



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2008

---

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

# THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 8 octobre 2008

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
HENRI PONCARE-NANCY 1**  
Mention Pharmacologie

Par Yohann Bernard

Né(e) le 21/09/1978

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies  
Métabolisme et Mécanisme d'action des Médicaments, Pharmacologie Clinique

Sujet :

**Stress oxydatif, inflammation vasculaire et  
métalloprotéinases : étude *in vitro* sur un  
modèle de coculture**

## **MEMBRES DU JURY**

Juges : Professeur Jeffrey Atkinson, Nancy  
Professeur Jean-Luc Bueb, Luxembourg

Rapporteurs : Professeur Jean-Pierre Gies, Strasbourg  
Professeur Bernard Pirotte, Liège



Je tiens à exprimer une reconnaissance toute particulière

**à Monsieur le Professeur Jean-Luc BUEB,**

qui a encadré cette thèse à l'Unité de Recherche en Sciences de la Vie de l'Université du Luxembourg. Son sens critique, sa très grande rigueur scientifique et son sens de la pédagogie ont guidé mes recherches et ont grandement contribué à ma formation scientifique.

Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour la patience dont il a fait preuve durant ce travail, sa disponibilité sans limite autant dans la réalisation des travaux scientifiques que dans la rédaction du manuscrit.

**à Monsieur le Professeur Eric TSCHIRHART,**

qui m'a accueilli dans son laboratoire à l'Université du Luxembourg. Son sens critique, son esprit de synthèse et sa très grande rigueur ont grandement contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance

**à Monsieur le Professeur Jeffrey ATKINSON,  
à Monsieur le Professeur Jean-Pierre GIES,  
à Monsieur le Professeur Bernard PIROTTE,**

pour avoir accepté de juger ce travail et pour y avoir apporté toutes leurs compétences. Je vous remercie très sincèrement de m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire pour leur aide précieuse et leurs nombreux conseils.

Je tiens enfin à remercier les organismes qui m'ont soutenu financièrement pendant la durée de cette thèse :

**l'Université du Luxembourg** (contrat d'assistant du corps intermédiaire),  
**le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** (Bourse Formation Recherche, BFR 03/072)

et **le Fonds National de la Recherche** pour la publication de cette thèse.



## RESUME

Au cours de l'athérosclérose, l'invasion de la paroi vasculaire par les leucocytes conduit à l'inflammation de ce tissu et à l'établissement d'un stress oxydatif. Ce travail aborde les effets du stress oxydatif et les effets d'interactions potentielles entre un modèle de neutrophiles (≠HL60) et des cellules endothéliales (HCAEC) ou musculaires lisses (HSCMC) de coronaires humaines sur les métalloprotéinases (MMPs) cellulaires et la mobilité des ≠HL60.

Au cours des passages, la lignée promyélocytaire HL60, différenciée en modèle de neutrophiles ≠HL60, subit des variations d'expression et de production de MMP9 et de ses propriétés de mobilité. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) d'origine biochimique ou cellulaire ne modifient pas l'activité MMP2 ou MMP9 des HCAEC et HSCMC. Il n'y a pas modification des activités MMPs en coculture ≠HL60/HCAEC mais stimulation de l'activité MMP9 en coculture ≠HL60/HSCMC. Les HSCMC stimulent les capacités migratoires et favorisent la réponse invasive des ≠HL60 au N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine. Les enzymes antioxydantes ont peu d'effet sur la mobilité, stimulent l'expression et la production de MMP9 des ≠HL60 et semblent diminuer l'effet stimulant des HSCMC sur la production de MMP9 par ≠HL60. Les HSCMC expriment et/ou sécrètent certaines cytokines (IL8, IL6, IL1 $\beta$ , CCL2, CXCL12) impliquées dans l'athérosclérose.

En conclusion, l'interaction ≠HL60/HSCMC entraîne une augmentation de production de MMP9, modulée par les ERO, et une stimulation de mobilité des ≠HL60. Les cytokines inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose et exprimées par les HSCMC sont des acteurs potentiels dans la réponse sécrétoire et/ou migratoire des ≠HL60.

Mots-clés: athérosclérose, stress oxydatif ou oxydant, espèces réactives de l'oxygène modèle de neutrophiles, cellules vasculaires, coculture, métalloprotéinases matricielles, migration, invasion.

## ABSTRACT

During atherosclerosis leucocytes invade the vascular wall, inducing inflammation and production of oxidative stress by reactive oxygen species (ROS). We tested the effects of an oxidative stress and/or potential interactions between a neutrophil model (≠HL60) and human coronary endothelial (HCAEC) or smooth muscle (HSCMC) cells, on ≠HL60 mobility and production and activity of cellular metalloproteinases. Cell passaging of the promyelocytic HL60 cell line, differentiated by DMSO in a neutrophil model (≠HL60), induces variations in cell mobility and production of MMP9. ROS from biochemical or cellular sources did not modify MMP2 or MMP9 activity in HCAEC or HSCMC. There is no modification of MMPs activities in ≠HL60/HCAEC cocultures, but stimulation of ≠HL60 MMP9 activity in ≠HL60/HSCMC cocultures. Basal migration capacities and N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine-stimulated invasion abilities of ≠HL60 increase in presence of HSCMC. Antioxidant enzymes barely change ≠HL60 mobility, increase expression and production of ≠HL60 MMP9 and seem to reduce the stimulating effect of HSCMC on ≠HL60 MMP9 production. HSCMC also express and/or secrete some cytokines (IL8, IL6, IL1 $\beta$ , CCL2, CXCL12) implicated in atherosclerosis.

In conclusion, interactions between ≠HL60 and HSCMC induce an increase in MMP9 secretion, which is modulated by ROS, and a stimulation of ≠HL60 mobility. Expression by HSCMC of inflammatory cytokines implicated in atherosclerosis allows to identify potential candidates responsible for the secretory and/or migratory response of ≠HL60.

Keywords: atherosclerosis, oxidative stress, reactive oxygen species, neutrophil model, vascular cells, coculture, matrix metalloproteinases, mobility



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	6
<b>I <u>Polynucléaire neutrophile et inflammation</u></b> .....	6
<b>1 Généralités</b> .....	6
A <u>Origine et devenir du polynucléaire neutrophile</u> .....	6
B <u>Granulogénèse</u> .....	7
<b>2 Fonctions tueuses et sécrétoires</b> .....	9
A <u>Système bactéricide indépendant de l'oxygène</u> .....	9
B <u>Système bactéricide dépendant de l'oxygène</u> .....	10
a <u>Rôle de la NADPH oxydase</u> .....	10
b <u>Structure de la NADPH oxydase</u> .....	11
c <u>Les métabolites oxydants</u> .....	12
<b>3 Migration</b> .....	16
A <u>Capture et roulement</u> .....	18
B <u>Activation et adhérence forte</u> .....	19
C <u>Diapédèse, rôle des protéases</u> .....	20
D <u>Facteurs inducteurs du déplacement</u> .....	21
<b>II <u>Athérosclérose et réponse inflammatoire</u></b> .....	23
<b>1 Athérosclérose</b> .....	23
A <u>Définition</u> .....	23
B <u>Description cellulaire et tissulaire</u> .....	23
C <u>Pathogénie</u> .....	24
<b>2 Théorie de la réponse inflammatoire</b> .....	25
A <u>Pathogénèse</u> .....	26
B <u>Développement de la plaque</u> .....	28
C <u>Rôle des polynucléaires neutrophiles</u> <u>au cours de l'athérosclérose</u> .....	30
<b>III <u>Les métalloprotéinases matricielles</u></b> .....	32
<b>1 Caractéristiques générales</b> .....	32
<b>2 Régulation des métalloprotéinases matricielles</b> .....	36
A <u>Expression</u> .....	37
B <u>Activation</u> .....	37
C <u>Inhibiteurs</u> .....	39
<b>3 Rôle des métalloprotéinases matricielles</b> <u>au cours de l'athérosclérose</u> .....	39
A <u>Implication dans la migration cellulaire</u> .....	40
B <u>Implication dans la rupture de plaques</u> .....	41
<b>OBJECTIFS</b> .....	43

<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>44</b>
<b>I <u>Matériel biologique</u>.....</b>	<b>44</b>
<b>1 Cellules musculaires.....</b>	<b>44</b>
A <u>Réactif</u> .....	44
B <u>Culture cellulaire</u> .....	44
<b>2 Cellules endothéliales.....</b>	<b>45</b>
A <u>Réactif</u> .....	45
B <u>Culture cellulaire</u> .....	45
<b>3 Lignée promyélocytaire HL60.....</b>	<b>46</b>
A <u>Réactif</u> .....	46
B <u>Culture cellulaire</u> .....	46
<b>II <u>Traitement des cellules endothéliales et musculaires</u>.....</b>	<b>46</b>
<b>1 Traitement par le N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine, le peroxyde d'hydrogène et le mélange xanthine/xanthine oxydase.....</b>	<b>46</b>
A <u>Réactifs</u> .....	46
B <u>Prétraitement</u> .....	47
<b>2 Traitement par le milieu conditionné.....</b>	<b>47</b>
<b>3 Coculture avec un modèle de neutrophiles .....</b>	<b>47</b>
A <u>Réactifs</u> .....	47
B <u>Prétraitement</u> .....	48
<b>III <u>Etudes moléculaires</u>.....</b>	<b>48</b>
<b>1 Extraction de l'ARN.....</b>	<b>48</b>
<b>2 Transcription réverse.....</b>	<b>49</b>
<b>3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi quantitative.....</b>	<b>49</b>
<b>4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel.....</b>	<b>50</b>
A <u>Etude de l'expression des MMP9</u> .....	50
B <u>Etude de l'expression de l'ARNm des cytokines inflammatoires et/ou des récepteurs par les HCSMC</u> .....	50
<b>IV <u>Etudes biochimiques</u>.....</b>	<b>51</b>
<b>1 Test ELISA.....</b>	<b>51</b>
A <u>Principe</u> .....	51
B <u>Protocole</u> .....	52
<b>2 Zymographie et analyse densitométrique.....</b>	<b>53</b>
A <u>Réactifs</u> .....	53
B <u>Migration électrophorétique</u> .....	53
C <u>Analyse densitométrique</u> .....	54

<b>V <u>Etudes fonctionnelles</u></b> .....	54
<b>1 Principe</b> .....	54
<b>2 Protocole</b> .....	55
<b>3 Mises au point</b> .....	58
A <u>Optimisation des concentrations cellulaires</u> .....	58
B <u>Détermination du temps de migration et de la concentration de chémoattractant</u> .....	58
<b>VI <u>Analyse statistique</u></b> .....	61
<b>RESULTATS</b> .....	62
<b>I <u>Etude de la lignée promyélocytaire HL60</u></b> .....	62
<i>Article 1</i> .....	165
<b>II <u>Effet d'un stress oxydatif sur cellules vasculaires de coronaires humaines</u></b> .....	66
<b>1 Cellules endothéliales</b> .....	67
A <u>Effets d'un stress oxydatif</u> .....	67
a Origine biochimique.....	67
b Origine cellulaire.....	68
B <u>Etude d'un modèle de coculture #HL60/HCAEC</u> .....	69
<b>2 Cellules musculaires</b> .....	71
A <u>Effets d'un stress oxydatif</u> .....	71
a Origine biochimique.....	71
b Origine cellulaire.....	71
B <u>Etude d'un modèle de coculture #HL60/HCSMC</u> .....	71
<i>Article 2</i> .....	287
C <u>Effet des cellules musculaires sur les HL60 non différenciées</u> .....	74
a Coculture et activité MMP9.....	74
b Migration et invasion.....	74
D <u>Identification des médiateurs</u> .....	76
a Analyse de certains gènes exprimés par les cellules musculaires en coculture .....	76
b Effet de la coculture et effet du fMLF sur l'expression de l'ARNm par les cellules musculaires.....	79
c Analyse des cytokines sécrétées dans le surnageant de culture et de coculture .....	83

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>87</b>
<b>I <u>Etude des capacités sécrétoires et migratoires d'un modèle de neutrophiles.....</u></b>	<b>88</b>
<b>II <u>Effets d'un stress oxydatif et effets d'interactions entre un modèle de neutrophiles et des cellules vasculaires de coronaires humaines sur l'activité MMP2 et MMP9 .....</u></b>	<b>91</b>
<b>1 Effet des espèces réactives de l'oxygène sur l'activité MMP2 et MMP9 de cellules vasculaires.....</b>	<b>91</b>
<b>2 Effet d'interactions entre #HL60 et cellules vasculaires de coronaires humaines sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 .....</b>	<b>92</b>
<b>3 Effet modulateur des espèces réactives de l'oxygène sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 .....</b>	<b>94</b>
<b>III <u>Rôle des cellules musculaires lisses de coronaires humaines et des espèces réactives de l'oxygène sur la mobilité d'un modèle de neutrophiles.....</u></b>	<b>97</b>
<b>1 Effet des cellules musculaires sur la mobilité de notre modèle de neutrophiles .....</b>	<b>97</b>
<b>2 Effet modulateur des espèces réactives de l'oxygène sur la mobilité de notre modèle de neutrophiles.....</b>	<b>98</b>
<b>IV <u>Identification de certains médiateurs exprimés par les cellules musculaires lisses et impliqués dans les interactions avec un modèle de neutrophiles .....</u></b>	<b>100</b>
<b>1 Analyse de certains gènes exprimés par les cellules musculaires en coculture .....</b>	<b>100</b>
<b>2 Analyse de certaines cytokines sécrétées en coculture.....</b>	<b>102</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>109</b>

## **ANNEXES**

Liste des travaux  
Rapports des examinateurs

## Liste des abréviations

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EcSOD : Superoxyde dismutase extracellulaire

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

fMLF : N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine

HCAEC : Cellules endothéliales d'artères coronaires humaines

HCSMC : Cellules musculaires lisses de coronaires humaines

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

HL60 différenciées au DMSO : Modèle de neutrophiles, ≠HL60

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LDLox : Lipoprotéine de basse densité oxydée

MMPs : Métalloprotéinases matricielles

MPO : Myéloperoxydase

MT-MMPs : Métalloprotéinases matricielles membranaires

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Anion superoxyde

PN : Polynucléaire neutrophile

SOD : Superoxyde dismutase

TIMPs : Inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles

X/XO : Xanthine/Xanthine oxidase

## **INTRODUCTION**

Les réactions inflammatoires sont déclenchées par des agressions : traumatismes, molécules toxiques (exogènes, endogènes) ou microorganismes vivants tels que bactéries, virus, levures ou parasites. L'immunité innée est la première ligne de défense des êtres vivants pour combattre les pathogènes et leurs toxines. Cette réponse met en œuvre des phénomènes locaux, comme l'accroissement du débit sanguin, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la migration des leucocytes par diapédèse, avec, en particulier, une accumulation des polynucléaires neutrophiles (PN) dans la région tissulaire agressée (Blais *et coll.*, 2003; Hakim, 1993).

### **I Polynucléaire neutrophile et inflammation**

#### **1 Généralités**

##### **A Origine et devenir du polynucléaire neutrophile**

Le cycle de vie d'un polynucléaire neutrophile (PN) débute dans la moelle épinière, se poursuit dans la circulation, pour se terminer dans les tissus. Dans la moelle épinière, le futur PN subit une différenciation et une maturation qui va durer approximativement 14 jours (Baehner, 2000). Les interactions des facteurs de croissance avec leurs récepteurs gouvernent la production, la différenciation et la maturation des précurseurs myéloïdes des PN (Khwaja *et coll.*, 1993; Lieschke *et coll.*, 1992; Tidow *et coll.*, 1997). Après

maturation, les PN entrent dans la circulation, seconde étape de leur cycle de vie. Ils ont une demi-vie courte (6 à 7 heures dans le sang) (Itoh *et coll.*, 1998), et représentent 50% des leucocytes et plus de 90% des phagocytes circulants. En présence de stimuli inflammatoires, les PN migrent du sang circulant vers le foyer inflammatoire, où ils vont exercer leur rôle puis mourir (Seely *et coll.*, 2003). Parmi les différents stimuli, on peut citer les dérivés de protéines bactériennes comme le N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine (fMLF). La liaison du peptide fMLF à son récepteur active les réponses chémotactiques, adhésives et antimicrobiennes du PN (Borregaard *et coll.*, 1997; Gallin *et coll.*, 1984). Ces réponses biologiques sont médiées par la mobilisation et la fusion des granules et vésicules sécrétoires à la membrane plasmique.

## B Granulogénèse

Les PN sont des cellules compartimentées : de nombreuses molécules intervenant dans ses fonctions sont synthétisées et stockées dans les granules apparaissant au cours de la granulogénèse. Le marqueur de référence des granules est la présence de myéloperoxydase (MPO) (Bainton *et coll.*, 1966). On distingue ainsi les granules azurophiles (primaires) positifs à la MPO et les granules spécifiques (secondaires) négatifs à la MPO (Bretz *et coll.*, 1974). Les granules spécifiques peuvent être distingués sur la base de leur contenu en lactoferrines et gélatinases. Les granules contenant beaucoup de gélatinases et peu de lactoferrines sont appelés granules tertiaires (Spicer *et coll.*, 1969). La distinction des vésicules sécrétoires est

basée sur leur contenu en protéine CR1 (CD35, récepteur des fragments C3b et C4b du complément, Borregaard *et coll.*, 1990).

Les vésicules et les granules sécrétoires permettent la sécrétion et l'incorporation de nouveaux récepteurs et protéines fonctionnelles à la membrane plasmique. Ils changent considérablement l'interaction du PN avec l'environnement extérieur (Borregaard *et coll.*, 1983; Todd *et coll.*, 1984). Ainsi, sous l'effet d'un stimulus dégranulant, la décompartmentalisation permet de déclencher les fonctions effectrices comme la formation de la NADPH oxydase active (cytochrome b558...), source des différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO), la libération de protéases (gélatinases...) dans le phagosome ou le milieu extracellulaire, ou encore l'incorporation de nouveaux récepteurs comme le récepteur au fMLF (figure 1).

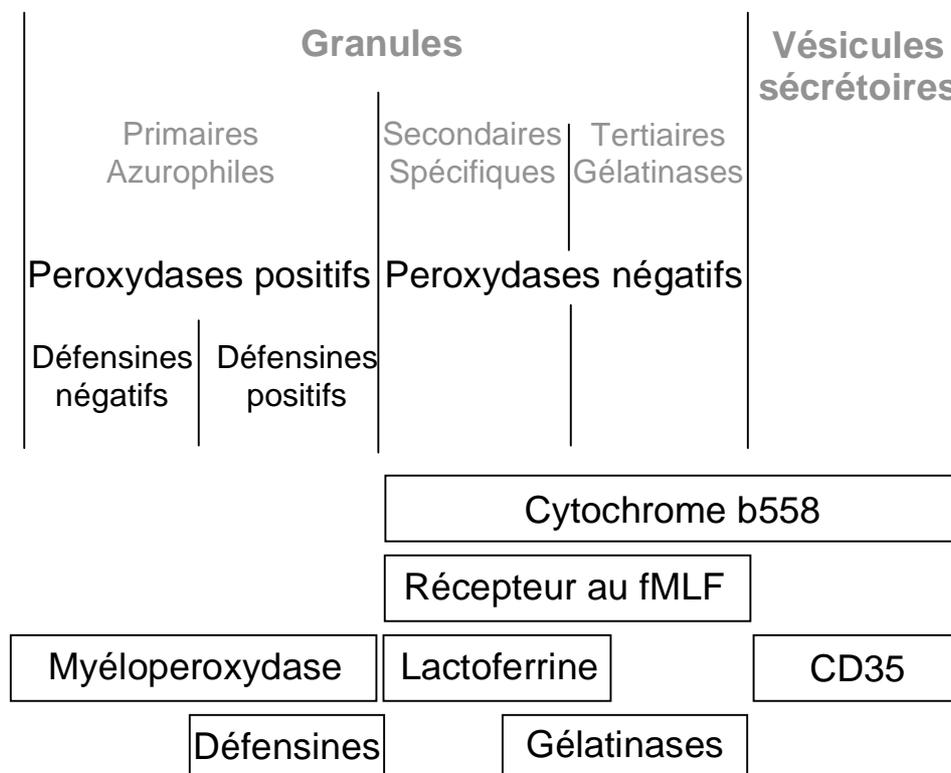


Figure 1. Classification des granules chez le PN; d'après Borregaard *et coll.* (1997).

## 2 Fonctions tueuses et sécrétoires

Les PN possèdent un nombre important d'armes cytotoxiques. La destruction potentielle tissulaire est réalisée par une action synergique de l'exocytose granulaire et de la génération d'ERO. Ces deux grands mécanismes agissent de façon coopérative et synergique. On peut ainsi distinguer les mécanismes indépendants de l'oxygène conduisant au déversement des protéases dans le milieu extracellulaire ou le phagosome, et les mécanismes dépendants de l'oxygène entraînant la production d'ERO (Gougerot-Pocidallo *et coll.*, 2002).

### A Système bactéricide indépendant de l'oxygène

Les hydrolases, glycosidases et protéases entre autres contribuent à la dégradation des microorganismes. Le lysozyme dégrade les liaisons mucosidiques au niveau de la paroi bactérienne, il agit en synergie avec les protéases. Les protéines cationiques à action antibiotique comme les défensines, la BPI (bactericidal permeability increasing protein), les serpicidines comme l'élastase expriment une activité bactéricide (Gougerot-Pocidallo *et coll.*, 2002). Ainsi, l'élastase neutrophilique est un effecteur important du système immunitaire inné avec une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram négatives (Belaouaj *et coll.*, 1998), les spirochètes (Garcia *et coll.*, 1998) et les champignons (Tkalcevic *et coll.*, 2000). De nombreuses protéinases provenant des neutrophiles sont fortement chargées; leur nature cationique peut contribuer aux dommages cellulaires par une altération directe des composants de la matrice extracellulaire et du plasma, ou par une augmentation de leur liaison avec la membrane cellulaire (Starcher *et coll.*, 1999). Les tissus sont généralement résistants aux

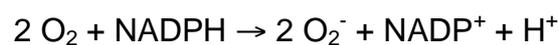
protéinases, bien que la plupart du collagène tissulaire soit dégradé par les collagénases, appartenant à la famille des métalloprotéinases matricielles (MMPs).

## B Système bactéricide dépendant de l'oxygène

L'oxygène consommé sert à produire des ERO dont le précurseur est l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ). L'événement métabolique par lequel sont générés les  $O_2^-$  est la flambée respiratoire. L'enzyme responsable de la production d' $O_2^-$  est la NADPH oxydase (Babior *et coll.*, 1976).

### a Rôle de la NADPH oxydase

L'oxygène consommé par les PN est converti enzymatiquement en  $O_2^-$  par une réduction monovalente en utilisant le NADPH cellulaire provenant de la voie des hexoses monophosphates qui sert de donneur d'électrons (Babior, 1984; Karnovsky, 1962). Cette réaction est catalysée par la NADPH oxydase (Babior, 1984).



La NADPH oxydase est inactive dans les cellules au repos. Elle est activée lorsque la cellule est exposée à des stimuli appropriés. L' $O_2^-$  généré par la NADPH oxydase est le précurseur d'une variété de puissants oxydants ayant des fonctions bactéricides (Babior, 1984). La NADPH oxydase est une enzyme complexe composée d'éléments dont la nature et la distribution varient avec l'état d'activation (Chanock *et coll.*, 1994).

## b Structure de la NADPH oxydase

On distingue les composants liés à la membrane et les composants cytosoliques.

Les composants liés à la membrane : Le cytochrome b558 a été identifié comme composant de la NADPH oxydase par le groupe d'Allison *et coll.* (1978) (Segal *et coll.*, 1978). Il est composé d'une sous-unité  $\alpha$  (p22<sup>phox</sup>) et d'une sous-unité  $\beta$  (gp91<sup>phox</sup>, Nox 2) assemblées de façon non-covalente au niveau membranaire (Huang *et coll.*, 1995). Le cytochrome b558 contient 2 groupements hémiques différents, dont la localisation et la liaison ne sont pas clairement définies. Quinn, *et coll.*, (1992) ont montré que le premier hème se liait à gp91<sup>phox</sup> et le deuxième à gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup> (Quinn *et coll.*, 1992). Plus récemment, des travaux indiquaient que les deux groupements hémiques étaient liés à gp91<sup>phox</sup> (Finegold *et coll.*, 1996; Yu *et coll.*, 1998). Dans les PN au repos, le cytochrome b558 est localisé dans les granules spécifiques (Babior, 1984). Après activation, les granules fusionnent avec la membrane plasmique, ou la membrane du phagosome, permettant la production d'une quantité importante d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Les composants cytosoliques : Les composants cytosoliques sont les protéines p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et une petite protéine Rac (isoforme Rac1 ou Rac2). Dans le PN au repos, p47<sup>phox</sup> existe sous forme libre dans le cytosol ou associée sous forme d'un complexe avec p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup> (Lapouge *et coll.*, 2002). Après activation, les molécules p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup> sont phosphorylées et migrent vers la membrane (el Benna *et coll.*,

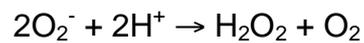
1994). La protéine Rac intervient dans la modulation de la réponse oxydasique (Diebold *et coll.*, 2001; Gorzalczany *et coll.*, 2002).

### c Les métabolites oxydants

#### - Génération de radicaux oxygénés

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est formé par dismutation spontanée des O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Babior, 1984) ou par une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (McCord *et coll.*, 1969).

Dismutation spontanée ou SOD :



#### - Génération d'espèces chlorés

La myéloperoxydase catalyse la formation d'halogène oxydé comme l'acide hypochloreux (HOCl) et l'ion hypochlorite (OCl<sup>-</sup>) (Babior, 1984).

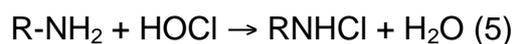
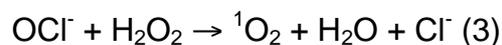
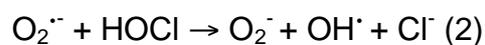
Myéloperoxydase:



#### - Génération d'espèces oxygénées secondaires

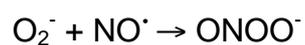
Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les O<sub>2</sub><sup>-</sup> sont utilisés comme matériel de départ afin de produire les dérivés oxydants microbicides comme le radical hydroxyle (1 et 2), l'oxygène

singulet (3) et les chloramines (4 et 5) (figure 2).

