, mis en culture pendant une nuit puis exposés à la CRP purifiée (25 µg/ml) pendant 12 ou 24 h. Une puce à oligonucléotides réalisée à façon par nos soins et contenant 250 gènes a permis d'effectuer le profilage de l'expression génique des monocytes traités ou non par la CRP. Les variations d'expression de certains gènes ont été confirmées par PCR quantitative et western blot. **Résultats et Discussion :** Nos résultats montrent que la CRP augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6, et des chimiokines IL-8 et Gro-beta. En revanche, la CRP diminue l'expression des MIP-1alpha, MIP-1beta et de l'alpha 2 macroglobuline. De plus, nous rapportons ici pour la première fois que la CRP augmente l'expression génique du récepteur nucléaire Liver X Receptor (LXR) alpha, facteur de transcription dont le rôle dans l'athérosclérose n'a été que récemment suggéré. Par western blot, nous montrons que l'augmentation d'expression du LXR alpha est suivie de sa translocation nucléaire. En conclusion, cette thèse montre que la CRP exerce à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires sur les monocytes humains *ex-vivo*. Nos résultats sont en faveur d'un rôle anti-athérogénique de la CRP de part son effet précédemment inconnu sur le LXR alpha.

Mots clés : Athérosclérose - CRP – LXR alpha - Monocyte – Puces à oligonucléotides

Object : Inflammation plays an important role in the pathophysiology of atherosclerosis. Non specific inflammation biomarkers, such as C-Reactive Protein (CRP), are associated with a higher risk of developing atherosclerosis or other acute complications. By its capacity to differentiate into macrophages and to interact with other cells monocytes play a key role in atherogenesis. In order to better understand the causal link between CRP and atherosclerosis, we studied the effects of CRP on several aspects of human monocyte biology. **Material and methods :** Monocytes isolated from peripheral blood of healthy men (n=9) and healthy premenopausal women (n=9), were purified by Ficoll and CD14 positive selection, cultured over night then exposed to purified CRP (25 µg/ml) for 12 or 24h. A custom-made oligonucleotide array of 250 genes was used to analyse gene expression profiles of monocytes exposed or not to CRP. Changes in gene expression were confirmed by quantitative PCR and western blot. **Results and Discussion :** Our results show CRP increased pro-inflammatory cytokine (IL-1 and IL-6) and chemokine (IL-8 and Gro-beta) expression. In contrast, CRP decreased MIP-1 alpha, MIP-1 beta and alpha-2 macro-globuline expression. Furthermore, we were able to report, for the first time, that CRP increased gene expression of Liver X receptor (LXR) alpha, a transcription factor whose role in atherosclerosis has only recently been shown. Using western blot, we showed that the increased LXR alpha gene expression was followed by its nuclear translocation. In conclusion, this thesis suggests that CRP may have both pro and anti-inflammatory effects on the human monocyte *ex-vivo*. Our results argue in favor of an anti-atherogenic role of CRP, at least in part by its new effect on LXR alpha.

Keywords: Atherosclerosis – CRP – LXR alpha – Monocyte - Oligonucleotide array

Nancy-Université

Université Henri Poincaré

Nom : **Monsieur HANRIOT**

Prénom : **Didier**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : ***INGÉNIERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE***

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 26 avril 2008

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 * LE PRESIDENT

Jean-Pierre FINANCE

info@uhp-nancy.fr | www.uhp-nancy.fr

24 - 30 rue Lionnois | BP 60120
54003 Nancy Cedex | FRANCE
Tél. : +33(0)3 83 68 20 00
Fax : +33(0)3 83 68 21 00