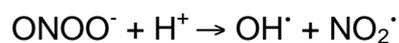


- Génération d'espèces nitrogénées

L' $\text{O}_2^{\cdot-}$  réagit avec le monoxyde d'azote pour former le peroxyneutre, directement toxique pour les cellules (Beckman *et coll.*, 1990).



Le peroxyneutre peut se décomposer pour former des composés très toxiques comme le radical hydroxyle (Beckman *et coll.*, 1990; Hogg *et coll.*, 1992).



Milieu intracellulaire

Milieu extracellulaire

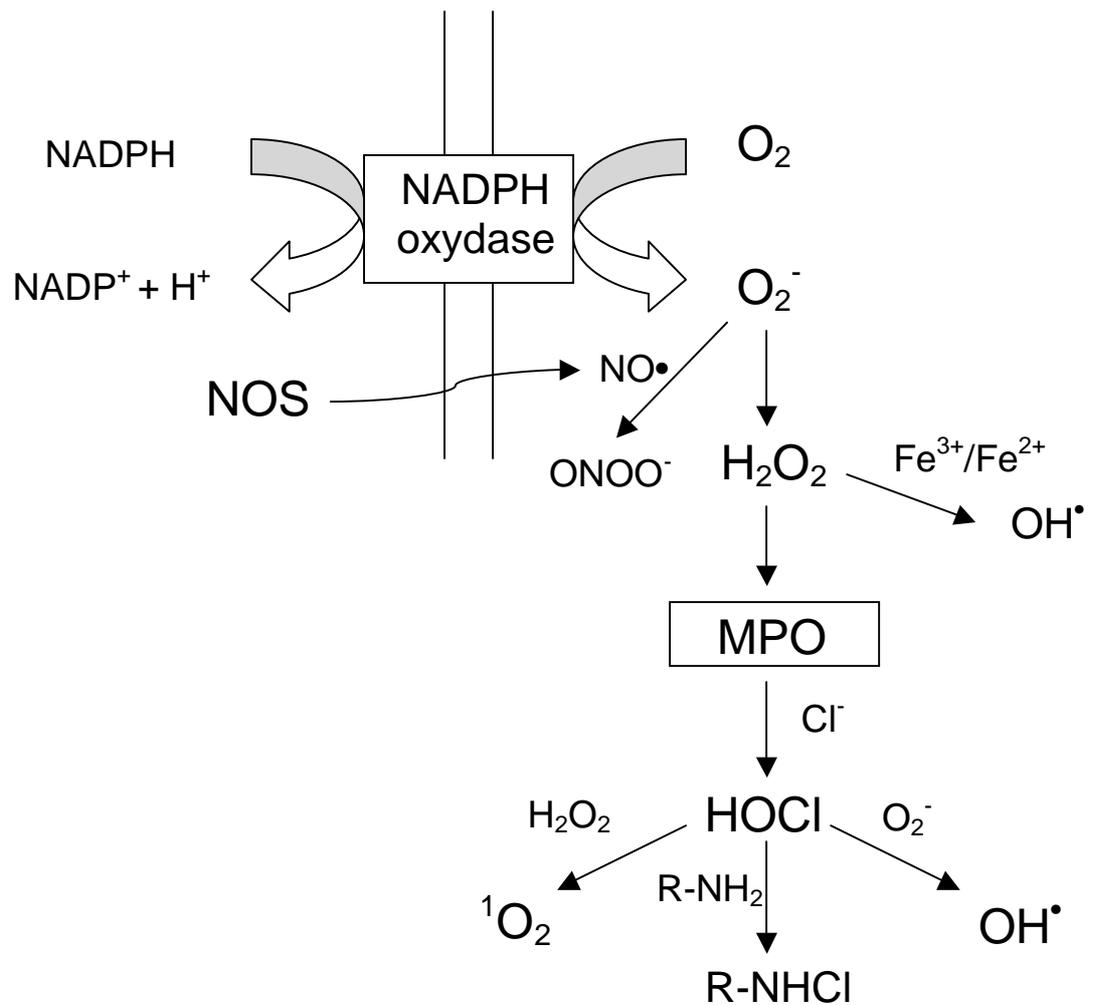


Figure 2. Espèces réactives oxygénées et nitrogénées générées par la stimulation de la NADPH oxydase neutrophilique. NOS, monoxyde d'azote; MPO, myéloperoxydase; d'après (Hampton *et coll.*, 1998).

#### - Effets délétères des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO peuvent oxyder les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les polysaccharides membranaires. Les protéines offrent un lien aux métaux de transition, donnant une cible spécifique pour l'attaque par le radical hydroxyle. Les ERO produites par les cellules inflammatoires sont hautement réactives pour les membranes cellulaires. Le radical hydroxyle entraîne la formation de radicaux lipidiques peroxydés dans la membrane cellulaire (Beckman *et coll.*, 1990). La cassure des acides gras polyinsaturés altère la fonction membranaire, inactive les récepteurs et les enzymes liées à la

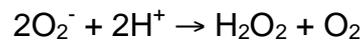
membrane, et augmente la perméabilité tissulaire dans de nombreuses pathologies comme le cancer, l'athérosclérose ou l'arthrite rhumatoïde (Hitchon *et coll.*, 2004). Les espèces réactives oxygénées et nitrogénées entraînent des dommages de l'ADN. Elles peuvent avoir des effets mutagènes en induisant des altérations sur les acides nucléiques (Bashir *et coll.*, 1993; Hajizadeh *et coll.*, 2003).

#### - Les mécanismes de détoxification

Les organismes vivants ont développé des mécanismes de défense afin d'éliminer l'excès d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$ , initiateur de radicaux puissants, responsable du phénomène appelé stress oxydant ou stress oxydatif. Les enzymes antioxydantes jouent un rôle très important dans le maintien du potentiel redox cellulaire.

Il existe trois isoformes de la SOD dans les cellules humaines : les formes Cu/Zn- et Mn-SOD sont localisées intracellulairement, la forme extracellulaire (EcSOD) est sécrétée et se lie aux sulfates d'héparane de la surface cellulaire (Marklund, 1982). La paroi artérielle contient, dans les interstices vasculaires, une quantité de EcSOD supérieure aux autres tissus, suggérant des caractéristiques spécifiques de cette isoforme dans la paroi artérielle (Oury *et coll.*, 1996; Stralin *et coll.*, 1995). Ainsi, au cours du processus d'athérogénèse, la EcSOD est fortement exprimée et permet de prévenir les effets toxiques du  $O_2^-$  (Mugge *et coll.*, 1991).

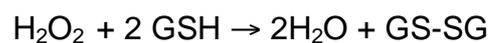
La SOD catalyse la formation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (McCord *et coll.*, 1969) :



La catalase présente dans les péroxysomes catalyse la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Forman *et coll.*, 2002) :



La glutathione peroxidase, une sélénoprotéine présente dans le cytosol et les mitochondries, réduit le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion (GSH) et en produisant le glutathion disulfite (GSSG) (Forman *et coll.*, 2002) :



### **3 Migration**

La migration leucocytaire est gouvernée par une activation des protéines d'adhérence sur les leucocytes et les cellules endothéliales. Les leucocytes sont transportés dans le flux sanguin et interagissent faiblement et transitoirement avec les cellules endothéliales. En l'absence de stimulus spécifique, les leucocytes restent dans le flux sanguin. Sous l'action de facteurs inflammatoires, une adhérence ferme et stable des leucocytes à l'endothélium est observée, suivie de leur migration vers les jonctions des cellules endothéliales, leur infiltration et éventuellement leur rétention dans les tissus (figure 3).

contact aléatoire → roulement → adhérence → diapédèse → chimiotactisme

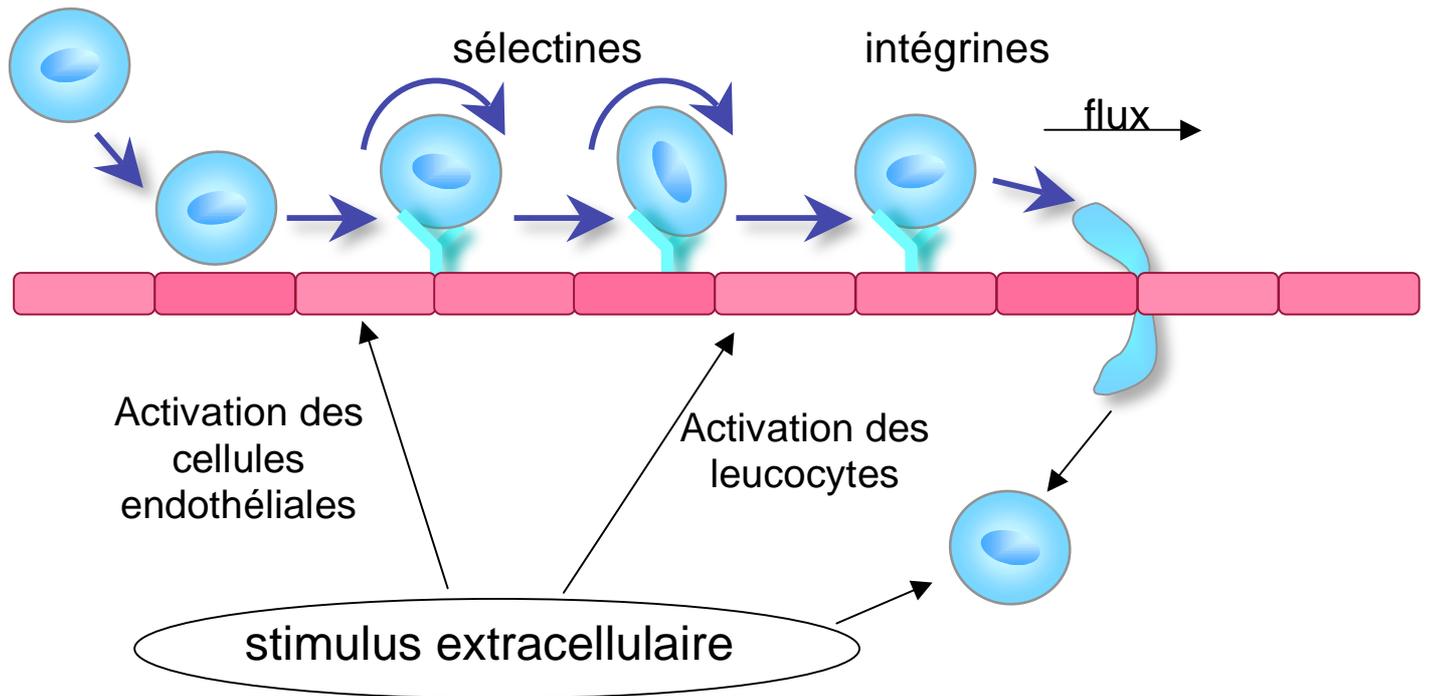


Figure 3. A Interactions adhésives lors de la migration des leucocytes d'après Carlos *et coll.* (1994).

	Roulement	Activation → Adhérence	Migration transendothéliale	Migration subendothéliale
leucocyte	structures sialylées et fucosylées, sélectine L 	récepteurs de cytokines, de chimiokines, de chemoattractants 	intégrines β1, β2 et β7 	PECAM-1, intégrines β1, β2 et β7 
endothélium	sélectine P ligand de sélectine L sélectine E CD34 MadCAM-1	chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1α...) PAF PECAM-1 sélectine E	ICAM-1 ICAM-2 VCAM-1 MadCAM-1	PECAM-1 ICAM-1 VCAM-1 
tissu	histamine, thrombine oxydants, LPS leucotriènes Cytokines (IL-1, TNFα...)	cytokines (GM-CSF, IL-5...), chimiokines (IL-8, MCP-1, ...), chemoattractants (C5a, fMLF...)	cytokines (TNFα, IL-1, IFN-γ, IL-4)	chimiokines chemioattractants  composants de la matrice extracellulaire, chimiokines chemioattractants

B Molécules d'adhérence impliquées dans les différentes phases de la migration des leucocytes d'après Carlos *et coll.* (1994).

## A Capture et roulement

La migration des PN débute par un mouvement du centre vers la périphérie du vaisseau appelé la capture. Il en résulte une série d'interactions avec les cellules endothéliales permettant au PN de rouler sur la paroi artérielle. Ces interactions sont médiées par les sélectines et sont caractérisées par un état de faible adhérence (Tedder *et coll.*, 1995). La famille des sélectines comprend 3 membres désignés par les préfixes E (endothéliales), P (plaquettes) et L (leucocytes).

La sélectine L (CD62L) est exprimée par les leucocytes de façon constitutive (Matsuba *et coll.*, 1997). Les ligands de la sélectine L sont exprimés par les cellules endothéliales et sont membres des oligosaccharides sialomucinés (Varki, 1997).

La sélectine P a été caractérisée initialement sur les plaquettes (Hsu-Lin *et coll.*, 1984), puis décrite sur les cellules endothéliales (Bonfanti *et coll.*, 1989). La sélectine P est contenue dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (Bonfanti *et coll.*, 1989). L'expression de la sélectine P a lieu en réponse à un stimulus approprié comme les produits du complément, les ERO ou différentes cytokines. La sélectine P est alors mobilisée à la surface cellulaire où elle peut interagir avec les ligands leucocytaires : les sélectines P glycoprotéine ligand-1 (PSGL-1, CD162) (Wagner *et coll.*, 2000).

La sélectine E (CD62E) est exprimée par les cellules endothéliales 4 à 6 heures après induction par des cytokines inflammatoires (IL1 ou TNF $\alpha$ ) (Klein *et coll.*, 1995; Scholz *et coll.*, 1996). La sélectine E maintient le roulement après la diminution d'expression de la sélectine P (Malik *et coll.*, 1996; Yang

*et coll.*, 1999). Elle se lie *in vitro* aux acides sialiques et aux fucoses contenus dans les glycoprotéines (Wagner *et coll.*, 2000).

*L'étape de roulement est gouvernée par une série d'interactions de faible intensité, elle est le prélude à de fortes interactions moléculaires appelées adhérence.*

### B Activation et adhérence forte

L'adhérence est régie par des interactions moléculaires de fortes intensités, impliquant des protéines d'adhérence appelées intégrines. Les intégrines sont un groupe de glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques impliquées dans les interactions cellulaires, et dans les interactions entre cellules et protéines extracellulaires (Hynes, 1992; Luscinskas *et coll.*, 1994). Les intégrines sont composées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . L'adhérence du PN à l'endothélium activé est médiée principalement par deux intégrines composées de la même sous-unité  $\beta_2$  (CD18) : il s'agit de l'antigène-1 macrophagique (Mac-1,  $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18) et de l'antigène-1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA-1,  $\alpha_L\beta_2$ , CD11a/CD18) (Li *et coll.*, 1996; Luscinskas *et coll.*, 1994; Malik *et coll.*, 1996).

Dans de nombreux modèles d'inflammation impliquant les neutrophiles, la sous-unité Mac-1 est considérée comme jouant un rôle majeur (Luscinskas *et coll.*, 1994; Malik *et coll.*, 1996). Mac-1 est stocké dans 3 compartiments du PN : les vésicules sécrétoires, les granules secondaires et tertiaires (Borregaard *et coll.*, 1997; Sengelov *et coll.*, 1992). Ainsi, Mac-1 peut être

rapidement mobilisé à la surface du PN après exposition à un stimulus dégranulant comme le peptide bactérien fMLF (Altieri *et coll.*, 1988).

Les ligands des intégrines sont les molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM-1 et ICAM-2). Mac-1 et LFA-1 se lient préférentiellement à ICAM-1 et ICAM-2 respectivement (Zimmerman *et coll.*, 1992).

Les molécules d'adhérence vasculaire (VCAM-1 et VCAM-2), présentes sur les cellules endothéliales, se lient aux intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_2$  (Davenpeck *et coll.*, 1998). L'interaction avec VCAM-1 est importante pour la migration des monocytes et des éosinophiles. L'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) a été identifiée sur les PN de rat et humain et permet, *in vitro*, de médier l'adhérence à VCAM-1 sur l'endothélium (Davenpeck *et coll.*, 1998).

*Après l'étape d'adhérence, le PN doit traverser la membrane basale afin d'entrer dans l'environnement inflammatoire extravasculaire.*

### C Diapédèse, rôle des protéases

L'adhérence et la migration du PN sont régies par des molécules d'adhérence et sont accompagnées de la production de protéases, capables de digérer les composants de la matrice extracellulaire (Hanlon *et coll.*, 1991; Wright *et coll.*, 1979). Delclaux, *et coll.* (1996) ont montré que la migration neutrophilique à travers un substrat artificiel (matrigel) était inhibée de 50% par un inhibiteur de la métalloprotéinase de type 9 (MMP9) ou de l'élastase (Delclaux *et coll.*, 1996). Néanmoins, l'utilisation d'inhibiteurs d'élastases et de gélatinases (MMP2 et MMP9) se révèle inefficace dans la migration du PN au travers de

cellules endothéliales et de sa membrane basale sous-jacente (Mackarel *et coll.*, 1999). En outre, chez des souris déficientes en élastase (Belaaouaj *et coll.*, 1998) ou MMP9 (Betsuyaku *et coll.*, 1999), la migration des PN n'est pas modifiée. La présence de cellules endothéliales semble être importante dans la migration neutrophilique. Les cellules endothéliales sécrètent des MMPs et des sérines capables de dégrader les composants de la membrane basale. Il a été suggéré que l'endothélium prépare la membrane basale pour la migration neutrophilique, diminuant ainsi l'importance des protéinases sécrétées par le PN (Huber *et coll.*, 1989).

#### D Facteurs inducteurs du déplacement

En plus de l'adhérence intercellulaire, les leucocytes nécessitent un gradient de chémoattractants afin de diriger leur transmigration. Les chémoattractants sont des molécules solubles qui confèrent une direction au mouvement cellulaire. Les cellules migrent dans la direction de concentration croissante de chémoattractant par un procédé appelé la chimotaxie. Le terme chimotaxie, introduit par Pfeffer en 1884, décrit la migration des leucocytes le long d'un gradient de chémoattractants (Zachariae, 1993).

La production de chémoattractants dans l'environnement inflammatoire provient d'une combinaison de sources comme les produits bactériens (peptides formylés), les constituants cellulaires, les facteurs du complément (C5a), et les chémokines (IL8) produites par les cellules inflammatoires et non-inflammatoires (Ryan *et coll.*, 1966).

Les chémoattractants servent non seulement à diriger les leucocytes sur les lieux de l'inflammation, mais aussi à recruter une population spécifique de

leucocytes, en réponse à une infection bactérienne (neutrophiles), vers les sites d'inflammation allergique chronique ou d'infection par parasite (éosinophiles), et dans le cas d'inflammation chronique (monocytes) (Seely et coll., 2003).

*Les PN figurent parmi les premières cellules impliquées dans les réponses inflammatoires aux sites de lésions tissulaires. La pénétration de cellules immunitaires et la production de médiateurs pathogènes (cytokines inflammatoires, radicaux libres oxygénés, chimiokines chimio-attractrices) au cours de l'athérosclérose a amené à considérer cette dernière comme une pathologie à composante inflammatoire (Ross, 1999).*

## **II Athérosclérose et réponse inflammatoire**

### **1 Athérosclérose**

#### **A Définition**

Dans sa définition anatomique, l'athérosclérose est décrite comme l'association d'une sclérose et d'un dépôt lipidique riche en cholestérol (athérome ou cœur lipidique) en foyers (plaques) dans l'intima (couche interne) des artères de gros et moyen calibres (Capron, 1993).

#### **B Description cellulaire et tissulaire**

Les cellules qui peuplent les plaques d'athérome appartiennent à deux familles : cellules musculaires lisses artérielles originaires de la média (couche moyenne) et leucocytes originaires du sang (monocytes-macrophages et lymphocytes T) (Jonasson *et coll.*, 1986). Une forte proportion de ces cellules est dans un état stimulé, avec notamment une activité mitotique substantielle (Rekhter *et coll.*, 1995). Les cellules spumeuses (foam cells) sont des macrophages dont le cytoplasme est truffé de vacuoles lipidiques (Gown *et coll.*, 1986). Contrairement à l'endartère normale qui est dépourvue de vaisseaux, l'endartère athéroscléreuse est richement vascularisée par des néovaisseaux développés à partir des *vasa vasorum* de l'adventice (couche externe) ou directement à partir de la lumière de l'artère (O'Brien *et coll.*, 1994).

La rupture de la plaque est le résultat du déséquilibre entre les contraintes hémodynamiques auxquelles la chape fibreuse est soumise et sa solidité

intrinsèque, qui détermine sa résistance à la fracture (Mallat *et coll.*, 2004). La présence d'un pool lipidique important diminue nettement la résistance physique de la plaque, et les macrophages, par leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire, ajoutent à cette vulnérabilité. En revanche, les cellules musculaires lisses, en synthétisant la matrice extracellulaire, contribuent à la formation d'une chape fibreuse solide et à la stabilisation de la plaque. Ainsi, les plaques d'athérome pauvres en lipides avec une capsule fibreuse épaisse sont relativement stables et ont un risque moindre de rupture. Les petites plaques molles avec un noyau lipidique volumineux et une chape fibreuse fine sont par contre les plus vulnérables (Davies *et coll.*, 1985).

### C Pathogénie

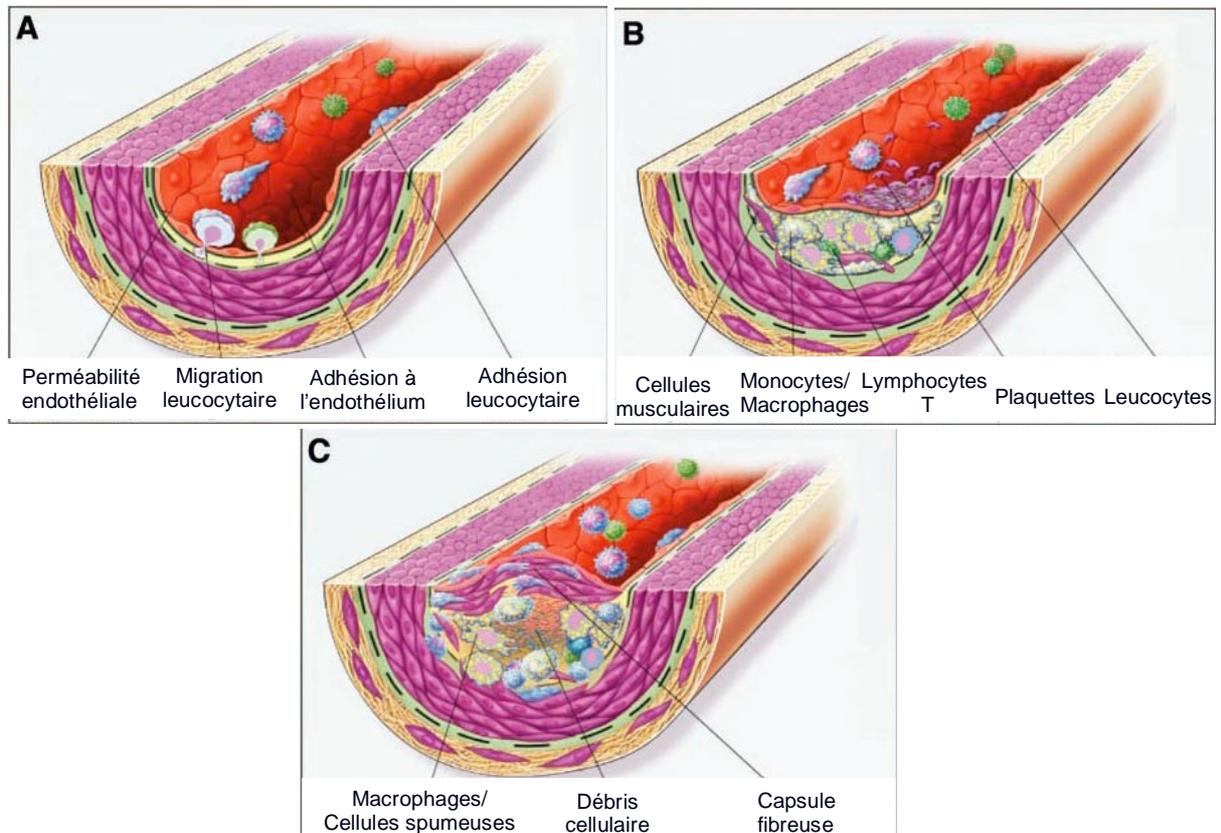
L'athérosclérose est une pathologie complexe, multifactorielle, dans laquelle les mécanismes cellulaires et moléculaires sont incomplètement connus (Kunsch *et coll.*, 1999). Différentes théories sur l'athérogénèse se sont succédées :

- *la théorie d'incrustation*, émise en 1852 par Karl von Rokinsky, proposait que la plaque résulte d'un dépôt excessif de produits dérivés du sang, principalement de la fibrine. On a retenu de cette théorie l'aspect thrombotique de l'athérogénèse;
- *la théorie de l'imbibition*, dont dérive l'actuelle théorie lipidique, est née en 1908. C'est en 1913 qu'Anichkov et Chalotov ont montré la responsabilité du cholestérol dans la survenue de l'athérosclérose, émettant l'hypothèse que la formation de l'athérome est le résultat d'une imbibition lipidique de la paroi artérielle;

- *la théorie inflammatoire*, elle, est basée sur l'observation des modifications que subit l'intima. Cette théorie avait déjà été conçue dans les années 1860 par Rudolf Virchow, puis a été relancée depuis les années 1970 sous l'impulsion de Russell Ross (Capron, 1993; Ross *et coll.*, 1976; Ross *et coll.*, 1976).

## 2 Théorie de la réponse inflammatoire

Parmi les différentes théories expliquant la pathogénèse de la plaque d'athérome, nous nous sommes intéressés à l'une des hypothèses appelée réponse à une lésion (Ross, 1999). L'hypothèse tire son plus solide argument du fait que les plaques présentent les attributs classiques de l'inflammation chronique : prolifération des cellules vasculaires, infiltrat leucocytaire, sclérose conjonctive (figure 4; Ross, 1999).



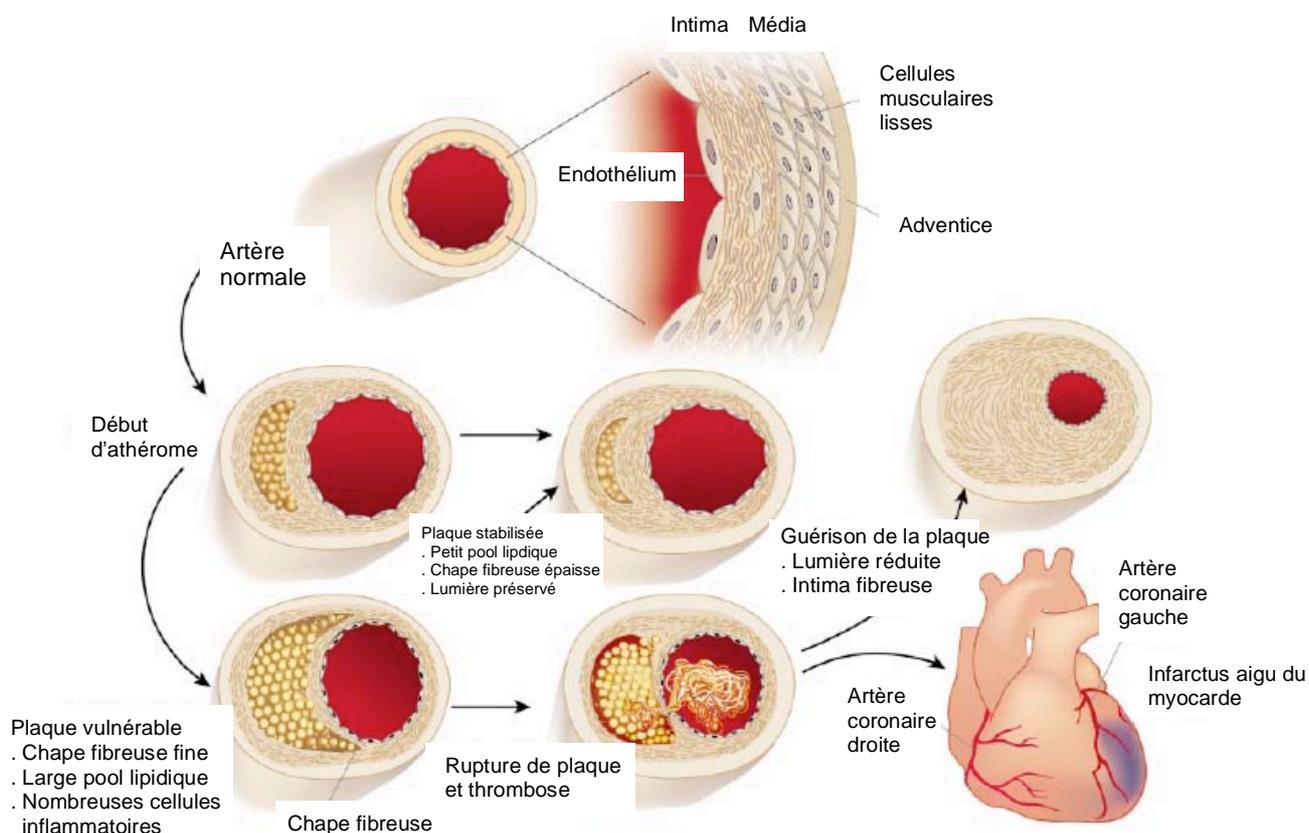
**Figure 4.** Pathogénèse de la plaque d'athérome d'après Ross (1999).

## A Pathogénèse

Le développement de l'athérosclérose est un processus lent, généralement rattaché à des lésions initiales portant sur les cellules endothéliales. En réponse à une lésion, des modifications apparaissent initiant une réponse compensatoire altérant les propriétés homéostatiques de l'endothélium. Différentes causes peuvent être à l'origine de la dysfonction de l'endothélium comme un taux élevé de radicaux libres causés par la fumée de cigarettes, l'hypertension, le diabète, les altérations génétiques, une concentration élevée d'homocystéine plasmatique, des microorganismes infectieux comme le virus de l'herpès ou *chlamydia pneumoniae* (Ross, 1999).

Les modifications des propriétés homéostatiques incluent l'augmentation de la perméabilité endothéliale aux lipoprotéines de faible densité (macromolécules complexes qui transportent des lipides plasmatiques hydrophobes; lipoprotéines de basse densité ou LDL) et aux autres constituants du plasma (Ross, 1999). Les LDL provenant du plasma peuvent être oxydés (LDLox) par des enzymes protéolytiques (métalloprotéinases matricielles, chymases, tryptases), des enzymes lipolytiques (phospholipases A2, lipases), des agents oxydants (iNos, NADPH oxydase) ou des métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) (Oorni *et coll.*, 2000). De plus, certains composants de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes, produits par les cellules musculaires lisses, sont capables de se lier aux lipides et de faciliter ainsi leur oxydation (Lee *et coll.*, 2001). Ces modifications aboutissent à l'accumulation de petites gouttelettes et vésicules lipidiques dans la matrice extracellulaire de l'intima (Oorni *et coll.*, 2000). L'endothélium, sollicité par les LDLox, exprime des molécules endothéliales (E-sélectine, P-sélectine,

molécule d'adhérence cellulaire intercellulaire de type 1 et molécule d'adhérence vasculaire de type 1) impliquées dans l'adhérence, la migration et l'accumulation des leucocytes dans la paroi artérielle (figure 5; Libby *et coll.*, 2002).



**Figure 5.** Les différentes étapes de la formation de la plaque athéromateuse d'après Libby *et coll.* (2002).

Les monocytes pénètrent dans l'espace sous-endothélial et après activation, internalisent les LDLox. Les monocytes acquièrent la morphologie caractéristique des macrophages et internalisent les LDLox par un mécanisme non soumis à régulation : en conséquence, la quantité de LDLox accumulée à l'intérieur des macrophages dépasse la capacité de ces derniers à les dégrader. Ces macrophages se transforment alors en cellules spumeuses, qui demeurent dans l'intima et constituent les premières lésions

d'athéromes (Caligiuri, 2004). Ils produisent alors une variété de médiateur de la réponse inflammatoire qui renforceront la migration leucocytaire, et exerceront un effet mitotique sur les cellules endothéliales (Bauters *et coll.*, 1999). Ce phénomène est accompagné de la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, où elles prolifèrent et produisent de la matrice extracellulaire riche en collagène, fibres élastiques et protéoglycanes (Libby *et coll.*, 2002). La composante cellulaire des plaques comprend également un grand nombre de lymphocytes, alertés par les cytokines et les chémokines produites par les macrophages, les cellules endothéliales et musculaires lisses activées. Ces lymphocytes expriment des marqueurs d'activation et reconnaissent les épitopes des LDLox (Stemme *et coll.*, 1995). Les peptides antigéniques dérivés des LDLox peuvent être présentés aux lymphocytes par les macrophages locaux (Nicoletti *et coll.*, 1999). Les lésions athéroscléreuses se présentent alors sous la forme de stries lipidiques, constituées d'un agrégat de cellules spumeuses, lymphocytes et cellules musculaires.

## B Développement de la plaque

Les lésions athéroscléreuses progressent d'un type simple vers des types plus compliqués et instables (figures 4 et 5). Elles tendent à former une capsule fibreuse qui conditionne la résistance de la plaque, composée de cellules musculaires lisses et d'une matrice extracellulaire couvrant un amas lipidique de consistance molle, formé de l'accumulation de cellules spumeuses et de débris cellulaires (Ross, 1999). Une plaque est dite instable, ou vulnérable, lorsqu'elle est particulièrement sujette à la rupture ou à

l'érosion. La composition de la plaque est un facteur déterminant de cette vulnérabilité : son contenu en lipides, en macrophages, en cellules musculaires lisses et en collagène conditionne grandement sa stabilité. La présence d'un pool lipidique important diminue nettement la résistance physique de la plaque, et les leucocytes ajoutent à cette vulnérabilité par leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire. En revanche les cellules musculaires lisses, en synthétisant la matrice extracellulaire, contribuent à la formation d'une chape fibreuse solide (Burke *et coll.*, 2002). La rupture ou l'érosion de la plaque d'athérosclérose instable constitue le mécanisme commun à tous les syndromes coronariens aigus. Les manifestations cliniques aiguës de la maladie athéroscléreuse, quelle qu'en soit la localisation, sont essentiellement dues à la formation d'un thrombus luminal au contact d'une plaque, obstruant plus au moins complètement la lumière artérielle et entraînant une ischémie. Le thrombus se développe au contact de la plaque lorsque l'endothélium qui le couvre est dénudé (érosion superficielle, 40% des cas) ou lorsque la plaque s'est rompue (rupture profonde, 60% des cas), exposant ainsi du matériel lipidique thrombogène au sang circulant (Virmani *et coll.*, 2000).

*La présence systémique de signes généraux d'inflammation est un marqueur de risque important de la survenue d'accidents ischémiques graves. En outre, localement, les zones de rupture de plaque sont caractérisées par leur richesse en cellules inflammatoires activées et plus particulièrement par l'importante concentration en cellules neutrophiles.*

### C Rôle des polynucléaires neutrophiles au cours de l'athérosclérose

Les PN figurent parmi les premières cellules impliquées dans les réponses inflammatoires aux sites de lésions tissulaires, et il est vraisemblable qu'ils prennent part au processus athéroscléreux, surtout pendant les phases d'instabilité clinique où l'inflammation devient détectable dans le sang circulant (Caligiuri, 2004). Leur durée de vie limitée tend à penser qu'ils interviendraient dans les phases d'inflammation aiguë, où l'inflammation devient détectable dans le sang circulant. Des études épidémiologiques et cliniques ont montré qu'une augmentation des leucocytes, et particulièrement des PN, est un facteur de risque à la survenue de syndromes coronariens (Madjid *et coll.*, 2004). Les PN s'accumulent dans les plaques de patients présentant des syndromes coronariens aigus (angor instable, infarctus aigu du myocarde). Ainsi, la présence de neutrophiles a été constatée dans 44% des lésions coronariennes aiguës (plaques érodées ou rompues). A contrario, les neutrophiles ne sont présents que chez 6% des patients présentant des lésions stables (Naruko *et coll.*, 2002). Des études cliniques ont montré *in vivo* l'activation des neutrophiles. Mehta *et coll.* (1989) ont ainsi montré une augmentation 15 fois supérieure du peptide B beta (produit de dégradation de la fibrine) chez les patients avec un angor instable comparé à ceux avec un angor stable (Mehta *et coll.*, 1989). Biasucci *et coll.* (1996) ont mesuré l'indice de la myéloperoxydase neutrophilique intracellulaire (MPO) et ont montré une production significative de cette MPO chez des patients avec des syndromes coronariens aigus (Biasucci *et coll.*, 1996).

Différentes stratégies ont été envisagées afin de réduire le nombre et la fonction neutrophilique. L'administration d'analogues de prostacyclines et

d'inhibiteurs de la cyclooxygénase a permis une réduction de la fonction neutrophilique. Le nombre de neutrophiles a également pu être réduit par addition d'anticorps anti-neutrophiles, ou par l'utilisation d'un synthétique chimique (BW755C) permettant une diminution de l'infiltration neutrophilique. Ces traitements ont entraîné une réduction de la zone infarctée ainsi que sa sensibilité à l'ischémie (Entman *et coll.*, 1991).

*L'invasion de la paroi vasculaire par les leucocytes conduit à l'inflammation du tissu vasculaire et se traduit par l'établissement d'un stress oxydatif. La présence de formes réactives de l'oxygène et de médiateurs inflammatoires au niveau du foyer athéroscléreux modifie l'expression des métalloprotéinases matricielles (Galis *et coll.*, 1995; Rajagopalan *et coll.*, 1996).*

### **III Les métalloprotéinases matricielles**

#### **1 Caractéristiques générales**

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs), sécrétées ou insérées à la membrane plasmique, sont constituées d'une vingtaine de membres appartenant à la famille des protéinases. Les enzymes de cette famille possèdent à leur site actif un atome de zinc, sont actives à pH physiologique (protéase neutre) et sont stockées dans les granules tertiaires. Elles sont importantes dans la résorption de la matrice extracellulaire dans les conditions physiologique et pathologique. La famille des MMPs peut être subdivisée en 4 groupes basés sur leur spécificité de substrat et leur structure primaire : les collagénases qui dégradent le collagène de type I et III, les gélatinases qui dégradent les composants de la membrane basale et partiellement le collagène de type IV, les stromélysines qui ont une large spécificité de substrat (protéoglycane, laminine, fibronectine, gélatine et le collagène de la membrane basale) et les métalloprotéinases membranaires qui dégradent de nombreux composants de la matrice extracellulaire et qui sont capables d'activer d'autres MMPs.

Il existe chez l'homme plus de vingt membres distincts (tableau 1) de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMPs), codés par des gènes différents et sécrétés par de nombreux types cellulaires. Ces enzymes sont des endopeptidases qui répondent aux critères suivants :

- une structure homologue (40 à 80% d'homologie en acides aminés) indiquant qu'elles dérivent d'un gène ancestral commun;

- un atome de zinc dans le domaine catalytique de l'enzyme;
- une activité dépendant de la biodisponibilité en ions calcium;
- une synthèse et une sécrétion sous forme de zymogènes inactifs latents (ProMMP);
- une capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire à pH physiologique (protéases neutres). Les différentes enzymes peuvent cliver chacune au moins un composant de la matrice. Chacune lyse préférentiellement un substrat spécifique mais peut également agir sur un autre substrat;
- une régulation à de multiples niveaux : transcription du gène et synthèse des zymogènes inactifs, activation post-transcriptionnelle des zymogènes, interaction avec des inhibiteurs spécifiques, les TIMP, ou à moindre degré par l' $\alpha$ -2-macroglobuline, inhibiteur non spécifique important de protéases (Beaudeau *et coll.*, 2004; Creemers *et coll.*, 2001).

Enzymes	MMPs Classification	Substrats
<b>Collagénases</b>		
Collagénase interstitielle	MMP1	Collagène de type 1, 2, 3, 4 et 10, gélatine, agrécane, entactine.
Collagénase de neutrophile	MMP8	Collagène de type 1, 2 et 3, agrécane.
Collagénase 3	MMP13	Collagène de type 1, 2 et 3, gélatine, fibronectine, laminine, tenascine.
Collagénase 4	MMP18	Inconnu.
<b>Gélatinases</b>		
Gélatinase A	MMP2	Gélatine, collagène de type 1, 4, 5, 7, et 10, agrécane, tenascine-C, vitronectine.
Gélatinase B	MMP9	Gélatine, collagène de type 4, 5 et 14, agrécane, élastine, entactine, vitronectine.
<b>Stromélysines</b>		
Stromélysine 1	MMP3	Gélatine, fibronectine, laminine, collagène de type 3, 4, 9 et 10, tenascine-C, vitronectine
Stromélysine 2	MMP10	Collagène de type 4, fibronectine, agrécane.
Stromélysine 3	MMP11	Fibronectine, gélatine, laminine, collagène de type 4, agrécane.
<b>MMPs membranaires</b>		
MT1-MMP	MMP14	Collagène de type 1, 2, et 3, fibronectine, laminine, vitronectine, protéoglycanes; active proMMP2 et ProMMP13.
MT2-MMP	MMP15	ProMMP2.
MT3-MMP	MMP16	ProMMP2.
MT4-MMP	MMP17	Fibrinogène, fibrine.
MT5-MMP	MMP24	ProMMP2.
MT6-MMP	MMP25	
<b>Autres MMPs</b>		
Matrylisine	MMP7	Gélatine, fibronectine, laminine, collagène de type 4, vitronectine, tenascine-C, élastine, agrécane.
Métalloélastase	MMP12	Elastine.
Non nommée	MMP19	Aggrécane.
Enamélysine	MMP20	Aggrécane.
	MMP23	
Endomestase	MMP26	

**Tableau 1.** Les métalloprotéinases matricielles et leurs substrats d'après (Creemers *et coll.*, 2001; English *et coll.*, 2000; Pendas *et coll.*, 2004).

Toutes les MMPs sont constituées de trois domaines : le prédomaine, nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la membrane, le prodomaine et le domaine catalytique. Le prédomaine est rapidement éliminé après la sécrétion cellulaire et est absent de la forme enzymatique active. Le prodomaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente, et est constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le site catalytique. Ce dernier contient un atome de zinc maintenu par trois résidus histidine au fond d'une structure peptidique tridimensionnelle en forme de poche. Le clivage protéolytique du prodomaine, libérant l'atome de zinc du résidu cystéine, entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors se lier à son substrat. La plupart des MMPs ont un quatrième domaine en position carboxyterminale. Cette chaîne polypeptidique est homologue de la vitronectine et de l'hémopexine et intervient dans la reconnaissance du substrat des MMPs (figure 6; Beaudoux *et coll.*, 2004; Creemers *et coll.*, 2001).

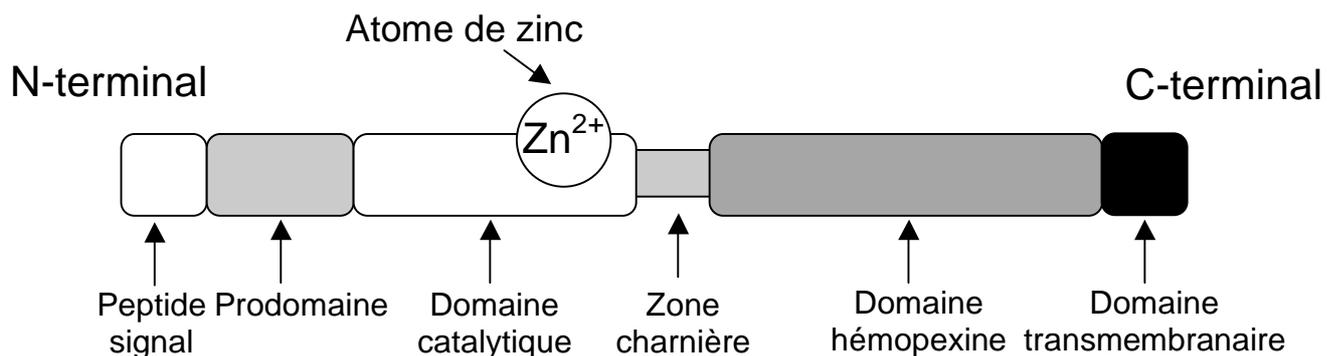
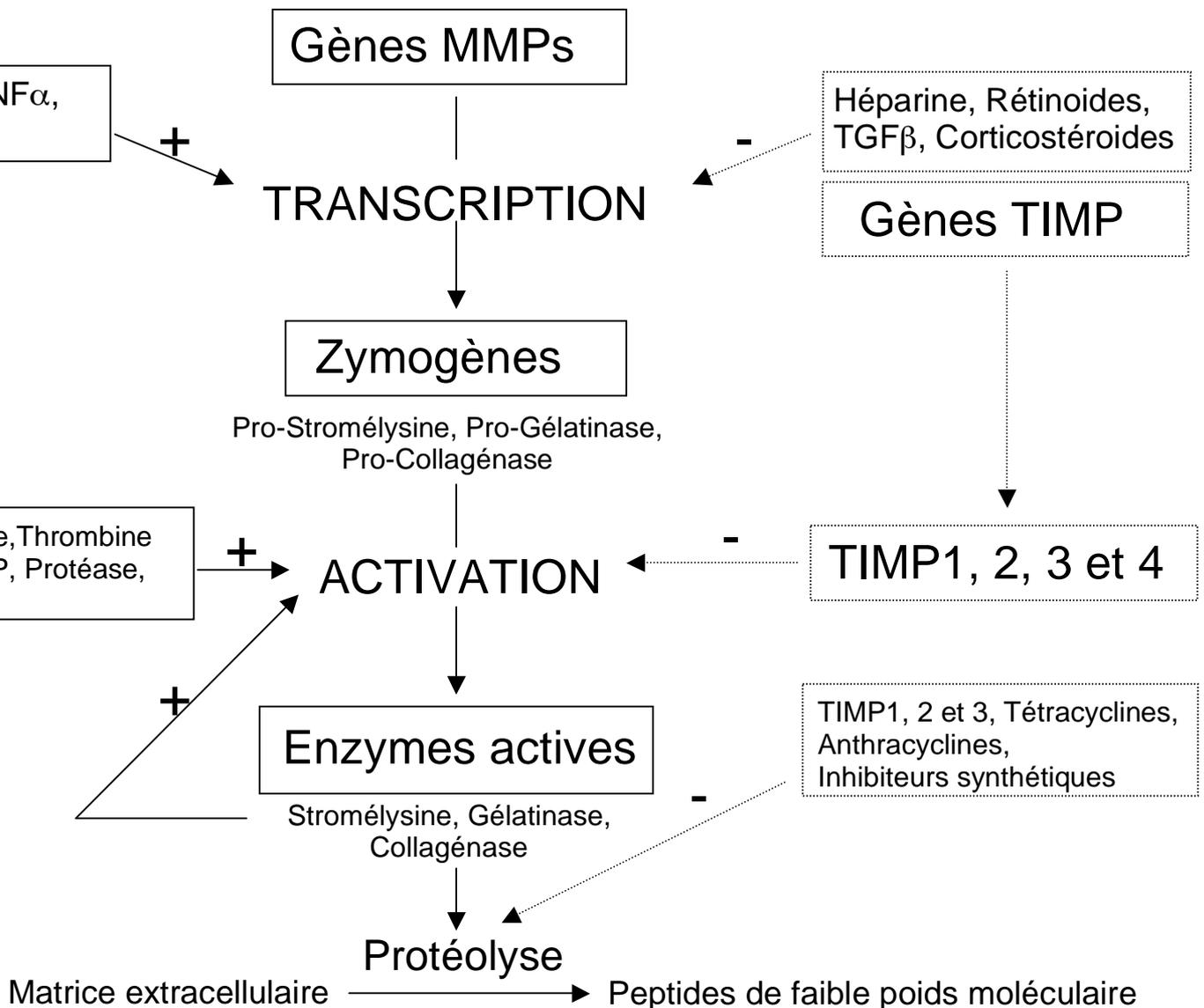


Figure 6. Domaines structuraux composant les métalloprotéinases matricielles d'après Visse *et coll.*, 2003.

## 2 Régulation des métalloprotéinases matricielles

L'expression et l'activité enzymatique des MMPs est étroitement régulée (figure 7).



**Figure 7.** Transcription, activation, et inhibition des métalloprotéinases matricielles. MMPs : métalloprotéinases matricielles; MT-MMP : métalloprotéinases membranaires; IL1 : interleukine 1; TNF $\alpha$  : facteur  $\alpha$  nécrosant les tumeurs; PDGF, facteur de prolifération plaquettaire; TGF $\beta$  : facteur  $\beta$  de croissance tumorale; TIMP : inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles; ERO : espèces réactives de l'oxygène; (d'après Beaudoux *et coll.*, 2004; Creemers *et coll.*, 2001; Dollery *et coll.*, 1995).

## A Expression

De nombreux facteurs de croissance, cytokines, hormones et ERO modulent l'expression des MMPs au niveau transcriptionnel. L'interleukine 1 (IL1) (Gurjar *et coll.*, 2001), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Robbins *et coll.*, 1999), le facteur  $\alpha$  nécrosant les tumeurs (TNF $\alpha$ ) (Lee *et coll.*, 1996), l'angiotensine II (Wang *et coll.*, 2005) ou les ERO (Rajagopalan *et coll.*, 1996; Siwik *et coll.*, 2001) sont des agents stimulant la synthèse cellulaire des MMPs, alors que l'héparine, les corticoïdes et le facteur  $\beta$  de croissance tumorale (TGF $\beta$ ) (Baricos *et coll.*, 1999) inhibent l'expression des MMPs.

## B Activation

Les métalloprotéinases matricielles sont sécrétées sous une forme latente (ProMMP) qui requiert l'activation dans l'espace extracellulaire, second niveau de contrôle. L'activation des MMPs implique souvent l'action de protéases comme la plasmine, la trypsine, l'élastase ou la chymase. Parmi ces protéases, la plasmine est l'un des activateurs physiologique les plus important des MMPs (Lee *et coll.*, 1996). Les niveaux ultérieurs d'activation des MMPs constituent une boucle de rétrocontrôle, au cours de laquelle l'activation d'une MMP conduit à l'activation d'une autre, qui aboutit à l'activation d'une troisième, etc... (Visse *et coll.*, 2003). Ainsi, la plasmine active ProMMP1, ProMMP3 et ProMMP9 en leur formes actives respectives, puis MMP3 active ProMM1 en MMP1 qui est elle-même capable d'activer ProMMP9 (Beaudeau *et coll.*, 2004).

L'activation des MMPs à la surface cellulaire est importante pour la migration à travers la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases membranaires (MT-MMPs) sont des activateurs importants de MMPs, en particulier de la MMP2 (Sato *et coll.*, 1994). L'activation de la ProMMP2, qui est alors concentrée à la surface des cellules, facilite les phénomènes de migration cellulaire (Koshikawa *et coll.*, 2000). On peut également citer la thrombine, enzyme impliquée dans la coagulation plasmatique, comme activateur des MMPs (Oak *et coll.*, 2004).

*In vitro*, les MMPs sont activées par une modification physique (pH acide, liaison avec du dodécyl sulfate de sodium) ou chimique (acide 4-aminophénylmercurique) (Newby, 2005). L'hypothèse de l'implication d'un résidu cystéine expliquerait l'activation *in vitro* par une variété d'agents ayant en commun une caractéristique : la réactivité avec le groupement thiol. Dans ce modèle, l'atome de zinc présent au site actif est lié aux groupements thiols des cystéines du prodomaine. La rupture de cette interaction peut représenter une étape critique dans l'initiation de l'autoactivation des MMPs (Van Wart *et coll.*, 1990).

Les MMP2 et MMP9 possèdent des caractéristiques biochimiques particulières puisqu'elles ont un prodomaine riche en résidus cystéines, présumant une sensibilité particulière aux formes réactives de l'oxygène. Ainsi les MMP2 et MMP9 peuvent être activées au sein de la matrice extracellulaire par une production importante de radicaux libres de l'oxygène, augmentant ainsi l'activité métalloprotéasique locale (Rajagopalan *et coll.*, 1996).

## C Inhibiteurs

La fixation des MMPs à des inhibiteurs physiologiques est un autre moyen de régulation locale de l'activité métalloprotéasique matricielle. Les quatre TIMP identifiés à ce jour, nommés TIMP1, 2, 3 et 4, inhibent l'activité de toutes les MMPs par formation d'un complexe non-covalent de stœchiométrie 1:1 avec avec le proenzyme ou l'enzyme sous forme active. Ce complexe MMP-TIMP est stable et irréversible, par blocage de l'accès à la poche contenant l'atome de zinc (Strongin *et coll.*, 1993; Wilhelm *et coll.*, 1989).

*Les MMPs sont en général faiblement exprimées dans les tissus sains, leur expression augmentant lors de processus de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique, sous l'effet de facteurs capables de moduler la transcription de leurs gènes. Dans le cadre des maladies cardiovasculaires, le rôle capital des MMPs a été reconnu ces dernières années tant pour favoriser l'hyperplasie intimale artérielle que lors de la fragilisation de la lésion athéroscléreuse avancée, qui aboutira finalement à sa rupture (Beaudeau *et coll.*, 2004).*

### **3 Rôle des métalloprotéinases matricielles au cours de l'athérosclérose**

Les MMPs sont normalement peu ou pas exprimées dans la paroi des artères saines, à l'exception de la MMP2 qui est produite de façon constitutive par les cellules musculaires lisses. La comparaison d'artères saines et d'artères athéroscléreuses (coronaires ou carotides) a montré la présence de MMPs au sein des plaques. Certaines études ont montré une augmentation des formes circulantes (proenzymes, formes actives ou complexées) de MMPs au cours

d'accidents cardiovasculaires aigus (Kai *et coll.*, 1998) mais également chez des patients avec une athérosclérose précoce (Noji *et coll.*, 2001).

#### A Implication dans la migration cellulaire

La formation de la plaque d'athérome est associée à une modification de la matrice extracellulaire sous-endothéliale vasculaire, nécessaire pour permettre l'infiltration lympho-monocytaire, la formation du cœur lipidique puis nécrotique, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses lors de la formation de la chape fibreuse. Ces modifications sont sous la dépendance des MMPs exprimées par les cellules musculaires lisses (Mason *et coll.*, 1999) et les macrophages (Galis *et coll.*, 1995) au cours de l'athérosclérose. L'épaississement de l'intima est constitué par la génération de nouveaux tissus, en partie provenant des cellules musculaires lisses issues de la media, et des leucocytes circulants issus du sang.

Dans les veines humaines, l'activation et l'expression des MMP2 et MMP9 sont continues lors de la formation de la néointima (George *et coll.*, 1997). Des MMP2 et MMP9 actives ont été détectées dans la media et la neointima par zymographie *in situ* (George *et coll.*, 1997; Kranzhofer *et coll.*, 1999).

De nombreuses études ont observé une surexpression des MMP2 et MMP9 lors de la formation de la néointima sur des modèles animaux. L'induction de la MMP2 et MMP9 a lieu rapidement après un dommage sur les artères de rat (Bendeck *et coll.*, 1994; Zempo *et coll.*, 1994), de porc (Southgate *et coll.*, 1996), de souris (Godin *et coll.*, 2000), de singe ou de lapin (Aoyagi *et coll.*, 1998).

L'inflammation figure parmi les mécanismes responsables de l'induction et de l'expression des MMPs au cours de la formation de la néointima. Les

dommages causés sur des artères carotides de rat entraînent une faible réponse inflammatoire (Uglow *et coll.*, 2003). Néanmoins, les dommages causés sur des artères de lapin et de porc provoquent une réaction inflammatoire caractérisée par une infiltration neutrophilique suivie d'un dépôt de macrophages (Kim *et coll.*, 2000; Tanaka *et coll.*, 1993; West *et coll.*, 2001).

## B Implication dans la rupture de plaques

L'importance des MMPs dans la déstabilisation des plaques a été soulignée par l'observation d'une expression locale de MMP2, MMP3 et MMP9 et de leur activité protéolytique *in situ* dans les lésions (Galis *et coll.*, 1995; Galis *et coll.*, 1995). Ces données ont été confirmées par la présence de la MMP9 sur les sites de lésions athéroscléreuses (tableau 2) (Brown *et coll.*, 1995; Carrell *et coll.*, 2002; Reinhardt *et coll.*, 2002). D'autres travaux ont confirmé ou étendu ces résultats. Dans les plaques d'athérosclérose, principalement aux zones d'épaulement, on trouve un niveau élevé de MMP1, MMP2 (Li *et coll.*, 1996), MMP3, MMP7, MMP9 (Brown *et coll.*, 1995; Galis *et coll.*, 1994). Une athérectomie a montré une importante expression des MMP9 chez des patients présentant des syndromes coronariens aigus (Brown *et coll.*, 1995).

L'augmentation dans le sérum du niveau de MMP9 est fortement associée à d'autres marqueurs inflammatoires et aux risques cardiovasculaires (Blankenberg *et coll.*, 2003). Kai *et coll.* ont montré une forte activité MMP9 après un infarctus aigu du myocarde (Kai *et coll.*, 1998).

MMPs exprimées	MMPs non-exprimées
MMP1 (collagénase interstitielle)	MMP8 (collagénase du neutrophile)
MMP2 (gélatinase A)	MMP10 (stromélysine 2)
MMP3 (stromélysine 1)	MMP13 (collagénase 3)
MMP7 (matrylisine)	
MMP9 (gélatinase B)	
MMP11 (stromélysine A)	
MMP12 (élastase macrophagique)	
MMP14 (MT métalloprotéinase 1)	MMP15 (MT métalloprotéinase 2)
MMP17 (MT métalloprotéinase 4)	MMP16 (MT métalloprotéinase-3)
TIMP1	
TIMP2	TIMP3
TIMP4	

Tableau 2. Expression de certaines métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs physiologiques dans la paroi artérielle de patients atteints de pathologie aortique occlusive ou anévrysmale d'après Carrell *et coll.* (2002).

*Toutes ces études suggèrent une relation positive entre l'expression de la MMP9 et l'instabilité de la plaque athéroscléreuse.*

## OBJECTIFS

L'athérosclérose est une maladie dégénérative des artères comportant un épaississement et un durcissement de leur paroi, gênant la circulation sanguine. Elle est le siège d'une réaction inflammatoire impliquant les cellules immunitaires et les cellules vasculaires composant la paroi artérielle. L'activation et l'infiltration des leucocytes se traduisent, entre autres, par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'établissement d'un stress oxydant ou stress oxydatif. Le foyer inflammatoire, entretenu par les ERO et les cytokines produites par les différents acteurs cellulaires impliqués, conduit à l'activation des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces enzymes participent au remodelage de la paroi artérielle. Ainsi, une sécrétion accrue de MMPs par les leucocytes et les cellules vasculaires conditionne l'évolution de la plaque et sa fragilisation.

*Les objectifs de ces travaux de doctorat ont été de :*

- *réaliser une étude préalable sur les capacités sécrétoires et migratoires d'un modèle de neutrophiles humains,*
- *caractériser les effets d'un stress oxydatif sur l'activité MMP2 et MMP9 de cellules vasculaires de coronaires humaines, endothéliales ou musculaires,*
- *déterminer l'existence d'interactions potentielles entre un modèle de neutrophiles humains et des cellules vasculaires humaines, en caractérisant la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 ainsi que la mobilité cellulaire,*
- *préciser le rôle d'espèces réactives de l'oxygène dans ces interactions cellules-cellules et identifier certains médiateurs.*

## **MATERIELS ET METHODES**

### **I Matériel biologique**

#### **1 Cellules musculaires**

##### **A Réactifs**

Le milieu de culture SmBM et ses suppléments ont été fournis par Lonza (Verviers, Belgique).

##### **B Culture cellulaire**

Les cellules musculaires lisses de coronaires humaines (HCSMC), issues d'un donneur mâle âgé de 27 ans (lot 2F1373), ont été fournies par Lonza. Elles sont adhérentes et sont cultivées dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> à 37°C en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub>. A un volume de 500 mL de milieu SmBM-2 (Lonza) on ajoute 25 mL de sérum bovin fœtal inactivé ainsi que les volumes suivants de concentrations inconnues (kit Lonza) : 0,5 mL de hEGF (human recombinant Epidermal Growth Factor), 0,5 mL d'insuline, 2 mL de hFGF (human recombinant Fibroblast Growth Factor), 0,5 mL de gentamicine et d'amphotéricine-B. Pour les expériences, les HCSMC sontensemencées dans des plaques de 12 puits avec 1,5 mL de milieu, à raison 76000 cellules par puits, suivant les modes opératoires fournis par Lonza pour ces cellules.

## 2 Cellules endothéliales

### A Réactifs

Le milieu de culture EGM2-MV et ses suppléments ont été fournis par Lonza (Verviers, Belgique).

### B Culture cellulaire

Les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines (HCAEC), issues d'un donneur mâle âgé de 35 ans (lot 3F025), ont été fournies par Lonza. Elles sont adhérentes et sont cultivées dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> à 37°C en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub>. A un volume de 500 mL de milieu EGM-2-MV (Lonza) on ajoute 25 mL de sérum bovin foetal inactivé ainsi que les volumes suivants de concentrations inconnues (kit Lonza) : 0,5 mL de hEGF (human recombinant Epidermal Growth Factor), 2 mL de hFGF (human recombinant Fibroblast Growth Factor), 0,5 mL de VEGF (vascular endothelial growth factor), 0,5 mL d'acide ascorbique, 0,2 mL d'hydrocortisone, 0,5 mL de Long R<sub>3</sub>-IGF1 (human recombinant insulin-like growth factor), 0,5 mL d'héparine, 0,5 mL de gentamicine et d'amphotéricine-B. Pour les expériences, les HCAEC sontensemencées dans des plaques de 12 puits avec 1,5 mL de milieu, à raison de 65000 cellules par puits, suivant les modes opératoires fournis par Lonza pour ces cellules.

### **3 Lignée promyélocytaire HL60**

#### **A Réactifs**

Le milieu de culture RPMI-1640 et ses suppléments ont été fournis par Lonza.

#### **B Culture cellulaire**

La lignée promyélocytaire HL60 est cultivée dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal inactivé, 100 µg/mL de streptomycine, 100 unités/mL de pénicilline et 2 mM de L-glutamine. La différenciation des cellules en un modèle de neutrophiles est induite par addition de 1,3 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant 4 jours (Collins, 1987).

## **II Traitement des cellules endothéliales et musculaires**

### **1 Traitement par le N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine, le peroxyde d'hydrogène et le mélange xanthine/xanthine oxydase**

#### **A Réactifs**

Le N-formyl-L-Méthionyl-L-Leucyl-L-Phénylalanine (fMLF), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la xanthine (X) et la xanthine oxydase (XO) ont été fournis par Sigma Chemical Co (Bornem, Belgique).

#### **B Prétraitement**

Le lendemain de leur ensemencement en boîtes 12 puits, les HCSCMC et les HCAEC sont lavées 2 fois avec du milieu sans sérum et incubées, pour les

expériences, avec  $10^{-6}$  M de fMLF, 5  $\mu$ M de  $H_2O_2$  et un mélange de 100  $\mu$ M de xanthine et 5 mU.mL<sup>-1</sup> de xanthine oxydase (X/XO) (Rajagopalan *et coll.*, 1996).

## 2 Traitement par le milieu conditionné

Les cellules différenciées au DMSO ( $\neq$ HL60) sont stimulées ( $10^6$ ,  $3 \times 10^6$ , et  $10^7$  cellules/mL, pendant 5 minutes) par addition d'une concentration de fMLF ( $10^{-6}$  M) permettant une sécrétion maximale d'ions superoxyde (Valentin *et coll.*, 2001). Le surnageant est ensuite prélevé puis ajouté aux HCSCMC en culture en plaques 12 puits.

## 3 Coculture avec un modèle de neutrophiles

### A Réactifs

Le dispositif Transwell<sup>®</sup> a été fourni par Corning (Koolhovenlaan, Pays-Bas). Les inserts Transwell<sup>®</sup> sont en polycarbonate avec un diamètre de pores de 0,4  $\mu$ m (figure 8).

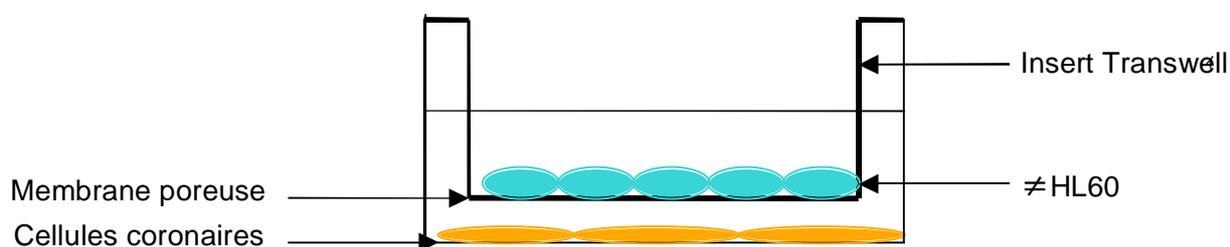


Figure 8. Dispositif Transwell<sup>®</sup>

## **B Prétraitement**

Le lendemain de leur ensemencement en boîtes 12 puits, les HCSCMC ou les HCAEC sont lavées deux fois avec du milieu sans sérum et incubées, pour les expériences, pendant 24h avec un modèle de neutrophiles. Les cellules différenciées ( $\neq$ HL60 à 8 ou 9 X 10<sup>5</sup> cellules/0,5 mL) sont placées sur un insert Transwell<sup>®</sup>, donc séparées des HCSCMC et des HCAEC par une membrane poreuse, puis stimulées par du fMLF (10<sup>-6</sup> M) en présence ou non de SOD (200 U.mL<sup>-1</sup>) ou de catalase (25 U.mL<sup>-1</sup>).

## **III Etudes moléculaires**

### **1 Extraction de l'ARN**

L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec le Kit Invisorb<sup>™</sup> Spin Cell RNA (Invitex GmbH, Berlin, Allemagne). Les concentrations en RNA total ont été déterminées sur le spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) par mesure du rapport aux longueurs d'onde 260/280 nm.

## 2 Transcription réverse

La transcription réverse a été réalisée dans un volume de réaction de 21  $\mu\text{L}$  contenant 300 ng de cDNA, 15 unités de transcriptase réverse, 10 mM de dNTP, 1  $\mu\text{L}$  de random hexamer, 8  $\mu\text{L}$  de tampon pour la synthèse du cDNA, 1  $\mu\text{L}$  de DTT, 1  $\mu\text{L}$  de RNase OUT, 1  $\mu\text{L}$  de RNase H et de l'eau.

## 3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi quantitative

La PCR semi quantitative a été réalisée dans un volume réactionnel de 50  $\mu\text{L}$  avec 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 unité de Taq polymérase, 0,2 mM de dNTP, 25  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  d'amorces et 2  $\mu\text{L}$  de cDNA.

Les séquences de primers utilisés sont :

Pour la MMP9, 5'-CCCTTGTGCTCTTCCCTGGAG-3' (sens) et 5'-CACAACCTCGTCATCGTCGAA-3' (antisens).

Pour la MMP2, 5'-GGCAGTGCAATACCTGAACA-3' (sens) et 5'-CTCCCAAGGTCCATAGCTCA-3' (antisens).

Pour l'actine, 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3' (sens) et 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3' (antisens).

Les conditions de réalisation de la PCR semi-quantitative sont les suivantes : 95°C pendant 3 min et 35 cycles à 95°C pendant 50 sec, 55°C pendant 50 sec et 72°C pendant 1 min avec une élongation finale à 72°C pendant 1 min. Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

#### 4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

##### A Etude de l'expression des MMP9

La PCR en temps réel (Real Time PCR) est réalisée dans un volume réactionnel de 75  $\mu\text{L}$  composé de 20  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de primers, du supermix iQ SYBR Green (100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH=8,4, 0,4 mM de dNTP, 50  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de iTaq DNA polymérase, 6mM de  $\text{MgCl}_2$ , du SYBR Green I, 20 nM de fluorescéine) et de 15 ng de cDNA. Les séquences de primers (Eurogentec) utilisés pour la PCR en temps réel sont :

Pour la MMP9, 5'-TCTTCCCTGGAGACCTGAGA-3' (sens) et 5'-ACCCGAGTGTAACCATAGCG-3' (antisens).

Pour la MMP2, 5'-ACGACCGCGACAAGAAGTAT-3' (sens) et 5'-ATTTGTTGCCAGGAAAGTG-3' (antisens).

Pour l'actine 5'-TGACCCAGATCATGTTTGAGA-3' (sens) et 5'-AGTCCATCACGATGCCAGT-3' (antisens).

Les conditions de réalisation de la PCR en temps réel sont les suivantes : 95°C pendant 3 min et 40 cycles à 95°C pendant 10 sec et 60°C pendant 30 sec. Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

##### B Etude de l'expression de l'ARNm des cytokines proinflammatoires et des récepteurs par les HCSMC

L'analyse de l'expression de l'ARNm des cytokines proinflammatoires et des récepteurs par les HCSMC a été réalisée avec le kit RT<sup>2</sup>Profiler™ PCR arrays (SuperArray Inc., Bethesda, MD). La PCR en temps réel (Real Time PCR) est réalisée dans un volume réactionnel final de 2550  $\mu\text{L}$  composé de 1275  $\mu\text{L}$  de

supermix iQ SYBR Green (100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH=8,4, 0,4 mM de dNTP, 50 U.mL<sup>-1</sup> de iTaq DNA polymérase, 6mM de MgCl<sub>2</sub>, du SYBR Green I, 20 nM de fluorescéine), d'un volume de 102 µL contenant l'ADNc et de 1173 µL d'eau.

Pour ces expériences, nous avons utilisé les plaques 96 puits fournies, sur lesquelles ont été préalablement fixés les primers des 84 cytokines et récepteurs testés.

Les conditions de réalisation de la PCR en temps réel sont les suivantes : 95°C pendant 10 min et 40 cycles à 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 1 min.

Les valeurs de cycles seuil (Ct) ont ensuite été déterminées. Les valeurs dépassant les 35 Ct sont considérées comme trop faibles pour avoir une signification biologique. Le niveau d'expression a été normalisé avec la valeur de Ct obtenue pour les gènes de ménage (bêta-2-microglobuline, Hypoxanthine phosphoribosyle transférase 1, Protéine Ribosomale L13a, Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et Actine bêta).

Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

#### **IV Etudes biochimiques**

##### **1 Test ELISA**

###### A Principe

Le principe du test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est de doser des antigènes en fixant sur ceux-ci des anticorps associés à des

enzymes (figure 9). Ces enzymes donneront une réaction colorée en présence de leur substrat.

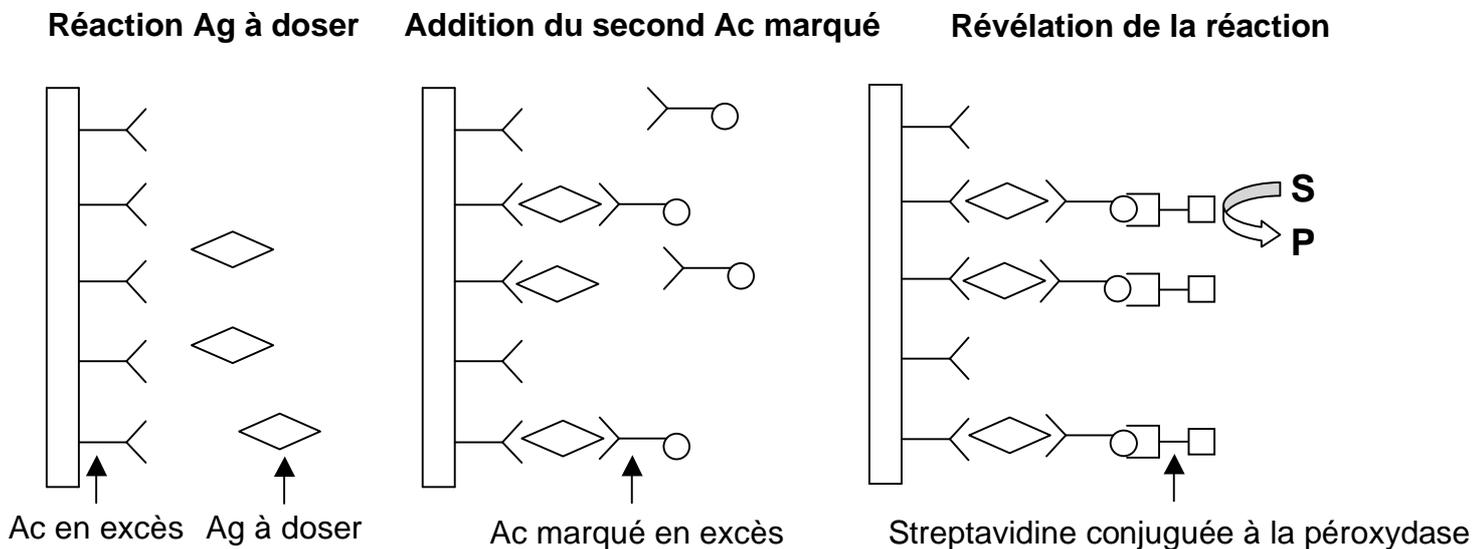


Figure 9. Principe du test ELISA. Ac : Anticorps, Ag : Antigène, S : substrat, P : produit.

### B Protocole

Un anticorps spécifique de la protéine MMP9 ou MMP2 a été immobilisé sur la surface des puits. Les échantillons non dilués de surnageant ont été déposés en présence d'un anticorps biotinylé monoclonal et incubés pendant 2 heures. L'anticorps biotinylé se lie à l'antigène fixé à la phase solide, puis la streptavidine conjuguée à la peroxydase se lie à la biotine. La peroxydase catalyse la conversion du substrat chromogénique tétra-méthylbenzidine. Après un temps de fixation enzyme-substrat, la réaction est stoppée. Le produit de la réaction est quantifié par spectrophotométrie. Pour chaque expérience, une courbe standard est réalisée avec des concentrations connues des protéines en question. Les valeurs d'absorbance obtenues pour

les échantillons sont reportées sur la courbe standard afin de déterminer la concentration en protéines.

## **2 Zymographie et analyse densitométrique**

### **A Réactifs**

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS), l'acrylamide, le persulfate d'ammonium (APS), le Tris-HCl, le TEMED et le bleu de Coomassie ont été fournis par Bio-Rad (Nazareth, Belgique), les gélatines A et B par Sigma Chemical Co. Tous les autres produits chimiques et analytiques ont été obtenus chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

### **B Migration électrophorétique**

La zymographie est une électrophorèse réalisée en gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS), de gélatine de type A (extraite de tête de porc) et de gélatine de type B (extraite de tête de bovin). Le gel de migration est réalisé avec 10% de SDS, 10% d'acrylamide, et un mélange de gélatines de type A et B à raison de 5 mg/mL chacune. Le gel de concentration est réalisé sans gélatines avec 4% d'acrylamide et 10% de SDS. Les échantillons de surnageant sont ajoutés au tampon de Laemmli (dilution 1/2) dépourvu d'agents réducteurs et déposés sur le gel de concentration. Après la migration (2 h, 100 V constants), les protéines du gel sont renaturées par échange du SDS avec du triton X-100 (3 fois 15 minutes d'incubation avec 2,5% de triton X-100) (Galis *et coll.*, 1994a). Le gel est incubé pendant 24 heures à 37°C dans du tampon (50mM Tris-HCl, pH 7,4,

10 mM CaCl<sub>2</sub> et 0,05% Brij 35). L'incubation terminée, l'activité gélatinolytique est révélée par 15 minutes d'incubation dans du bleu de Coomassie (0,1% de bleu de Coomassie, 40% de méthanol et 10% d'acide acétique), puis 5 minutes dans du décolorant (30% de méthanol et 10% d'acide acétique).

Les gels sont contrastés pendant 24 h à 4°C dans une solution de contrastant (5% de glycérol et 10% d'acide acétique) avant leur analyse densitométrique qui a pour objectif de quantifier l'activité enzymatique de l'enzyme par mesure des variations de niveaux de gris.

### C Analyse densitométrique

Les zymographies ont été numérisées à l'aide du système Chemilux Imager (Intas, Göttingen, Allemagne) et leur analyse densitométrique a été réalisée grâce au programme Gel Pro Express 4.0 (Intas).

Le programme représente l'étendue (axe x) et l'intensité (axe y) de la bande de substrat lysé par l'enzyme. L'aire délimitée sous la courbe, représentant l'activité enzymatique, est ensuite calculée. Les résultats sont exprimés en Densité Optique Intégrée (DOI).

## V Etudes fonctionnelles

### 1 Principe

Les expériences de chémotaxie et d'invasion, basées sur le principe des chambres de Boyden, ont été réalisées sur des plaques 96 puits. Ces plaques contiennent 96 inserts constitués d'une membrane poreuse, recouverte, pour

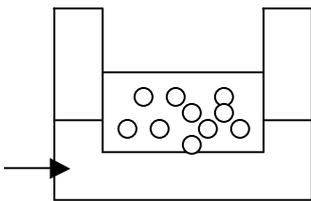
les expériences d'invasion, d'un modèle de matrice extracellulaire composée de laminine, de collagène de type IV et d'entactine.

Les cellules ayant migré sur la face inférieure de l'insert ou carrément dans le puits sont lysées puis quantifiées par la sonde CyQuant GR. Cette sonde révèle une forte fluorescence lorsqu'elle se lie aux acides nucléiques. La mesure est réalisée au moyen d'un spectrofluorimètre à 480 et 520 nm de longueur d'onde.

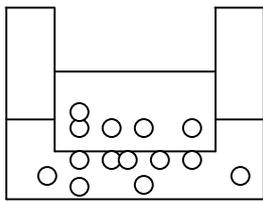
## **2 Protocole**

Le lendemain de leur ensemencement en plaques 96 puits, les HCSCMC sont lavées deux fois avec du milieu sans sérum. Pour les expériences, les puits sont chargés avec du milieu en présence ou non de ces cellules avec ou sans fMLF ( $10^{-8}$  M). Les cellules myéloïdes différenciées et non différenciées ( $\neq$ HL60 et HL60, à  $2 \times 10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup>) sont placées dans l'insert en présence ou pas de SOD ou de catalase. Les expériences de chémotaxie (figure 10) et d'invasion (figure 11) sont respectivement réalisées pendant 2 et 6 h.

Milieu (+/- fMLF et +/- HCSMC)

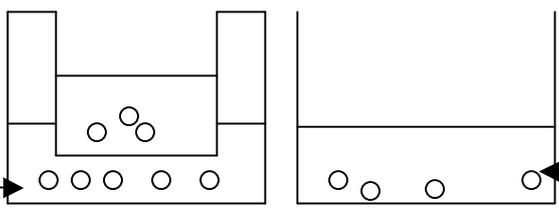


Une suspension cellulaire de HL60 ou de  $\neq$ HL60 est placée dans l'insert.



Les cellules attachent à la face inférieure de l'insert et migrent dans le puits.

Les cellules sur la face inférieure de l'insert sont libérées par un tampon de détachement.



Cellules ayant migré dans le puits.

Tampon de lyse



Les cellules provenant de la face inférieure de l'insert et du puits sont lysées et quantifiées par la sonde CyQuantGR.

Figure 10. Protocole pour les expériences de chémotaxie.

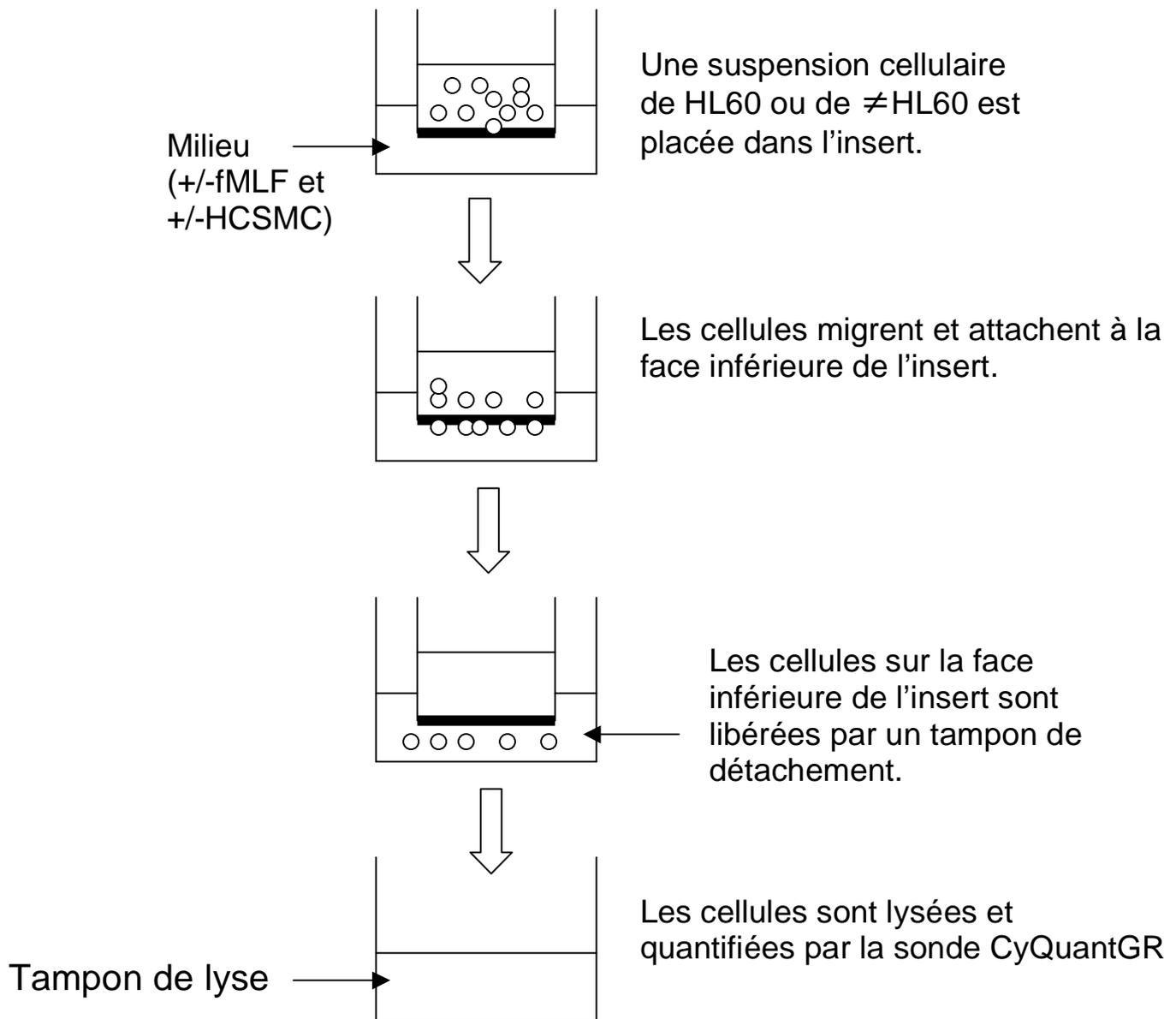


Figure 11. Protocole pour les expériences d'invasion.

### 3 Mises au point

#### A Optimisation des concentrations cellulaires

Les intensités de fluorescence des cellules HL60 et  $\neq$ HL60, en réponse à la sonde CyQuantGR, ont été mesurées pour différentes concentrations afin de déterminer les valeurs de fluorescence correspondantes (tableau 3).

Nombre de cellules/puits	Fluorescence (unités arbitraires)			
	HL60		$\neq$ HL60	
	Moyenne	E.S.M.	Moyenne	E.S.M.
12500	943	123	836	109
25000	1661	293	1705	300
37500	2338	203	2393	208
50000	3179	244	3597	298
62500	4031	133	4018	263
75000	5413	269	5179	111
87500	5707	321	5870	67
100000	6687	93	6429	212

Tableau 3. Fluorescence induite par la sonde CyQuantGR à différentes concentrations cellulaires (n=3).

Les HL60 et les  $\neq$ HL60 ont des valeurs de fluorescence statistiquement non différentes à chaque concentration. Pour les expériences,  $2 \times 10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> cellules sont placées dans l'insert. Les mesures de fluorescence sont réalisées sur des échantillons cellulaires dilués au 1/2. Ainsi, les valeurs approchant les 6500 unités de fluorescence signifient que la totalité des cellules a migré.

#### B Détermination du temps de migration et de la concentration de chémoattractant

Les expériences de chimotaxie, à travers une membrane poreuse de 8  $\mu$ m de diamètre de pores, et d'invasion, à travers une membrane poreuse de 8  $\mu$ m recouverte d'un modèle de matrice extracellulaire, ont été réalisées pendant 24 heures.

Fluorescence (unités arbitraires)				
Chémotaxie	HL60		≠HL60	
24 h	Moyenne	E.S.M.	Moyenne	E.S.M.
Contrôle	4322	1701	5431	671
10 <sup>-6</sup> M	3174	1174	4479	423
10 <sup>-7</sup> M	5758	2303	6493	1113
10 <sup>-8</sup> M	7273	2692	7292	1120
10 <sup>-9</sup> M	4678	1746	5200	851
10 <sup>-10</sup> M	5201	1684	7381	1378

Fluorescence (unités arbitraires)				
Invasion	HL60		≠HL60	
24 h	Moyenne	E.S.M.	Moyenne	E.S.M.
Contrôle	1566	185	2786	618
10 <sup>-6</sup> M	1660	41	1961	639
10 <sup>-7</sup> M	1338	84	2605	373
10 <sup>-8</sup> M	1536	173	2965	278
10 <sup>-9</sup> M	1136	382	3592	203
10 <sup>-10</sup> M	1470	316	3279	476

**Tableau 4.** Fluorescence induite par la sonde CyQuantGR à différentes concentrations de chémoattractant après 24 h de chémotaxie et d'invasion (n=3).

Fluorescence (unités arbitraires)				
Chémotaxie	HL60		≠HL60	
2 h	Moyenne	E.S.M.	Moyenne	E.S.M.
Contrôle	2937	491	4113	811
10 <sup>-6</sup> M	3412	884	3210	825
10 <sup>-7</sup> M	2589	837	3898	499
10 <sup>-8</sup> M	2864	959	4466	433
10 <sup>-9</sup> M	3093	921	4715	503
10 <sup>-10</sup> M	2797	681	4397	348

Fluorescence (unités arbitraires)				
Invasion	HL60		≠HL60	
6 h	Moyenne	E.S.M.	Moyenne	E.S.M.
Contrôle	1390	361	2146	336
10 <sup>-6</sup> M	1339	220	1886	405
10 <sup>-7</sup> M	1681	172	2360	301
10 <sup>-8</sup> M	1484	61	3200	232
10 <sup>-9</sup> M	1598	190	2587	313
10 <sup>-10</sup> M	1817	99	2876	296

**Tableau 5.** Fluorescence induite par la sonde CyQuantGR pour différentes concentrations de chémoattractant après respectivement 2 et 6 h de chémotaxie et d'invasion (n=3).

Les HL60 et  $\neq$ HL60 ont été placées dans l'insert et différentes concentrations de chémoattractant ont été placées dans le puits. Après 24 heures de migration, certaines valeurs atteignent ou dépassent les 7000 unités de fluorescence (tableau 4) signifiant que la totalité des cellules a migré (tableau 3). La durée de migration a été ramenée respectivement à 2 et 6 heures pour les expériences de chémotaxie et d'invasion.

Une même gamme de chémoattractant a alors été testée à ces temps de migration (tableau 5). Les valeurs de fluorescence obtenues avec une concentration de  $10^{-8}$  M de fMLF, lors d'expériences d'invasion avec des  $\neq$ HL60, tendent vers le seuil de significativité ( $p=0,06$ ). Toutes les autres concentrations testées pour les HL60 et  $\neq$ HL60, en invasion ou chémotaxie, sont plus éloignées du seuil de significativité ( $p\geq 0,18$ ).

*Une concentration de  $10^{-8}$  M de fMLF a été choisie comme concentration chémoattractante pour les expériences de chémotaxie et d'invasion.*

## **VI Analyse statistique**

Les résultats obtenus ont été évalués statistiquement par le test ANOVA ( test paramétrique d'analyse de variance). Ce test est l'un des tests statistiques les plus puissants, c'est à dire l'un des plus sévères pour valider ou rejeter l'hypothèse de non différence. Les groupes statistiquement différents les uns des autres sont signalés par une \* ou # ou & pour les valeurs de *P* indiquées. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart standard à la moyenne (E.S.M.).

## RESULTATS

### I Etude de la lignée promyélocytaire HL60

#### **Article 1**

Les cellules HL60 proviennent d'une patiente atteinte de leucémie aiguë promyélocytaire, et ont été abondamment utilisées pour l'étude de la maturation granulocytaire. En effet, certaines molécules (DMSO, acide rétinoïque, granulocytes colony stimulating factor G-CSF) induisent leur différenciation en cellules présentant certaines propriétés fonctionnelles de neutrophiles, tandis que d'autres comme la vitamine D3 les différencient en monocytes. Les HL60 utilisées au laboratoire sont différenciées au DMSO en un modèle de neutrophiles (≠HL60) permettant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). De précédentes études au laboratoire ont montré que cette production diminuait fortement après une quinzaine de passages en culture, suggérant un lien entre les fonctions des ≠HL60 et le nombre de passages cellulaires.

Les métalloprotéinases de type 9 (MMP9), impliquées dans la migration cellulaire, sont produites de façon constitutive par les HL60 (Ries *et coll.*, 1994) et interviennent dans des pathologies comme l'athérosclérose (Galis *et coll.*, 1994) ou le cancer (Liotta *et coll.*, 1991).

*Le but de ce travail a été d'étudier l'effet de l'avancement des passages cellulaires en culture sur l'expression, la sécrétion protéique et l'activité*

*enzymatique de la métalloprotéinase de type 9 (MMP9), sur l'expression de la molécule d'adhérence CD11b (un marqueur de différenciation neutrophilique), ainsi que sur les capacités invasives et migratoires de la lignée promyélocytaire HL60, différenciée ou non en un modèle de neutrophiles (≠HL60).*

*Full Length Research Paper*

# Cell passaging rapidly affects expression, secretion and activity of MMP9 as well as mobility of HL60 leukemia cells

Yohann Bernard, Sébastien Plançon, Chantal Melchior, Eric Tschirhart and Jean-Luc Bueb\*

Université du Luxembourg, Life Sciences Research Unit, 162a, avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg.

Accepted 6th Aug, 2008

The HL60 cell line, derived from acute promyelocytic leukemia cells, can differentiate into neutrophil-like cell following DMSO treatment. Mobility of HL60, or DMSO-differentiated HL60 cells ( $\neq$ HL60), requires surface expression of adhesion molecules and production of matrix metalloproteinases (MMPs). The aim of this study was to investigate in HL60 and  $\neq$ HL60 the effects of cell passaging (over 5 passages after delivery (P and P+5)) on i) surface expression of adhesion molecule CD11b, which is considered a neutrophil differentiation marker ii) MMP9 mRNA expression, protein release and zymographic activity and iii) cellular mobility. As expected, CD11b expression at both cell passages increased in  $\neq$ HL60 relative to undifferentiated HL60, but expression levels of this neutrophils marker did not change over 5 passages. MMP9 mRNA expression however, in basal conditions was increased in HL60 at P+5. At P+5 versus P, MMP9 protein levels, MMP9 zymographic activity and cellular mobility in HL60 and  $\neq$ HL60 were elevated. Stimulation by *N*-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine had no effects on HL60, but raised MMP9 protein concentration and zymographic activity in  $\neq$ HL60. Since passage history is likely to also influence cellular functions other than MMP-related effects, it is important to carefully consider passage numbers when designing experiments.

**Key words:** Matrix metalloproteinases, mobility, cell passaging, HL60 cell line, DMSO-differentiation.

## INTRODUCTION

The HL60 human leukemia cell line, derived from immune progenitor cells of a patient with acute myeloid leukemia, is characterized by a continuous proliferation in suspension culture and by a capacity to differentiate *in vitro* to a number of different cell types such as monocytes or neutrophils (Collins et al., 1978). HL60 undergoes transition to neutrophil-like cells ( $\neq$ HL60) after stimulation with a differentiation inducer such as dimethylsulfoxide (DMSO) and acquires some functions, surface markers and morphological properties of neutrophils (PN)

which are essential for phagocytosis, killing of pathogenic bacteria and chemotaxis (Collins, 1987).

The invasive nature of neutrophils requires the ability to adhere to endothelial cells and to digest basement membrane components, like for example in cardiovascular complications such as myocardial tissue repair (Lindsey et al., 2001). Firm adhesion of PN to the endothelial cells is mediated by the surface expression of adhesive molecules especially the integrin Mac1 which is consisted of the  $\alpha$ -subunit (CD11b) and the  $\beta$ -subunit (CD18) (Wagner and Roth, 2000). Mac1 is involved in binding of neutrophils to activated endothelium in most models of inflammatory response (Luscinskas and Lawler, 1994; Malik and Lo, 1996). Adhesion is followed by migration of the PN into the site of inflammation (Roman, 1996; Springer, 1995; Tsai, 1998) and by production of matrix metalloproteinases (MMPs), a family of proteolytic enzymes (Shi et al., 1999; Zucker, 1988) among which MMP9 was previously depicted to play a major role for the digestion

\*Corresponding author. E-mail: [jean-luc.bueb@uni.lu](mailto:jean-luc.bueb@uni.lu). Tel : (+352) 466 644 6738. Fax : (+352) 466 644 6435.

**Abbreviations:** HL60, HL60 cell line;  $\neq$ HL60, Neutrophil-like DMSO-differentiated HL60 cells; DMSO, Dimethylsulfoxide; fMLF, *N*-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine; MMPs, Matrix metalloproteinases; PN, Polynuclear neutrophil.

of basement membrane type IV collagen (Bernhard et al., 1990; Kahari and Saarialho-Kere, 1997).

During subculturing, modifications of phenotypical or functional characteristics of  $\neq$ HL60 such as respiratory burst or secretion of  $\beta$ -glucuronidase have been described (Hadjokas et al., 1992). Previous observations in our laboratory suggest that secretion of superoxide anion by  $\neq$ HL60, induced by addition of the bacterial peptide *N*-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine (fMLF), a ligand inducing chemotaxis and superoxide production in neutrophils (Prossnitz et al., 1993), already decreases within fifteen subculture passages (unpublished results). In order to optimize the functional characteristics of  $\neq$ HL60 as a model of neutrophils, we examined whether cell culture passaging is affecting their mobility and MMP9 characteristics. Further, surface expression of adhesion molecule CD11b, highly expressed in PN and used as a marker for differentiated neutrophils (Trayner et al., 1998), was measured in HL60 and DMSO-differentiated HL60. The consequences of cell passaging were studied on mRNA expression, protein concentration and zymographic activity of MMP9, as well as on migration and invasion properties of HL60 and  $\neq$ HL60, stimulated or not by the bacterial peptide fMLF.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

All chemicals were from MERCK (Overijse, Belgium), unless stated otherwise.

### Cell cultures

HL60 cells (ATCC-LGC PROMOCHEM, batch 3641816, Manassas, USA) were used at passage P and P+5 after delivery and were grown in RPMI medium (CAMBREX Bio Sciences, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, streptomycin (10  $\mu$ g/ml) and penicillin (100 units/ml), at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cultures of HL60 cells were maintained at a cell concentration between 0.2 x 10<sup>6</sup> and 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml: 5 x 10<sup>6</sup> cells were seeded in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks with 25 ml of culture medium. After 4 days the number of HL60 cells reached 25 x 10<sup>6</sup> (i.e. a concentration of 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) and were diluted (passaged). To induce their neutrophil-like differentiation, HL60 cells were cultured in presence of 1.3% (v/v) dimethylsulfoxide (SIGMA CHEMICAL Co, Bornem, Belgium) for 4 days as described previously (Brécharde et al., 2006; Brécharde et al., 2005). 1.3% DMSO-differentiated HL60 ( $\neq$ HL60) were not passaged, they were originating from respective HL60 passages. Differentiating cells have, however, a slower growth rate and were seeded at a higher cell density (0.6 x 10<sup>6</sup> cells/ml). Then, both control and differentiated HL60 cells, cultured in parallel, reach the same final density (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) after 4 days and are used for experiments. For the experiments in 12-well plates, 0.5 x 10<sup>6</sup> cells/ml of viable cells were used: these were either resting or differentiated HL60 cells, at passage P or P+5, stimulated or not by *N*-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine, fMLF (SIGMA CHEMICAL Co).

### ELISA

A commercial MMP9 colorimetric sandwich ELISA kit (RAYBIO-

TECH, Norcross, U.S.A) was used to measure protein concentration of MMP9 in cell culture supernatants. The MMP9 ELISA kit is employing a primary antibody immobilized to the wells specific for human MMP9 and a secondary biotinylated anti-human MMP9 antibody. It measures both pro and active enzymes forms (ProMMP9 and MMP9) of the MMP9 protein.

### Zymography

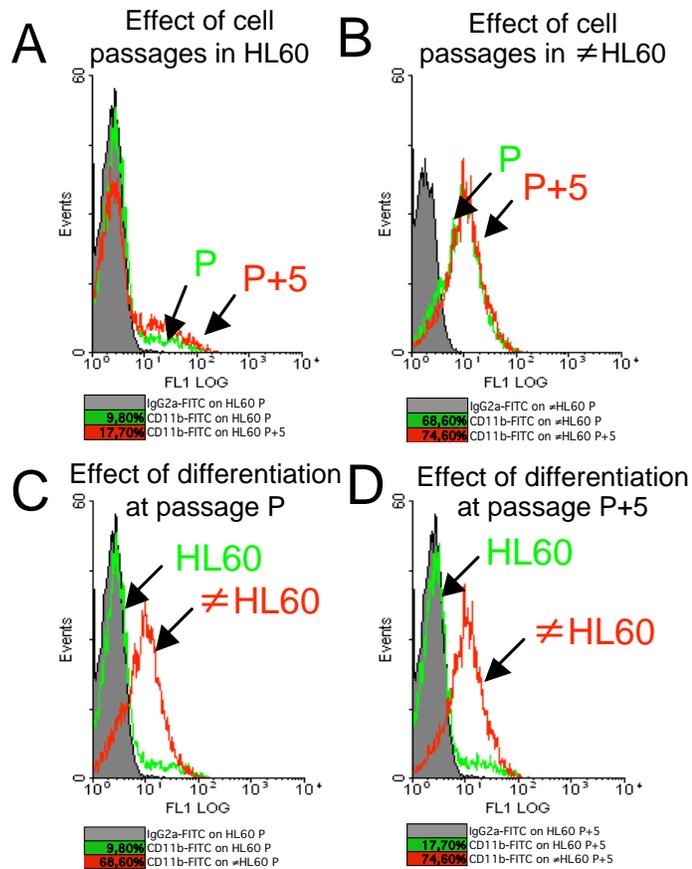
Zymography is an electrophoretic technique, where an enzymatic substrate is co-polymerized with the polyacrylamide gel, which is used to detect specific enzyme activity. Sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel (PAGE) zymography was performed using 10% SDS gel containing gelatin type A and B (5 mg/ml each, SIGMA CHEMICAL Co). Samples of cell culture supernatants were centrifuged at 100 x g for 5 min to remove any cells or debris and 20  $\mu$ l were mixed with Laemmli sample buffer (1:2 dilution) without reducing agents or heating. Prestained SDS-Page broadrange molecular weight standard was purchased from BIORAD (Nazareth, Belgium) and control recombinant human MMP9 from R & D SYSTEMS (Abington, United Kingdom). The protein on the gel were renatured by exchanging the SDS with 2.5% triton X100 (3 x 15-min incubations). The gels were subsequently incubated overnight at 37°C in the refolding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05% Brij 35). Gels were then stained 30 min with Coomassie Brilliant Blue and destained with 25% methanol and 10% acetic acid. The staining of the gels reveals sites of gelatinolytic proteolysis as white bands on a dark blue background. Densitometric analysis was performed using the Gel Pro Express 4.0 software (INTAS, Göttingen, Germany). Results are Integrated Optical Density values (IOD) expressed in pixels<sup>2</sup>.

### RNA isolation and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Total RNA isolation was performed using Invisorb™ Spin Cell RNA Mini Kit (INVITEK GmbH, Berlin, Germany). Total RNA concentrations and purity were determined by measuring OD<sub>260</sub> and OD<sub>260/280</sub> ratio on a NanoDrop spectrophotometer (NANODROP TECHNOLOGIES, Rockland, DE). Reverse transcription (RT) was performed using ThermoScript™ RT-PCR System from *in vitro*gen (Merelbeke, Belgium): total RNA (350 ng) were reverse-transcribed in a final volume of 21  $\mu$ l of the reaction mix described in the kit.

### Real-time PCR

Real-time PCR was performed on a BIORAD iCycler iQ detection system. Products were from BIORAD and the real-time PCR reaction buffer included the following: 20 nM primers, 15 ng cDNA and iQ SYBR Green supermix (100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM of each dNTP, 50 u/ml iTaq DNA polymerase, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I, 20 nM fluorescein, and stabilizers). Sequences of designed primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) used for PCR: the MMP9 primers used were 5'-TCTTCCCTGGAGACCTGAGA-3' (forward) and 5'-ACCCGAGTGTAAACCATAGCG-3' (reverse); the  $\beta$ -actin primers used were 5'-TGACCCAGATCATGTTTGAGA-3' (forward) and 5'-AGTCCATCACGATGCCAGT-3' (reverse). Real-time PCR cycling conditions were set as follows: 95°C for 3 min, 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. All sample were analysed in triplicate. The comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta$ Ct) method was used to describe the change in expression of the target gene to the corresponding control group. Relative gene expression levels were assessed with  $\Delta\Delta$ Ct method and expressed as 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> using  $\beta$ actin as an internal standard.



**Figure 1.** Flow cytometry analysis of CD11b surface expression expressed in percentage of positive cells: effect of cell passages (A and B) and effect of DMSO-differentiation (C and D) on CD11b surface expression on HL60 and ≠HL60 at passage P and P+5. Graphs represent the number of cells (Events) as a function of fluorescence intensity (FL1 LOG). The gray areas show control fluorescence due to an unspecific antibody (IgG2a) for the studied cells. Results are percentages of CD11b-positive cells, measured with FITC-conjugated anti-CD11b antibodies at 488 nm. Representative experiment among at least 3 independent experiments.

#### Cell mobility: Migration and invasion assays

Migration and invasive properties of cells were quantified using the CHEMICON QCM 96 well migration (3  $\mu\text{m}$  pore size membranes) and invasion (matrix coated 8  $\mu\text{m}$  pore size membranes) assays (MILLIPORE-CHEMICON, Billerica, U.S.A) based on the Boyden chamber principle. For invasion assays, cells not only have to pass a porous membrane, but also ECMatrix<sup>TM</sup>, a reconstituted basement membrane matrix of proteins derived from the Engelbreth Holm-Swam (EHS) mouse tumor. Wells were filled with medium with or without  $10^{-8}$  M fMLF. The upper compartments were filled with 100  $\mu\text{l}$  of a HL60 or ≠HL60 cell suspension at  $2 \times 10^6$  cells/ml. The assembled chamber (well + upper compartment) was incubated for 2 h (migration) or 6 h (invasion) at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells having moved towards the well were subsequently lysed and detected by the CyQuant GR dye<sup>TM</sup>. This green-fluorescent dye exhibits strong fluorescent enhancement when bound to cellular nucleic acids. Quantification of fluorescence was performed on a Fluostar OPTIMA from (BMG

LABTECH GmbH, Offenburg, Germany) using a 480/520 nm filter set.

#### Flow cytometry

Monoclonal antibody labeling was conducted by a direct immunofluorescence technique. HL60 and ≠HL60 were first saturated with 5% purified human IgG (SIGMA CHEMICAL CO) in incubation buffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 50 mM HEPES, 1 mg/ml glucose, pH 7.4) then labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibodies against surface marker CD11b or anti-IgG2a (IMMUNOTOOLS, Friesoythe, Germany). Cells ( $10^6$ ) were incubated at 4°C for 30 min with FITC-conjugated anti-CD11b antibodies (dilution 1:10). Cells were washed once and re-suspended at  $4 \times 10^5$  cells/ml in incubation buffer. Analyses of cells were performed on an Epics XL flow cytometer (BECKMAN-COULTER Inc, Fullerton, USA) with 488 nm filter. Results are expressed as percentage of positive fluorescence compared to an isotype control (IgG2a, negative staining).

#### Data analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significant differences (\*, #, Pvalue<0.05) were calculated using one way ANOVA.

## RESULTS

### Effects of cell culture passages and fMLF on HL60 cells

**Effect of cell culture passages:** HL60 from P and P+5 were compared. First, we investigated surface expression of CD11b in basal conditions, as well as mRNA expression, protein secretion and zymographic activity of MMP9 or mobility of HL60, in basal and fMLF-stimulated conditions. FACS analysis showed that five cell passages did not modify CD11b surface expression in untreated HL60 (Figure 1A and Table 1). However, P+5 HL60 showed increased MMP9 mRNA expression, protein levels and zymographic activities compared to P, in presence or absence of fMLF (Table 1 and Figure 2A). Mobility assays revealed that migration was not affected but that invasion of a coated membrane was increased at P+5, particularly in presence of fMLF (Table 1). Results show that most measured parameters increased in undifferentiated P+5 HL60.

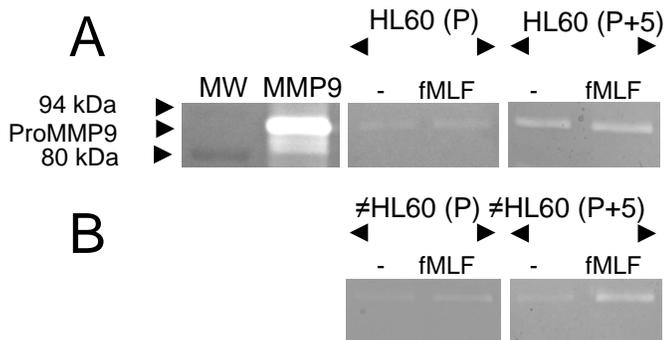
### Effect of fMLF

Addition of fMLF stimulates superoxide production, cell mobility (Prossnitz et al., 1993) and release of MMP9 in (Mackarel et al., 1999) neutrophils. In undifferentiated HL60, addition of fMLF neither modified expression of MMP9 mRNA at passages P and P+5 ( $1.7 \pm 0.8$  and  $1.4 \pm 0.3$  fold in  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  vs basal condition, respectively), nor did fMLF modify the other studied parameters in HL60 (Table 1 and Figure 2A).

**Table 1.** Effects of cell passages on MMP9 mRNA expression, protein concentration and zymographic activity, on surface expression of CD11b and on migration and invasion properties in HL60 and #HL60, under basal or fMLF-stimulated conditions.

	HL60		#HL60	
	P	P+5	P	P+5
<b>Basal</b>				
MMP9 mRNA expression (vs P)	1.0	1.6 ± 0.1*	1.0	0.8 ± 0.3
MMP9 protein concentration (ng/mL)	1.9 ± 0.9	4.8 ± 0.1*	0.1 ± 0.1	1.6 ± 0.9
MMP9 zymographic activity (kpixels <sup>2</sup> )	67 ± 28	256 ± 35*	17 ± 1	33 ± 9*
Migration (F.U.)	624 ± 101	865 ± 176	2252 ± 460	1861 ± 290
Invasion (F.U.)	108 ± 48	312 ± 73	102 ± 24	259 ± 23*
CD11b expression (% of positive cells)	9.9 ± 1.3	13.6 ± 2.9	47.9 ± 11.4	60.4 ± 7.1
<b>fMLF</b>				
MMP9 mRNA expression (vs P)	1.0	2.4 ± 0.2*	1.0	2.7 ± 1.2
MMP9 protein concentration (ng/mL)	2.0 ± 0.6	7.0 ± 1.4*	2.3 ± 0.6 <sup>#</sup>	6.2 ± 1.0 <sup>#</sup>
MMP9 zymographic activity (kpixels <sup>2</sup> )	78 ± 20	287 ± 20*	53 ± 1 <sup>#</sup>	196 ± 42 <sup>#</sup>
Migration (F.U.)	612 ± 75	631 ± 92	2056 ± 311	1947 ± 276
Invasion (F.U.)	136 ± 41	325 ± 49*	89 ± 44	366 ± 59*

F.U. : fluorescence units. Results are means ± SEM of at least 3 independent experiments (\*: significantly different from passage P or <sup>#</sup> significantly different from corresponding basal condition, Pvalue<0.05).



**Figure 2.** Zymographies: Effects of cell passaging on MMP9 zymographic activity in supernatants of HL60 (A) and #HL60 (B), under basal or fMLF-stimulated conditions. MW: Molecular weight prestained SDS-Page standard broadrange markers, in kDa. MMP9: human recombinant control. Representative zymographies among at least 3 independent experiments.

## Effects of cell culture passages and fMLF on #HL60

### Effect of cell culture passages

HL60 were driven into maturation by DMSO to model neutrophilic cells (#HL60). Indeed, we observed an increased CD11b surface expression in #HL60 at passage P and P+5 compared to the respective HL60 passages (Figures 1C and 1D, Table 1). Cell passaging did not affect surface expression of CD11b (Figure 1B and Table 1) and expression of MMP9 mRNAs (Table 1), but zymographic as did protein secretion (Table 1 and Figure 2B). Migratory function of #HL60 was not modified, but their invasive

activity increased at P+5, even further in presence of fMLF, ability increased at P+5 (Table 1). Results in Figure 1B and Table 1 show that similar to HL60, most measured parameters seem to increase in DMSO-differentiated HL60 cells.

### Effect of fMLF

In #HL60, fMLF did not modify expression of MMP9 at passage P and P+5 ( $0.6 \pm 0.2$  and  $3.0 \pm 2.0$  fold in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vs basal condition, respectively) but it increased MMP9 protein release. Indeed, the effect of fMLF on MMP9 zymographic activity was around 2x more efficient at P+5 (Table 1 and Figure 2B). Invasion assays showed that fMLF seemed to stimulate invasive capacity of #HL60 only at P+5 (Table 1).

## DISCUSSION

HL60 cells differentiated by DMSO are capable of most neutrophilic functions such as chemotaxis, ingestion, respiratory burst and bacterial killing in response to ligands such as the bacterial peptide fMLF (Collins, 1987). Present results show significant biochemical and functional differences between HL60 and #HL60, in relation to their subculture passage.

Cell lines can undergo undesired genotypic or phenotypic variations under serial subculturing process. A previous study shows for example ultrastructural variations in HL60 over a long subculturing period (100 or 200 passages) (Parmley et al., 1987). Functional impairments in  $\beta$ -glucuronidase secretion and respiratory burst are also depicted over 100 passages in #HL60 (Hadjokas et al., 1992). Former

observations (unpublished results) in our laboratory however show that fMLF-induced superoxide production in our batches of #HL60 substantially decreased already after fifteen passages. Therefore, we only used cells from passages exhibiting high superoxide production. This observation led us to investigate the influence of cell passaging on surface marker expression of CD11b, on MMP9 mRNA expression, protein release and zymographic activity, as well as on mobility of the neutrophilic model cells. The successful differentiation of HL60 into #HL60 as a model of neutrophils was confirmed by a robust increase in CD11b surface expression, characteristic of neutrophilic differentiation (Trayner et al., 1998). The expression levels of CD11b were not significantly affected by cell passaging, suggesting that a spontaneous differentiation of HL60, without addition of DMSO, as initially described by Collins (Collins et al., 1977) was not observed here after 5 passages.

However, in basal or in fMLF-conditions, cells showed an increase of MMP9 mRNA expression (HL60), of MMP9 protein release and of cellular invasion properties (HL60 and #HL60) at P+5. Previous studies report a decrease of MMP9 secretion related to a short period of 3 passages in human vein endothelial cells (Arkell and Jackson, 2003). Additionally, Kobayashi et al. (1998) show that levels of MMP2 decrease after sequential passages whereas MMP9 are detected at constant levels in keratinocytes (Kobayashi et al., 1998). Thus, different cell types exhibit distinct patterns of MMP9 release during cell passaging, suggesting that a delimited passage range should be used to study MMP9 characteristics. Furthermore, our data show that #HL60 get more reactive to fMLF stimulation at higher passages: the effect of fMLF on MMP9 zymographic activity for example was approximately twice more important at P+5 compared to P, confirming that characteristics of these neutrophilic cells change in relation to cell culture passages. This higher sensibility to fMLF may also involve other metalloproteinases modifying functions like mobility, as indicated in our experiments by an enhancement of invasive capacity of HL60 and #HL60 at P+5.

## Conclusions

DMSO-differentiated neutrophil-like HL60 cells demonstrated passage-dependent effects on invasive capabilities and on MMP9 mRNA expression, protein concentration and zymographic activity. These results confirm that cell passaging differently affects cell lines functions, urging to check every cell batch for spontaneous variability for the parameters to be studied.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Université du Luxembourg and by a research grant (BFR 03/072) from the Ministère de la Culture, de la Recherche et de l'Enseig-

nement Supérieur. We thank Stephanie Kreis for the critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Arkell J, Jackson CJ (2003). Constitutive secretion of MMP9 by early-passage cultured human endothelial cells. *Cell Biochem. Funct.* 21:381-386.
- Bernhard EJ, Muschel RJ, Hughes EN (1990). Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res.* 50:3872-3877.
- Brécharad S, Brunello A, Bueb J-L, Tschirhart EJ (2006). Modulation by cADPr of Ca<sup>2+</sup> mobilization and oxidative response in dimethylsulfoxide- or retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763:129-136.
- Brécharad S, Bueb J-L, Tschirhart EJ (2005). Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium.* 37:531-540.
- Collins SJ (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 70:1233-1244.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 270:347-349.
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2458-2462.
- Hadjokas N, Bayer C, Nielson CP (1992). Impaired stimulus-response coupling in association with increased growth rate of HL60 cells. *J. Leukoc. Biol.* 52:157-160.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6:199-213.
- Kobayashi T, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T (1998). Differential regulation of MMP-2 and MMP-9 gelatinases in cultured human keratinocytes. *Dermatology.* 197:1-5.
- Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, Entman M (2001). Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 103:2181-2187.
- Luscinskas FW, Lawler J (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J.* 8:929-938.
- Mackarel AJ, Cottell DC, Russell KJ, FitzGerald MX, O'Connor CM (1999). Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20:1209-1219.
- Malik AB, Lo SK (1996). Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol. Rev.* 48:213-229.
- Parmley RT, Akin DT, Barton JC, Gilbert CS, Kinkade JM, Jr. (1987). Cytochemistry and ultrastructural morphometry of cultured HL60 myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 47:4932-4940.
- Prossnitz ER, Quehenberger O, Cochrane CG, Ye RD (1993). Signal transducing properties of the N-formyl peptide receptor expressed in undifferentiated HL60 cells. *J. Immunol.* 151:5704-5715.
- Roman J (1996). Extracellular matrix and lung inflammation. *Immunol. Res.* 15:163-178.
- Shi Y, Patel S, Niculescu R, Chung W, Desrochers P, Zaleski A (1999). Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the regulation of coronary cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1150-1155.
- Springer TA (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57:827-872.
- Trayner ID, Bustorff T, Etches AE, Mufti GJ, Foss Y, Farzaneh F (1998). Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulfoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk. Res.* 22:537-547.
- Tsai LH (1998). Stuck on the ECM. *Trends Cell Biol.* 8:292-295.

Wagner JG, Roth RA (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* 52:349-374.

Zucker S (1988). A critical appraisal of the role of proteolytic enzymes in cancer invasion: emphasis on tumor surface proteinases. *Cancer Invest.* 6:219-231.

*Dans cet article, nous montrons une augmentation de l'expression de l'ARNm de la MMP9 des HL60, de la sécrétion de la protéine MMP9 et de l'activité enzymatique MMP9, ainsi que de la mobilité des HL60 et des  $\neq$ HL60 sur une période de 5 passages. Ces variations s'accompagnent d'une stimulation des capacités invasives de notre modèle de neutrophiles, en réponse au peptide fMLF, à passage P+5. En outre, l'expression de CD11b semble augmentée, illustrant une éventuelle différenciation spontanée des HL60 en culture. Ces résultats suggèrent que les fonctions cellulaires étudiées sont étroitement liées au passage de cette lignée HL60.*

Une première étude, présentée dans ce manuscrit, a montré une tendance à la hausse pour l'expression du marqueur de surface CD11b à passage P+5. D'autres expériences nous fournissent des résultats préliminaires sur 3 marqueurs supplémentaires (figure 12; CD14, récepteur au lipopolysaccharide, marqueur de type monocytaire; CD71, récepteur à la transferrine, marqueur de cellules en prolifération; CD97, une protéine à 7 domaines transmembranaires, sans doute impliquée dans l'activation leucocytaire) dont l'expression, pour deux d'entre eux, semble également liée au passage cellulaire.

L'expression de CD14 sur les HL60 et les  $\neq$ HL60 et de CD71 sur les HL60 semble varier avec le passage cellulaire. L'augmentation de CD14 et la diminution de CD71 pourraient illustrer la différenciation spontanée des HL60 en culture. En effet, bien que CD14 soit un marqueur de différenciation monocytaire (Studzinski *et coll.*, 1985; Studzinski *et coll.*, 1996), il est également exprimé par les PN ainsi que par les HL60 lors de leur

différenciation en un modèle de neutrophiles (Shuto *et coll.*, 2007). D'autre part, la diminution d'expression de CD71 est associée à la différenciation des HL60 (Omary *et coll.*, 1980; Sutherland *et coll.*, 1981) et à une diminution de leur prolifération. Cette étude, bien que préliminaire, suggère une variation des caractéristiques phénotypiques de notre lignée HL60 en culture concomitante des variations fonctionnelles observées.

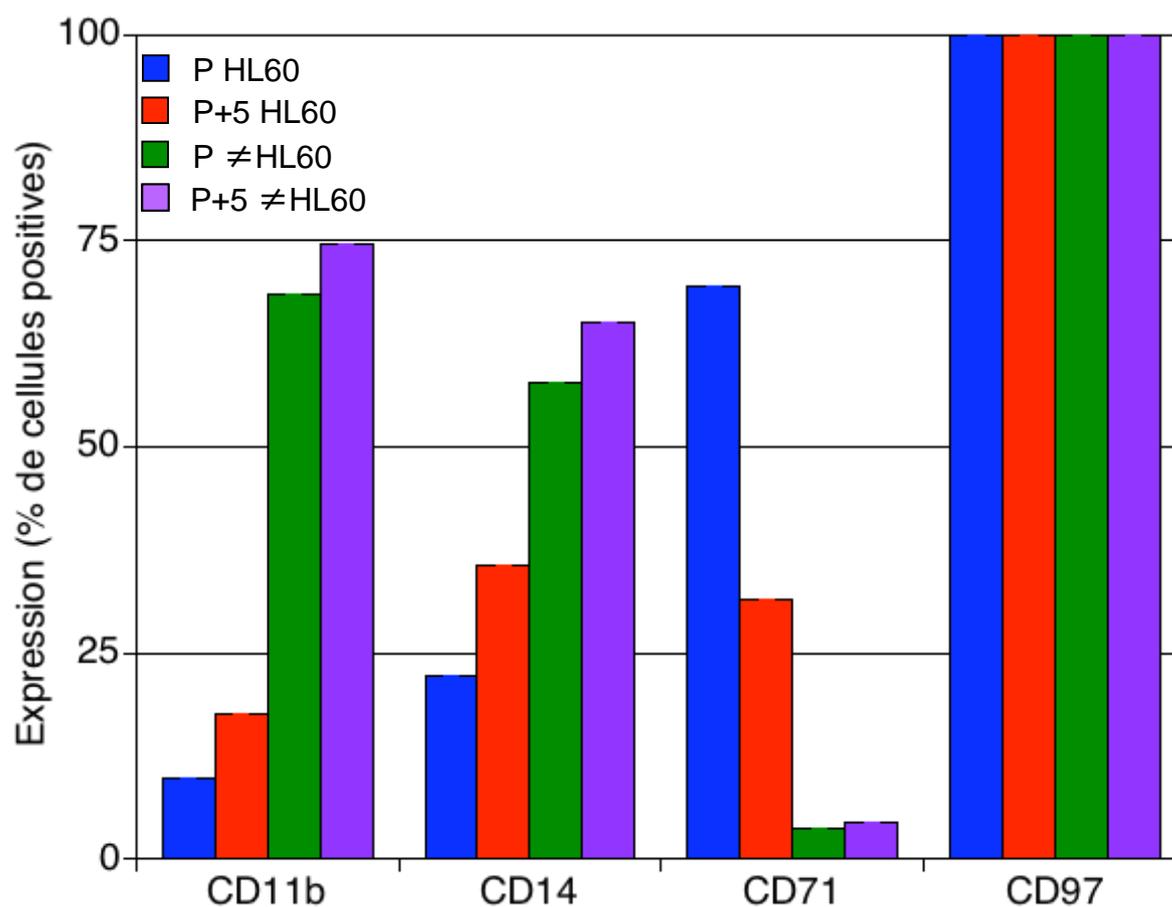


Figure 12. Effet du passage sur l'expression de différents marqueurs de surface par les HL60 et les ≠HL60, n=1 (dans l'article précédent 3 expériences indépendantes ont été réalisées pour le marqueur de surface CD11b, n=3).

*Les caractéristiques de la MMP9 ainsi que les capacités invasives sont liées au passage cellulaire de notre lignée HL60. Il apparaît que l'utilisation de HL60 au plus élevé des deux passages permette une réponse optimale aux stimulations étudiées.*

## **II Effet d'un stress oxydatif sur cellules vasculaires de coronaires humaines**

L'athérosclérose débute par une infiltration leucocytaire de la paroi artérielle, dirigée entre autres par les chémokines sécrétées par les cellules vasculaires. Dans la paroi artérielle, les leucocytes activés produisent des ERO, situation se traduisant par l'établissement d'un stress oxydatif. La réaction inflammatoire, résultant des multiples interactions entre leucocytes et cellules vasculaires, entraîne un remaniement de la matrice extracellulaire sous la dépendance des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Les MMPs, sécrétées par les leucocytes et les cellules vasculaires, sont impliquées dans la migration cellulaire conduisant à la formation de la plaque d'athérome, mais aussi dans la rupture de cette dernière.

*Les objectifs de ce travail sont :*

- *d'étudier les effets d'un stress oxydatif sur l'activité MMP2 et MMP9 de cellules vasculaires de coronaires humaines,*
- *de déterminer l'existence d'interactions potentielles entre un modèle de neutrophiles humains et des cellules vasculaires de coronaires humaines, jouant un rôle sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 ainsi que sur la mobilité cellulaire,*
- *de préciser le rôle des espèces réactives de l'oxygène et d'identifier certains médiateurs impliqués dans les interactions cellules-cellules au cours de l'athérosclérose.*

# 1 Cellules endothéliales

## A Effets d'un stress oxydatif

### a Origine biochimique

La technique de zymographie permet de détecter une activité enzymatique gélatinolytique avec les témoins MMP2 et MMP9 (figure 13). Les cellules endothéliales d'artères de coronaires humaines (HCAEC) présentent une activité gélatinolytique basale pour la forme latente de la métalloprotéinase de type 2, ou ProMMP2, observée sur les zymographies par une bande de poids moléculaire de 72 kDA (figure 13). Différents temps de stimulation ont été testés : 30 min, 6 h, 12 h, 24 h et 48 h. Le peptide bactérien fMLF n'a pas d'effet sur l'activité métalloprotéasique des HCAEC. De même, le peroxyde d'hydrogène (0,05 - 5  $\mu$ M) et le complexe xanthine/xanthine oxydase (X/XO) ne permettent ni de modifier l'activité enzymatique MMP2, ni d'induire une activité enzymatique MMP9.

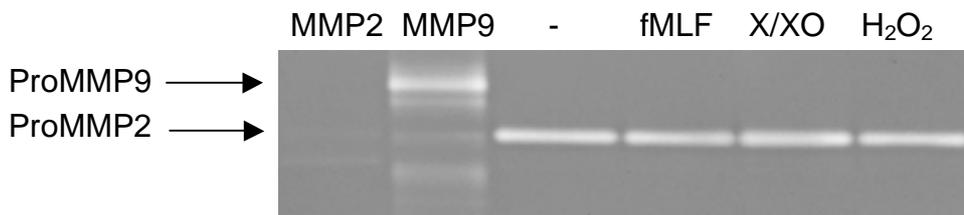


Figure 13. Exemple de zymographie représentative de HCAEC stimulées par le fMLF, X/XO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les expériences ont été réalisées avec 80000 cellules HCAEC stimulées par 10<sup>-6</sup> M de fMLF, 100  $\mu$ M de xanthine (X) et 5mU/mL de xanthine oxydase (XO) ou 5  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 24h.

## b Origine cellulaire

Nous avons stimulé pendant 5 minutes par  $10^{-6}$  M de fMLF, une concentration permettant une libération maximale d' $O_2^-$  (Valentin *et coll.*, 2001), différentes densités de HL60 différenciées au DMSO ( $\neq$ HL60 : 1, 3 et 10 millions/mL). Le surnageant, ou « milieu conditionné » (MC), manipulé à 4°C après stimulation des cellules, a ensuite été incubé pendant 30 minutes ou 24 heures en présence des HCAEC. Nous n'avons constaté d'activation ni des MMP2, ni des MMP9 quelles que soient les conditions expérimentales employées (figure 14). L'impact d'un stress oxydatif induit par du milieu conditionné de  $\neq$ HL60 sur les HCAEC n'a pas permis dans nos conditions expérimentales, de modifier l'activité MMP2 ou d'entraîner une activation des MMP9.

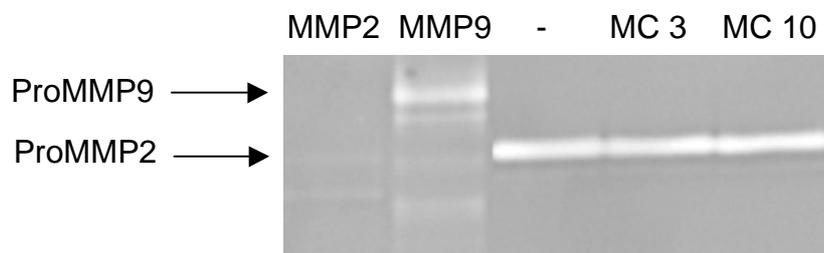


Figure 14. Exemple de zymographie représentative de surnageants de HCAEC stimulées par le milieu conditionné (MC), c'est à dire le surnageant de cellules différenciées ( $\neq$ HL60) activées (fMLF,  $10^{-6}$  M). Ces expériences ont été réalisées avec 80000 cellules HCAEC, stimulées pendant 24h par le surnageant de  $\neq$ HL60 activées (3 et 10 millions/mL, respectivement MC 3 et MC 10)

## B Etude d'un modèle de coculture $\neq$ HL60/HCAEC

Afin d'optimiser le temps de contact des formes réactives de l'oxygène produites par les  $\neq$ HL60 activées et les HCAEC (lot 3F0055), nous avons réalisé une série d'expériences de coculture au moyen d'un dispositif Transwell. Les  $\neq$ HL60 ( $8 \times 10^5$  cellules/0,5mL) ont été placées sur une membrane poreuse au dessus d'une couche de HCAEC, et ont été stimulées par du fMLF ( $10^{-6}$  M) permettant la production de formes réactives de l'oxygène.

Nous n'avons pas observé de modification de l'activité ProMMP2 ou de l'activité ProMMP9 dans les surnageants de coculture  $\neq$ HL60 activées/HCAEC après 24 h d'incubation (figures 15 et 16).

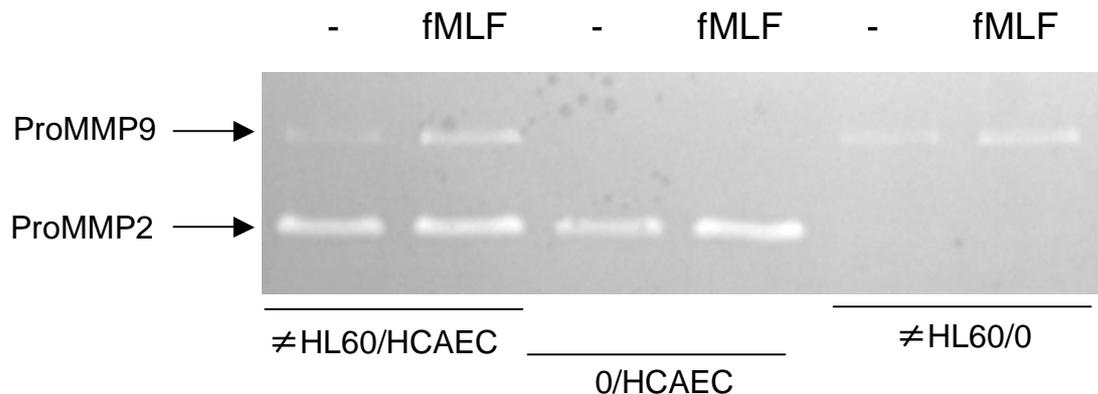
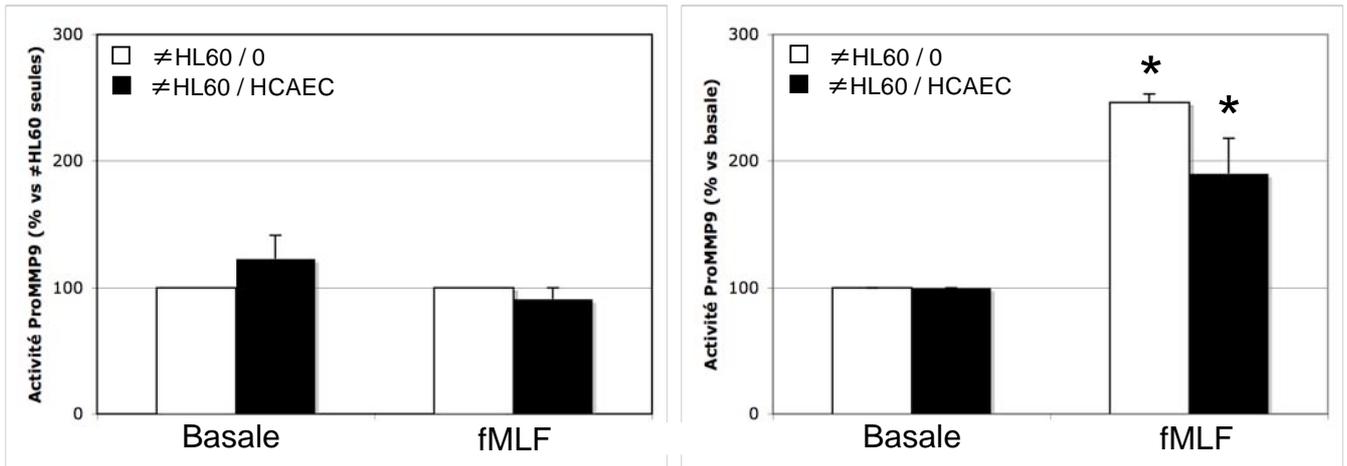


Figure 15. Exemple de zymographie représentative de surnageants d'une coculture HCAEC/ $\neq$ HL60. Les expériences ont été réalisées avec 80000 HCAEC en présence ou absence de  $\neq$ HL60 activées (fMLF,  $10^{-6}$  M) ou non pendant 24h.



**Figure 16.** (A) Effet de la présence de HCAEC sur l'activité ProMMP9 en cocultures avec des #HL60, en condition basale et stimulée par le fMLF. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  E.S.M., pour au moins 3 expériences. \*  $p < 0,05$  pour la différence avec les #HL60 seules. (B) Effet du fMLF sur l'activité ProMMP9 d'une culture de #HL60 seules ou d'une coculture #HL60/HCAEC. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  E.S.M., pour au moins 3 expériences. \*  $p < 0,05$  pour la différence entre les activités contrôles et stimulées.

(A) Les contrôles sont les #HL60 seules (100%). Valeurs pour les #HL60 seules en condition basale :  $34 \pm 3$  kpixels<sup>2</sup>, avec le fMLF :  $83 \pm 8$  kpixels<sup>2</sup>. (B) Valeurs basales des #HL60 seules :  $34 \pm 3$  kpixels<sup>2</sup>, de la coculture #HL60/HCAEC :  $40 \pm 2$  kpixels<sup>2</sup>.

*L'utilisation de cocultures #HL60/HCAEC n'a pas permis, dans nos conditions expérimentales, de mettre en évidence un effet du stress oxydatif, ou d'éventuelles molécules sécrétées, susceptible d'entraîner une modification de l'activité métalloprotéasique.*

Nous avons poursuivi notre travail par l'étude d'un autre type cellulaire composant la paroi artérielle : les cellules musculaires lisses de coronaires humaines (HCSMC).

## 2 Cellules musculaires

### A Effet d'un stress oxydatif

#### a Origine biochimique

Nous n'observons pas de modifications de l'activité enzymatique ProMMP2 aux temps de stimulation et aux concentrations en fMLF, peroxyde d'hydrogène et X/XO utilisées précédemment (Voir II 1 A a).

#### b Origine cellulaire

Selon le protocole décrit précédemment (Voir II 1 A b), la stimulation par le milieu conditionné (MC) d'un modèle de neutrophiles ne permet pas de modifier l'activité enzymatique ProMMP2 ou d'entraîner une activation de la ProMMP9 des HCSCM.

*Les espèces réactives de l'oxygène, dans nos conditions expérimentales, ne permettent pas de modifier l'activité enzymatique MMP2 ou MMP9 de cellules musculaires lisses de coronaires humaines.*

### B Etude d'un modèle de coculture HL60/HCSCM

*Article 2*

# Co-cultures of Human Coronary Smooth Muscle Cells and Dimethyl Sulfoxide-differentiated HL60 Cells Upregulate ProMMP9 Activity and Promote Mobility—Modulation By Reactive Oxygen Species

Yohann Bernard,<sup>1</sup> Chantal Melchior,<sup>1</sup> Eric Tschirhart,<sup>1</sup> and Jean-Luc Bueb<sup>1,2</sup>

---

**Abstract**—Vascular cells and leukocytes, involved in the development of atherosclerosis, produce cytokines and/or reactive oxygen species (ROS) and matrix metalloproteinases (MMPs) implicated in cell mobility. We investigated by co-culture experiments the effects of human coronary smooth muscle cells (HCSMC) on MMPs characteristics and mobility of neutrophil-like dimethyl sulfoxide-differentiated HL60 cells (≠HL60). The effects of superoxide dismutase (SOD) and catalase were also analyzed. All the studied MMP2 characteristics remained unchanged. HCSMC stimulated MMP9 protein level, activity and mobility of ≠HL60 cells and expressed and secreted a variety of cytokines implicated in atherosclerosis. SOD and catalase increased MMP9 expression, protein level and activity of ≠HL60, but migration of ≠HL60 cells was only decreased by catalase, demonstrating that ROS are more efficient in modulating MMP9 activity of ≠HL60 than their mobility. Finally, HCSMC being able to stimulate ≠HL60, their co-cultures may represent an *in vitro* approach to study cellular interactions occurring *in vivo* during atherosclerosis.

---

**KEY WORDS:** atherosclerosis; inflammation; oxidative stress; matrix metalloproteinases; cell migration.

## INTRODUCTION

During the atherosclerotic process, vascular cells and immune cells such as leukocytes are important targets for inflammatory cytokines, also, they are capable of producing significant amounts of cytokines upon stimulation [1]. Activated leukocytes further release reactive oxygen species (ROS), inducing an oxidative stress during lesion formation [2, 3]. In this process, remodelling of the vascular wall induced by degradation

of matrix components by matrix metalloproteinases (MMPs) leads to migration of cells [4]. MMPs are upregulated in the failing myocardium of infarcted patients [5] and previous clinical studies showed increased MMP9 zymographic activities or protein levels in blood samples from patients with acute myocardial infarction [6–8]. MMPs can be regulated at several levels such as transcription [9], activation of latent proenzymes [10] or inhibition of proteolytic activity [11]. Also, proinflammatory cytokines and ROS are known to stimulate MMPs in leukocytes or in smooth muscle cells [12, 13].

Interaction of vascular cells with leukocytes leads during atherosclerosis to initiation of lesion formation and progression of atheroma [1, 3]. Previous *in vitro* studies showed an increase of MMPs production in co-culture experiments between vascular smooth muscle cells and monocytes [14]. Neutrophil is the most common type of leukocytes found in the circulation and is the

---

<sup>1</sup>Life Sciences Research Unit, Université du Luxembourg, 162a, Avenue de la Faiënerie, 1511, Luxembourg, Luxembourg

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed at Life Sciences Research Unit, Université du Luxembourg, 162a, Avenue de la Faiënerie, 1511 Luxembourg, Luxembourg. E-mail: jean-luc.bueb@uni.lu

major component of the innate immune response [15]. Although neutrophils are not detected in stable atherosclerotic plaques, they are prevalent in eroded or ruptured plaques obtained from patients with acute coronary syndromes [16] and are the richest source of MMP9 which is rapidly released from their granules upon stimulation [12]. Trying to mimic *in vivo* cellular interactions during atherosclerosis, we developed an *in vitro* model with smooth muscle cells and neutrophils. The HL60 human leukemia cell line, derived from immune progenitor cells of a patient with acute myeloid leukemia, is characterized by a capacity to differentiate *in vitro* to a number of different cell types such as monocytes or neutrophils [17]. By performing co-culture experiments, we investigated paracrine interactions between human coronary smooth muscle cells (HCSMC) and dimethyl sulfoxide (DMSO)-differentiated HL60 cells ( $\neq$ HL60 cells) presenting specific functions, surface markers and morphological properties of neutrophils [17].

Here we examined, in co-culture experiments, the effects of HCSMC on MMP9 expression levels as well as on mobility of  $\neq$ HL60 cells, in the presence or the absence of antioxidant enzymes. We propose potential soluble mediators which may be implicated in these cellular interactions. We found that mediators secreted by HCSMC stimulate MMP9 protein levels and ProMMP9 zymographic activity as well as mobility of  $\neq$ HL60 cells, while antioxidant enzymes are more efficient in modulating MMP9 protein levels and ProMMP9 zymographic activity than mobility. IL8, IL6, CCL2 and CXCL12, detected in the co-culture supernatants, represent potential candidates in the paracrine interactions responsible of the secretory and/or migratory response of  $\neq$ HL60 cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

RPMI, SmBM medium and supplements were purchased from Cambrex Bio Sciences (Verviers, Belgium). N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine (fMLF), superoxide dismutase (SOD), DMSO and catalase (Cat) were purchased from Sigma Chemical Co (Bornem, Belgium). Transwell (0.4  $\mu$ m pore size membrane) culture plates were purchased from Corning (Schiphol Rijk, Netherlands). MMP9, IL8, IL1 $\beta$ , CCL2 and CXCL12 ELISA kits were purchased from RayBioTech (Norcross, U.S.A). Multi-analyte Profiler ELISArray™ kits were purchased from SuperArray (Bethesda, MD). Migration (3  $\mu$ m and 8  $\mu$ m pore size membranes) and invasion (coated

8  $\mu$ m pore size membrane) assay kits were purchased from Millipore (Billerica, U.S.A). Reverse transcriptase (RT) and semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR) were realized using the ThermoScript™ RT-PCR System from Invitrogen (Merelbeke, Belgium). Real-Time PCR products were from BioRad (Nazareth, Belgium).

### Cell Cultures

HL60 cells (ATCC-LGC Promochem, batch 3641816, Manassas, USA) were grown in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, streptomycin (10  $\mu$ g/ml) and penicillin (100 units/ml). HL60 cells were grown and differentiated in culture flasks. Cells were seeded at a starting density of  $2 \times 10^5$  cells/ml and kept at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. To induce their neutrophil-like differentiation, HL60 cells were cultured in the presence of 1.3% (v/v) DMSO for 4 days as described previously [18, 19]. This DMSO-differentiated neutrophilic cell line ( $\neq$ HL60 cells) acquires some functions, surface markers and morphological properties of neutrophils (PN) which are essential for phagocytosis, killing of pathogenic bacteria and chemotaxis [17]. We showed previously that stimulation of  $\neq$ HL60 cells by fMLF ( $10^{-6}$  M) induce a maximal production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> [20] and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [18] in the culture supernatant.

HCSMC have been isolated from human tissue (Cambrex, Verviers, Belgium) and were cultured in SmBM growth medium supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.5  $\mu$ g/ml human recombinant Epidermal Growth Factor, 5 mg/ml insulin, 1  $\mu$ g/ml human recombinant Fibroblast Growth Factor, 50 ng/ml gentamicin and 50  $\mu$ g/ml amphotericin-B. Cells were passaged following instructions from Cambrex and kept at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. For experiments, HCSMC were plated the day before on culture dishes at 80% on either 12- or 96-well plates ( $8 \times 10^4$  or  $8 \times 10^3$  cells, respectively) depending on the assay. They were used after 2 washes with the above described medium containing only 0.1% serum.

### Co-cultures Experiments

$\neq$ HL60 cells ( $10^6$  cells) were cultured over plated HCSMC ( $8 \times 10^4$  cells) onto polycarbonate microporous membrane with 0.4 mm pore size and activated by fMLF ( $10^{-6}$  M) in presence or absence of antioxidant enzymes like SOD (200 U/ml) or Cat (25 U/ml) for 24 h.

For mobility assays,  $\neq$ HL60 cells ( $2 \times 10^5$  cells) were cultured over plated HCSMC ( $8 \times 10^3$  cells) onto

polycarbonate microporous membrane with 3  $\mu\text{m}$  pore size (migration) or 8  $\mu\text{m}$  pore size coated with ECMatrix™ (invasion). fMLF as a chemoattractant ( $10^{-8}$  M) was added in presence or absence of antioxidant enzymes for 2 h and 6 h in migration and invasion assays, respectively.

## ELISA

*Single analyte ELISA.* A commercial colorimetric sandwich ELISA was used to measure concentration of MMP9 and of cytokines (IL1 $\beta$ , IL8, CCL2, CXCL12) in supernatants of cultures or co-cultures. The MMP9 ELISA kit employs a primary antibody immobilized to the wells specific for human MMP9 or cytokines and a secondary biotinylated anti-human MMP9 or cytokine antibody.

*Multi-analyte Profiler ELISArray™ Kit.* The Multi-analyte ELISArrays are designed to simultaneously profile the level of multiple protein analytes using the conventional and simple ELISA technique. The 96-well ELISA microplates have been coated with a panel of target specific capture antibodies (IL1 $\alpha$ , IL6, IL10, IL12, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ). A secondary biotinylated detection antibody binds the captured analyte.

## Zymography

Zymography is an electrophoretic technique where an enzymatic substrate, which is used to detect specific enzyme activity, is co-polymerized with a polyacrylamide gel. Sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel (PAGE) zymography was performed using 10% SDS gel containing gelatin type A and B (5 mg/ml each, Sigma Chemical Co). Samples of the various cell culture supernatants were centrifuged at  $100\times g$  for 5 min to remove any cells or debris and were mixed with Laemmli sample buffer (1:2 dilution) without reducing agents or heating. Prestained SDS-PAGE broadrange molecular weight standard was purchased from Biorad (Nazareth, Belgium) and human recombinant MMP9 and MMP2 controls are from R&D Systems (Abington, United Kingdom). The proteins on the gel were renatured by exchanging the SDS with 2.5% triton  $\times 100$  ( $3\times 15$ -min incubations). The gels were subsequently incubated overnight at 37°C in the refolding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM CaCl $_2$  and 0.05% Brij 35). Gels were then stained 30 min with Coomassie Brilliant Blue and destained with 25% methanol and 10% acetic acid. The staining of the gels

reveals sites of gelatinolytic proteolysis as white bands on a dark blue background. Densitometric analysis was performed using the Gel Pro Express 4.0 software (Intas, Göttingen, Germany). Results are Integrated Optical Density values expressed in pixels $^2$ .

## RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA isolation was performed using Invisorb™ Spin Cell RNA Mini Kit (Invitek GmbH, Berlin, Germany). Total RNA concentrations and purity were determined by measuring OD $_{260}$  and OD $_{260/280}$  ratio on a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE). Reverse transcription (RT) was performed using ThermoScript™ RT-PCR System from Invitrogen (Merelbeke, Belgium): total RNA (350 ng) were reverse-transcribed in a final volume of 21 ml of the reaction mix described in the kit.

## Semi-quantitative PCR

PCR was realized in a buffer reaction volume of 50  $\mu\text{l}$  with 5 mM MgCl $_2$ , H $_2$ O, 1 unit Taq polymerase, 0.2 mM dNTP, 2.5 ng/ $\mu\text{l}$  of each forward and reverse primer and 2  $\mu\text{l}$  cDNA.

Sequence of primers (Eurogentec, Leuven, Belgium) used for PCR: the MMP9 primers used were 5'-CCCTTGCTCTTCCCTGGAG-3' (forward) and 5'-CACAACGTCATCGTCGAA-3' (reverse); the actin primers used were 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3' (forward) and 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3' (reverse). PCR cycling conditions were set as follows: 95°C for 3 min and 35 cycles at 95°C for 50 s, 55°C for 50 s and 72°C for 1 min with final elongation at 72°C for 1 min. Semi-quantitative PCR was repeated three times.

## Real-time PCR

Real-time PCR was performed on a Biorad iCycler iQ detection system. Products were from Biorad and the real-time PCR reaction buffer included the following: 20 nM primers, 15 ng cDNA and iQ SYBR Green supermix (100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM of each dNTP, 50 u/ml iTaq DNA polymerase, 6 mM MgCl $_2$ , SYBR Green I, 20 nM fluorescein, and stabilizers). Sequences of designed primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) used for PCR: the MMP9 primers used were 5'-TCTTCCCTGGAGACCTGAGA-3' (forward) and 5'-ACCCGAGTGTAACCATAGCG-3' (reverse); the  $\beta$ -actin primers used were 5'-TGACCCAGATCATGTTT GAGA-3' (forward) and 5'-AGTCCATCACGATG

CCAGT-3' (reverse). Real-time PCR cycling conditions were set as follows: 95°C for 3 min, 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. All samples were analysed in triplicate. The comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta Ct$ ) method was used to describe the change in expression of the target gene in the corresponding control group. Relative gene expression levels were assessed with  $\Delta\Delta Ct$  method and expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  using  $\beta$ actin as an internal standard.

### Chemotaxis and Chemoinvasion Assays

Migration and invasive properties of cells were quantified using the Chemicon QCM 96-well migration (3  $\mu$ m pore size membranes) and invasion (matrix coated 8  $\mu$ m pore size membranes) assays (Millipore-Chemicon, Billerica, U.S.A) based on the Boyden chamber principle. For invasion assays, cells not only have to pass a porous membrane, but also ECMatrix™, a reconstituted basement membrane matrix of proteins derived from the Engelbreth Holm-Swam (EHS) mouse tumor. Wells were filled with medium with or without fMLF as a chemoattractant ( $10^{-8}$  M). The upper compartments were filled with 100  $\mu$ l of an HL60 or  $\neq$ HL60 cell suspension at  $2 \times 10^6$  cells/ml. The assembled chamber (well + upper compartment) was incubated for 2 h (migration) or 6 h (invasion) at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells having moved towards the well were subsequently lysed and detected by the CyQuant GR dye™. This green-fluorescent dye exhibits strong fluorescent enhancement when bound to cellular nucleic acids. Quantification of fluorescence was performed on a Fluostar OPTIMA from BMG Labtech GmbH (Offenburg, Germany) using a 480/520 nm filter set.

Using microporous membranes with an 8  $\mu$ m pore size revealed no effect of fMLF and/or HCSMC ( $8 \times 10^3$  cells) on  $\neq$ HL60 cells migration but allowed 2–3 times more  $\neq$ HL60 cells to migrate, compared to membranes with 3  $\mu$ m pore size (data not shown) confirming that reduced pore size, or coating, is helpful to study discrete functional variations in mobility of  $\neq$ HL60 cells.

### Gene Expression Profiling on cDNA Macroarrays

The relative mRNA expression of genes of proinflammatory cytokines and receptors by HCSMC was analyzed with RT<sup>2</sup>Profiler™ PCR Arrays (SuperArray Inc., Bethesda, MD) according to the manufacturer's protocol. HCSMC were cultured for 24 h with or

without  $\neq$ HL60 cells, in presence or absence of fMLF. HCSMC mRNA (400 ng) were reverse transcribed into cDNA using SuperArray's RT<sup>2</sup> First Strand Kit. cDNA was added to RT<sup>2</sup>qPCR Master Mix and the mixture distributed to the wells of the PCR array. Using the iCycler iQ Real-time PCR detection system, PCR cycling conditions were set as follows: 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All samples were performed in triplicate. Sample cycle thresholds were determined (Ct). Any Ct value from 35 on is considered a negative call. The expression level was normalized to the average Ct value of all housekeeping genes (Beta-2-microglobulin, Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1, Ribosomal protein L13a, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Actin beta).

### Data Analysis

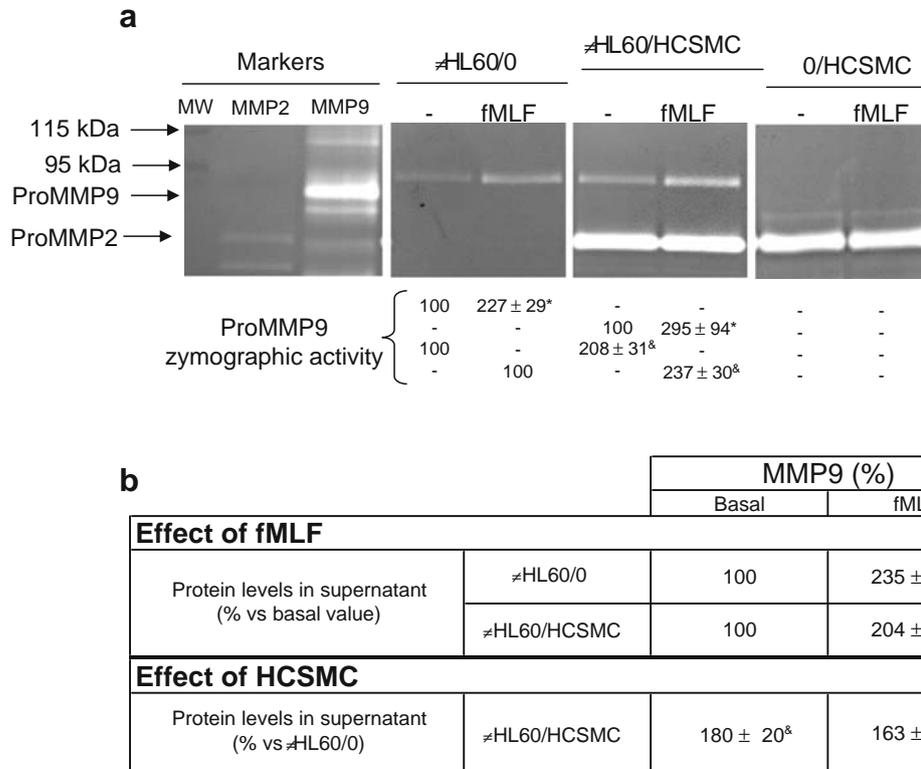
Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n equals the number of experiments. Significant differences (\* or &:  $P < 0.05$ ) were calculated using one way ANOVA.

## RESULTS

### Effect of fMLF and Cellular Interactions on MMPs Zymographic Activity and Proteins Levels

*Basal MMPs activity.* Vascular smooth muscle cells and HL60 cells have been shown to constitutively release ProMMP2 [21] and ProMMP9 [22], respectively. Further, only ProMMP2 zymographic activity is detected in media from cultures of HCSMC alone and only ProMMP9 zymographic activity is detected in supernatants of  $\neq$ HL60 cells cultured alone (Fig. 1A). In  $\neq$ HL60/HCSMC co-cultures experiments, the cellular origin of ProMMP9 or ProMMP2 in the supernatants can not be determined. However, the ProMMP9 bands in zymography showed the same apparent 94 kDa molecular weight in  $\neq$ HL60/HCSMC co-cultures and in  $\neq$ HL60 cells cultures alone (Fig. 1A), indicating that  $\neq$ HL60 cells are producing ProMMP9 in co-cultures experiments.

*Effect of fMLF on MMPs zymographic activity and proteins levels in  $\neq$ HL60 cells and HCSMC.* Supernatant of control experiments on HCSMC cultured alone showed that addition of fMLF ( $10^{-6}$  M) did not modify ProMMP2 zymographic activity (Fig. 1A) or MMP2 protein levels ( $92 \pm 8\%$  vs basal condition). Assays on  $\neq$ HL60 cells cultured alone showed that stimulation with



**Fig. 1. A** Zymographies: MMP2 and MMP9 activities in the supernatants of cultures of #HL60 cells or HCSMC alone (#HL60/0 and 0/HCSMC, respectively) and of co-cultures (#HL60/HCSMC), in absence or presence of fMLF. Zymographies are representative experiments among at least 3. Effect of fMLF or effect of HCSMC on ProMMP9 zymographic activity are expressed in percent vs basal value or in percent vs #HL60 cells alone (#HL60/0), respectively. Results are means ± SEM of at least 3 different experiments ( $P < 0.05$ , asterisks: significantly different from basal value, and signs: significantly different from #HL60 cells alone (#HL60/0)). MW: Molecular weight prestained SDS-PAGE standard broad-range markers. MMP2 and MMP9 are human recombinant controls. **B** Effect of fMLF or HCSMC on MMP9 protein levels in the supernatants of cultures of #HL60 cells alone (#HL60/0) or of co-cultures (#HL60/HCSMC). Effect of fMLF or effect of HCSMC on MMP9 protein levels are expressed in percent vs basal value or in percent vs #HL60 cells alone (#HL60/0), respectively. Results are means ± SEM of at least 3 different experiments ( $P < 0.05$ , asterisks: significantly different from basal value, and signs: significantly different from #HL60 cells alone (#HL60/0)).

$10^{-6}$  M fMLF increased ProMMP9 zymographic activity and MMP9 protein levels (Fig. 1A and B, respectively).

In the supernatant of #HL60/HCSMC co-cultures, fMLF did not modify ProMMP2 zymographic activity (Fig. 1A) or MMP2 protein levels ( $81 \pm 14\%$  vs basal condition). However, fMLF increased ProMMP9 zymographic activity and MMP9 protein levels (Fig. 1A and B, respectively).

*Effect of cellular interactions on MMPs zymographic activity and protein levels in HCSMC and #HL60 cells.* In comparison to HCSMC alone, presence of #HL60 cells did not modify ProMMP2 zymographic activity (Fig. 1A) or MMP2 proteins levels ( $111 \pm 7$  and  $115 \pm 22\%$  vs

HCSMC alone in basal conditions and HCSMC alone in fMLF-stimulated conditions, respectively). However, in comparison to #HL60 cells alone (#HL60/0), HCSMC further increased ProMMP9 zymographic activity and MMP9 proteins levels (Fig. 1A and B respectively).

**Effect of fMLF and/or HCSMC on #HL60 Cells Mobility**

*Effect of fMLF stimulation in #HL60 cells cultured alone or in co-culture.* According to basal condition as control, stimulation by fMLF as a chemoattractant ( $10^{-8}$  M) did not modify migration of #HL60 cells through a microporous membrane with 3  $\mu$ m pore size in

absence or presence of HCSMC (105±2 and 112±5% vs basal conditions, respectively) (Table 1A, migration). However, fMLF stimulated invasion by ≠HL60 cells of an ECMatrix™-coated membrane with 8 µm pore size in absence or presence of HCSMC (139±10\* and 426±74\* % vs basal conditions, respectively) (Table 1A, invasion). Thereby, we can further observe that the effect of fMLF was strongly potentiated by the presence of HCSMC.

*Effect of HCSMC in basal and fMLF-stimulated conditions.* According to HL60 cells alone as a control, HCSMC stimulated migration of ≠HL60 cells in basal and fMLF-stimulated conditions (156±11<sup>&</sup> and 165±13<sup>&</sup> % vs ≠HL60 cells alone, respectively) (Table 1B). They strongly reduced invasive properties of ≠HL60 cells in basal, but not in fMLF-stimulated conditions (51±5<sup>&</sup> and 154±29% vs ≠HL60 cells alone, respectively) (Table 1B).

### Analysis of Expression and Secretion of Cytokines in Co-cultures

In order to identify potential mediators which may be implicated in the effects of HCSMC on ≠HL60 cells, we analyzed the mRNA expression of 84 proinflammatory cytokines and receptors in HCSMC in absence or presence of fMLF. Our results have shown that HCSMC express various cytokines implicated in atherosclerosis such as IL8, CXCL12, IL1β, CCL2 (presented in bold in Table 2). The secretion of these cytokines, as well as

others, was then checked in ≠HL60/HCSMC co-cultures for 24 h. The cytokines secreted in co-cultures supernatants (IL8, CXCL12, IL1β, CCL2 and IL6, presented in bold in Table 3) are known to stimulate the recruitment and activation of leukocytes during the atherosclerotic process [23–25]. mRNA expressions and protein concentrations of the studied cytokines were not significantly modified by the addition of fMLF (Tables 2 and 3).

### Effect of Antioxidant Enzymes on MMP9 mRNA Expression, Zymographic Activity and Protein Levels in ≠HL60 Cells

SOD or Cat were used to reduce extracellular concentrations of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively and were added in ≠HL60 cells cultured alone or in co-culture with HCSMC for 24 h in presence or not of fMLF (10<sup>-6</sup> M).

*Effect on MMP9 mRNA expression.* MMP9 mRNAs were purified after 24 h treatment of ≠HL60 cells. By semi-quantitative PCR, fMLF-stimulation had no effect on mRNA levels. However, cell treatment with SOD or Cat increased the mRNA levels (data not shown). Expression of MMP9 mRNAs were then quantified using real-time PCR (the amount of MMP9 mRNAs was normalized as a ratio to the amount of βactin mRNA): mRNA levels of MMP9 were similar in resting and in fMLF-stimulated ≠HL60 cells (3.0±2.0 fold increase in 2<sup>-ΔΔCt</sup> vs basal condition). SOD and Cat upregulated mRNA expression of MMP9 in absence or presence of fMLF (14.7±6.2 and 16.8±8.9 in 2<sup>-ΔΔCt</sup> vs basal

**Table 1.** Effect of fMLF (A) or Effect of HCSMC (B) on Migration and Invasion Properties of ≠HL60 Cells in Cultures (≠HL60/0) and in Co-cultures (≠HL60/HCSMC)

		Mobility (%)	
		Basal	fMLF
<b>A</b>			
Effect of fMLF			
Migration of ≠HL60 cells (% vs basal value)	≠HL60/0	100	105±2
	≠HL60/HCSMC	100	112±5
Invasion of ≠HL60 cells (% vs basal value)	≠HL60/0	100	139±10*
	≠HL60/HCSMC	100	426±74*
<b>B</b>			
Effect of HCSMC			
Migration of ≠HL60 cells (% vs A, migration of ≠HL60/0)	≠HL60/HCSMC	156±11 <sup>&amp;</sup>	165±13 <sup>&amp;</sup>
Invasion of ≠HL60 cells (% vs A, invasion of ≠HL60/0)	≠HL60/HCSMC	51±5 <sup>&amp;</sup>	154±29

Effect of fMLF or effect of HCSMC on migration and invasion are expressed in percent of mobile cells vs basal value or vs ≠HL60 cells alone (≠HL60/0), respectively. Results are means ± SEM of at least 3 different experiments (*P*<0.05)

\*Significantly different from basal value

<sup>&</sup> Significantly different from ≠HL60 cells alone (≠HL60/0)

**Table 2.** mRNA Expression of Inflammatory Cytokines and Receptors Genes in HCSMC in Co-cultures, in Basal and fMLF Conditions

Genes panel	Symbol	Basal (Ct)	fMLF (Ct)	Fold increase or decrease
<b>Interleukin 8</b>	<b>IL8</b>	26.50±1.07	27.36±0.54	1.12
<b>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</b>	<b>CXCL12</b>	26.80±0.53	29.33±1.34	-2.86
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	28.02±1.45	30.80±2.07	-3.39
Chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	28.15±1.44	27.78±0.60	2.61
Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	CXCL6	28.52±1.64	31.77±2.08	-4.7
<b>Interleukin 1, beta</b>	<b>IL1β</b>	28.60±0.70	31.43±3.22	-3.51
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	28.94±0.64	29.56±0.19	1.32
Chemokine (C-C motif) ligand 7	CCL7	28.99±1.18	29.77±0.56	1.18
Interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	29.27±0.38	29.82±0.95	1.38
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	29.50±0.65	30.02±0.38	1.42
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 2</b>	<b>CCL2</b>	31.12±1.01	32.01±2.89	1.1
Small inducible cytokine subfamily E, member 1	SCYE1	31.20±1.55	32.43±0.51	-1.16
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	31.39±1.41	34.73±0.47	-5
Interleukin 1, alpha	IL1A	31.49±0.76	31.54±1.18	1.96
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	31.78±1.13	33.69±1.14	-1.85
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	31.88±2.73	30.19±0.80	6.57
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	31.90±1.01	33.68±1.15	-1.69
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	ABCF1	32.47±0.33	33.41±0.24	1.06
Chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	32.80±0.03	34.56±0.59	-1.66
Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	IL1F7	33.12±0.16	33.18±0.52	1.94
Toll interacting protein	TOLLIP	33.40±0.64	34.27±1.26	1.11
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	33.61±1.33	34.67±0.34	-1.03
Secreted phosphoprotein 1	SPP1	33.82±1.60	34.90±0.17	-1.04
Chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	33.98±0.92	34.08±0.70	1.89
Complement component 5	C5	34.10±0.72	34.42±1.00	1.62
Chemokine (C-C motif) ligand 17	CCL17	34.27±0.70	33.37±1.66	3.76
Chemokine (C-C motif) ligand 11	CCL11	34.66±0.47	34.98±0.03	1.62
Complement component 3	C3	34.96±0.06	34.87±0.22	2.16

Values are relative mRNA in Ct ± SEM, arranged from the highest (IL8) to the lowest expression (C3) in basal condition. Effect of fMLF in genes expression of HCSMC in co-cultures are also expressed in fold increase or decrease vs basal conditions. Results are from 3 different experiments ( $P < 0.05$ , \*: significantly different from basal conditions). The genes of HCSMC presented in bold express cytokines implicated in atherosclerosis

conditions, respectively or  $14.1 \pm 3.4^*$  and  $19.3 \pm 7.1$  in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vs fMLF stimulation conditions, respectively).

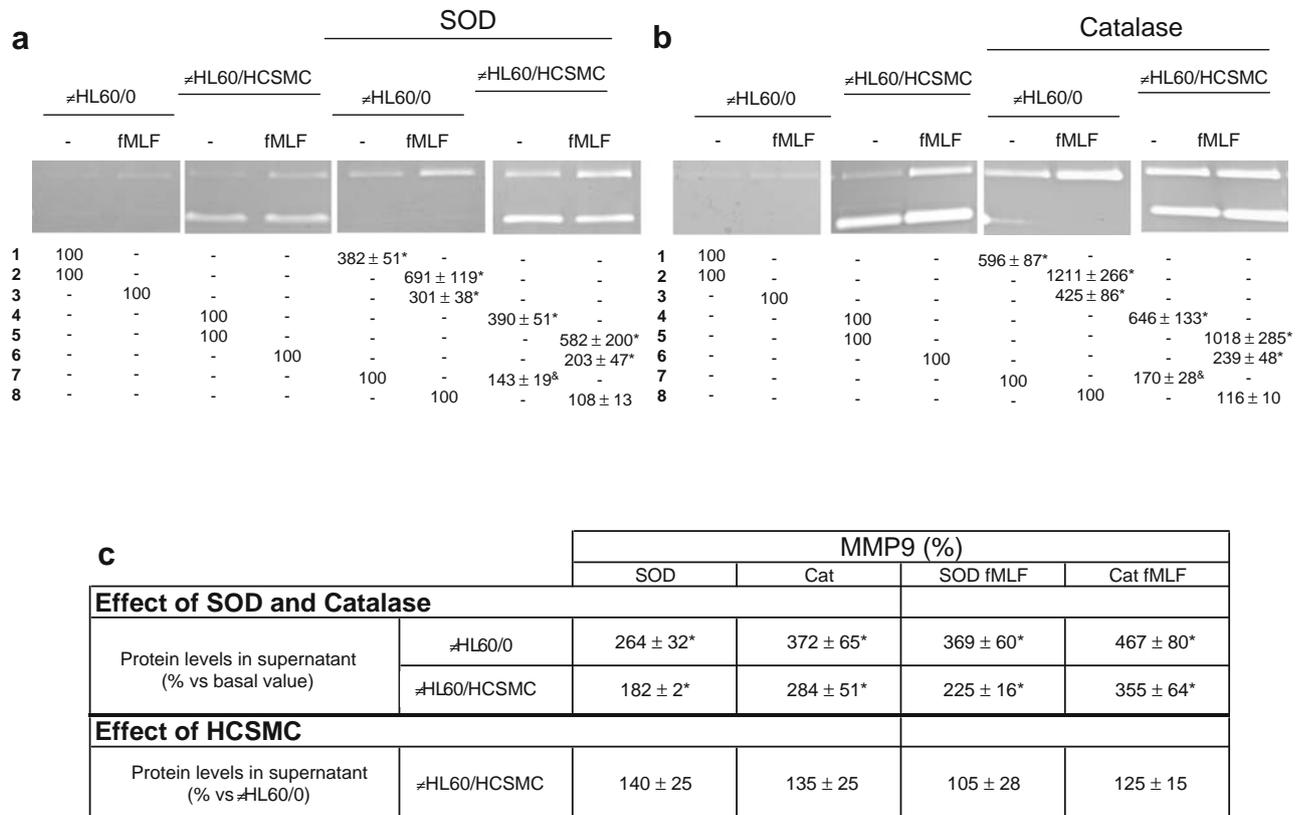
*Effect on ProMMP9 zymographic activity and MMP9 protein levels.* Incubation of  $\neq$ HL60 cells alone or  $\neq$ HL60/

HCSMC co-cultures with SOD or Cat in the absence or presence of fMLF for 24 h increased ProMMP9 gelatinolytic activity (Fig. 2A and B, lines 1, 2, 4 and 5) and MMP9 protein levels (Fig. 2C), suggesting a related down-regulating role for ROS on the secretion of MMP9

**Table 3.** Secretion of Inflammatory Cytokines in the Supernatants of  $\neq$ HL60/HCSMC Co-cultures, in Presence or Absence of fMLF

Cytokines panel	Symbol	Basal (pg/ml)	fMLF (pg/ml)
<b>Interleukin 8</b>	<b>IL8</b>	29182±7902	42694±7371
<b>Chemokine ligand 12</b>	<b>CXCL12</b>	68±16	78±24
<b>Interleukin 1, beta</b>	<b>IL1β</b>	9±2	8±1
<b>Chemokine ligand 2</b>	<b>CCL2</b>	4630±1317	5862±973
<b>Interleukin 6</b>	<b>IL6</b>	1483±493	1297±441
Interleukin 1α	IL1α	n.d	n.d
Interleukin 10	IL10	n.d	n.d
Interleukin 12	IL12	n.d	n.d
Interferon gamma	IFNγ	n.d	n.d
Tumor necrosis factor alpha	TNFα	n.d	n.d

Results are means ± SEM in pg/ml from 3 different experiments ( $P < 0.05$ , \*: significantly different from basal conditions). n.d: not detectable. The cytokines secreted in the co-cultures supernatants and presented in bold are implicated in atherosclerosis



**Fig. 2.** Zymographies: MMP2 and MMP9 activities in the supernatants of cultures of ≠HL60 cells alone (≠HL60/0) and of co-cultures with HCSMC (≠HL60/HCSMC), in absence or presence of fMLF and/or antioxidant enzymes: SOD (A) and Cat (B). Zymographies are representative experiments among at least 3. Effect of antioxidant enzymes or effect of HCSMC on ProMMP9 zymographic activity are expressed in percent vs basal value or in percent vs ≠HL60 cells alone (≠HL60/0), respectively. Results are means ± SEM of at least 3 different experiments ( $P < 0.05$ , asterisks: significantly different from control value, and signs: significantly different from ≠HL60 alone (≠HL60/0)). C Effect of antioxidant enzymes or HCSMC on MMP9 protein levels in the supernatants of ≠HL60 cells in cultures or co-cultures. Effect of antioxidant enzymes or effect of HCSMC on MMP9 protein levels are expressed in percent vs basal value or in percent vs ≠HL60 cells alone (≠HL60/0), respectively. Results are means ± SEM of at least 3 different experiments ( $P < 0.05$ , asterisks: significantly different from basal value, and signs: significantly different from respective ≠HL60 alone (≠HL60/0)).

by ≠HL60 cells and on the activity of ProMMP9, in our cell culture conditions. SOD and Cat enhanced ProMMP9 activity induced by fMLF suggesting an additive effect of the antioxidant enzymes (Fig. 2A and B, lines 3 and 6).

In basal condition, the upregulating role of HCSMC on ProMMP9 zymographic activity of ≠HL60 cells was conserved in the presence of SOD or Cat (Fig. 2A and B, line 7). In fMLF-stimulated conditions, however, the upregulating effect of HCSMC on ProMMP9 zymographic activity of ≠HL60 cells was not observed in presence of antioxidant enzymes (Fig. 2A and B, line 8). At the protein level, no upregulating role of HCSMC on MMP9 in presence of SOD or Cat, with or without fMLF was detected (Fig. 2C).

Altogether, these results showed that antioxidant enzymes stimulate MMP9 mRNA expression, protein

levels and ProMMP9 activity in ≠HL60 cells but seem to attenuate the upregulating effect of HCSMC.

#### Effect of Antioxidant Enzymes and HCSMC on the Mobility Properties of ≠HL60 Cells

*Effect of antioxidant enzymes in migration and invasion of ≠HL60 cells.* Addition of SOD had no effect on migration through a microporous membrane of ≠HL60 cells, cultured in absence or presence of HCSMC (Table 4A). Addition of SOD with fMLF stimulated migration of ≠HL60 cells only in presence of HCSMC ( $120 \pm 2^*$  % vs basal conditions). Cat reduced migration of ≠HL60 cells in basal conditions in absence or presence of HCSMC ( $75 \pm 3^*$  and  $75 \pm 2^*$  % vs basal conditions, respectively), but Cat with fMLF increased migration of ≠HL60 cells in

**Table 4.** Effect of Antioxidant Enzymes (A) and Effect of HCSMC (B) on Migration and Invasion Properties of  $\neq$ HL60 Cells in Cultures ( $\neq$ HL60/0) and in Co-cultures ( $\neq$ HL60/HCSMC)

		Mobility (%)			
		SOD	Cat	SOD fMLF	Cat fMLF
<b>A</b>					
Effect of SOD and Cat					
Migration of $\neq$ HL60 cells (% vs basal value)	$\neq$ HL60/0	91 $\pm$ 4	75 $\pm$ 3*	96 $\pm$ 4	110 $\pm$ 3*
	$\neq$ HL60/HCSMC	98 $\pm$ 4	75 $\pm$ 2*	120 $\pm$ 2*	112 $\pm$ 3*
Invasion of $\neq$ HL60 cells (% vs basal value)	$\neq$ HL60/0	133 $\pm$ 25	117 $\pm$ 11	107 $\pm$ 10	121 $\pm$ 16
	$\neq$ HL60/HCSMC	272 $\pm$ 119	351 $\pm$ 134	345 $\pm$ 109	373 $\pm$ 94
<b>B</b>					
Effect of HCSMC					
Migration of $\neq$ HL60 cells (% vs A, migration of $\neq$ HL60/0)	$\neq$ HL60/HCSMC	168 $\pm$ 8 <sup>&amp;</sup>	155 $\pm$ 7 <sup>&amp;</sup>	193 $\pm$ 8 <sup>&amp;</sup>	157 $\pm$ 6 <sup>&amp;</sup>
Invasion of $\neq$ HL60 cells (% vs A, migration of $\neq$ HL60/0)	$\neq$ HL60/HCSMC	87 $\pm$ 16	135 $\pm$ 33	150 $\pm$ 25	147 $\pm$ 18

Effect of antioxidant enzymes or effect of HCSMC on migration and invasion are expressed in percent of mobile cells vs basal value or vs  $\neq$ HL60 cells alone ( $\neq$ HL60/0). Results are means  $\pm$  SEM of at least 3 different experiments ( $P < 0.05$ , \*: significantly different from basal value, and <sup>&</sup>: significantly different from  $\neq$ HL60 alone ( $\neq$ HL60/0))

absence or presence of HCSMC (110 $\pm$ 3\* and 112 $\pm$ 3\* % vs basal conditions, respectively). SOD and Cat did not affect the invasive properties of  $\neq$ HL60 cells, in absence or presence of fMLF and HCSMC (Table 4A).

*Effect of HCSMC in migration and invasion of  $\neq$ HL60 cells.* The ability of HCSMC to stimulate migration of  $\neq$ HL60 cells (Table 1B) was not affected by SOD or Cat (Table 4B) but their capacity to reduce invasion of  $\neq$ HL60 cells (Table 1B) disappeared in presence of SOD or Cat (87 $\pm$ 16 and 135 $\pm$ 33% vs  $\neq$ HL60 cells alone, respectively) (Table 4B).

## DISCUSSION

Development of atherosclerosis is accompanied by an inflammatory process which is characterized by the recruitment of leukocytes within the vascular wall. Proinflammatory cytokines expressed within atheroma provide a chemotactic stimulus to the local adherent leukocytes, directing their migration into the intima [2]. During invasion of the vascular wall, activated leukocytes secrete MMPs, implicated in the degradation of the extracellular matrix, and ROS inducing an oxidative stress [3]. Thereby, a series of complex cellular interactions takes place between leukocytes and vascular cells, involving the secretion of a wide variety of cytokines, growth factors and ROS.

Herein, we used a co-culture system of DMSO-differentiated HL60 cells ( $\neq$ HL60) having similar functions, surface markers and morphological properties as neutrophils [17], and of commercially available HCSMCs from one

donor to explore the potential paracrine interactions that take place between both cell types. Our results indicate that MMP2 protein levels and ProMMP2 zymographic activity of HCSMC were not affected by co-culture experiments or that discrete variations could not be detected from the high basal values. However, resting  $\neq$ HL60 cells showed a basal MMP9 protein level with a weak ProMMP9 zymographic activity, which was increased by the presence of HCSMC. Other *in vitro* studies done on co-cultures used as models for atherosclerosis (monocytes and human vascular smooth muscle cells [14]) or for rheumatoid disease (macrophages and chondrocytes [26]) similarly showed enhanced MMP release and activity due to cellular interactions. In our model, paracrine interactions in the co-cultures may thus lead to the modulation of MMP9 secretion and ProMMP9 zymographic activity in  $\neq$ HL60 cells. Furthermore, secreted factors released by HCSMC also stimulated the simple migration of  $\neq$ HL60 cells through a microporous membrane. However, in resting conditions, the sole presence of HCSMC decreased invasion by  $\neq$ HL60 cells of a basement membrane model, suggesting a possible protective role of HCSMC in preserving the integrity of the vascular wall in non-inflamed conditions. The effect of fMLF stimulation in presence of HCSMC showed distinct results: the capacity of migration ability of  $\neq$ HL60 cells through a microporous membrane remained unchanged but their invasive response into an artificial reconstituted basement membrane was strongly potentiated, suggesting an enhanced effect of the factors secreted by HCSMC on invasion under inflammatory conditions.

Identification of some potential mediators expressed and secreted in our model of co-culture was also

investigated. Gene expression profiling of HCSMC and analysis of co-culture supernatants showed the mRNA expression of various cytokines and the secretion of corresponding proteins (IL8, CXCL12, IL1 $\beta$  and CCL2), along with the secretion of IL6 which was not tested on macroarrays. These cytokines are overexpressed within human atheroma and implicated in the recruitment and the activation of inflammatory cells such as neutrophils, monocytes, B cells or T cells during the initiation and progress of atherosclerosis [25, 27]. IL6 and IL1 $\beta$  are implicated in the recruitment and the inflammatory response of neutrophils [23, 28]. In our *in vitro* model of co-culture, IL1 $\beta$  was barely detected. However IL8, which is a specific chemoattractant for neutrophils [29] and leads to MMP9 release by human neutrophils [12], was shown to be the most highly expressed and secreted cytokine in our model of co-culture. CXCL12 or CCL2 are not specific neutrophil chemoattractants but previous studies described a synergistic effect of IL8 with CXCL12 or CCL2 in neutrophil migration through a microporous membrane [30]. Altogether, our data suggest that IL8, IL6, CCL2 and CXCL12, expressed or secreted in  $\neq$ HL60/HCSMC co-cultures, represent potential candidates responsible for the secretory and/or migratory response of  $\neq$ HL60 cells.

During invasion of the vascular wall, activated leukocytes also produce ROS and may induce an oxidative stress in the atherosclerotic lesions [3]. We explored the effects of ROS on the cellular interactions in our model of co-culture by adding SOD and Cat, which catalyze dismutation of superoxide anion and hydrogen peroxide, respectively. Both antioxidant enzymes increased expression and secretion of MMP9 as well as ProMMP9 enzymatic activity in our model of neutrophils cultured alone or in the presence of HCSMC, suggesting a downregulating role for ROS on MMP9 expression levels. However, in other cell types like rat cardiac fibroblast, ROS have previously been shown to increase MMPs activities [31]. They also activate latent proenzymes in supernatant of human vascular smooth muscle cells [13]. But, in neutrophils, former studies reported that SOD and Cat were able to delay the spontaneous apoptosis in culture media [32]. Therefore, the decreased oxidative status in the cultures may improve *in vitro* function and viability of  $\neq$ HL60 cells, leading to increased MMP9 protein levels and ProMMP9 enzymes activity, suggesting that this effect is dependent on the presence of extracellular ROS in the culture media. Moreover, the effects of HCSMC on ProMMP9 zymographic activity and MMP9 protein levels seem to decrease or disappear in the presence of the antioxidant enzymes. Previous studies also reported

that scavenging ROS by antioxidant is important for the regulation of cytokines production in endothelial cells [33, 34]. Extracellular ROS present in co-culture, especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which freely diffuses through the membrane, could modulate secretion of cytokines by HCSMC leading to modify their effect on ProMMP9 zymographic activity and MMP9 protein levels in  $\neq$ HL60 cells.

Although SOD or Cat increased ProMMP9 zymographic activity, invasive properties of  $\neq$ HL60 cells were untouched. This finding may be explained by the fact that the activity exhibited by ProMMP9 in zymography is due to chemical treatment by SDS and does not reflect a physiological capacity to degrade the extracellular matrix [35]. Migration properties of resting  $\neq$ HL60 cells through a microporous membrane were decreased by Cat whereas addition of fMLF with Cat induced an increase in migration. We must stress that Cat has been described to have opposite effects, *in vitro*, depending on the cell type: induction or overexpression of Cat decreases, for example, the mobility of vascular smooth muscle cells [36] but enhances the mobility of HELA cells stimulated by a cancer-associated gene [37]. *In vivo*, the use of SOD or Cat as therapeutic agents to attenuate ROS-induced injury has mixed results [38, 39]. In mice, overexpression of Cu/Zn-SOD or Mn-SOD increases oxidative damage [40, 41] and overexpression of Cat leads to an increased sensitivity to gamma radiation [42]. Our results suggest that extracellular ROS have a limited action on mobility of  $\neq$ HL60 cells.

In summary, we showed that (i) soluble factors released by HCSMC increase the release of MMP9 proteins and enhance ProMMP9 zymographic activity and mobility of  $\neq$ HL60 cells, (ii) a variety of mediators implicated in atherosclerosis were identified in  $\neq$ HL60/HCSMC co-cultures experiments and (iii) ROS seem to be more efficient in modulating  $\neq$ HL60 cells gelatinolytic activity than mobility.

Co-cultures of  $\neq$ HL60 cells and HCSMC may represent an *in vitro* approach to study cellular interactions occurring *in vivo* during atherosclerosis and may help to understand the inflammatory mechanism of the vascular wall in this pathology.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Université du Luxembourg and by a research grant (BFR 03/072) from the Ministère de la Culture, de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We thank Alexandre Salsmann for the critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Ross, R. 1999. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**:115–126.
- Hansson, G. K. 2001. Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **947**:157–165.
- Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**:868–874.
- Newby, A. C. 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol. Rev.* **85**:1–31.
- Kai, H., H. Ikeda, H. Yasukawa, M. Kai, Y. Seki, F. Kuwahara, T. Ueno, K. Sugi, and T. Imaizumi. 1998. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368–372.
- Ferroni, P., S. Basili, F. Martini, C. M. Cardarelli, F. Ceci, M. Di Franco, G. Bertazzoni, P. P. Gazzaniga, and C. Alessandri. 2003. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J. Invest. Med.* **51**:295–300.
- Bueb, J.-L., D. Zardini, E. Tschirhart, M. Gloesener, G. Gilson, and D. R. Wagner. 2003. Increased levels of Matrix Metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction: no correlation with C-Reactive Protein. *J. Am. Coll. Cardiol.* **S265233**.
- Robertson, L., L. Grip, L. Mattsson Hulthen, J. Hulthe, and O. Wiklund. 2007. Release of protein as well as activity of MMP-9 from unstable atherosclerotic plaques during percutaneous coronary intervention. *J. Intern. Med.* **262**:659–667.
- Mauviel, A. 1993. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Biochem.* **53**:288–295.
- Sato, H., T. Takino, T. Kinoshita, K. Imai, Y. Okada, W. G. Stetler Stevenson, and M. Seiki. 1996. Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett.* **385**:238–240.
- Denhardt, D. T., B. Feng, D. R. Edwards, E. T. Cocuzzi, and U. M. Malyankar. 1993. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol. Ther.* **59**:329–341.
- Chakrabarti, S., and K. D. Patel. 2005. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **78**:279–288.
- Rajagopalan, S., X. P. Meng, S. Ramasamy, D. G. Harrison, and Z. S. Galis. 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases *in vitro*. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* **98**:2572–2579.
- Lee, E., A. J. Grodzinsky, P. Libby, S. K. Clinton, M. W. Lark, and R. T. Lee. 1995. Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**:2284–2289.
- Vanderlaan, P. A., and C. A. Reardon. 2005. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **46**:829–838.
- Naruko, T., M. Ueda, K. Haze, A. C. van der Wal, C. M. van der Loos, A. Itoh, R. Komatsu, Y. Ikura, M. Ogami, Y. Shimada, S. Ehara, M. Yoshiyama, K. Takeuchi, J. Yoshikawa, and A. E. Becker. 2002. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* **106**:2894–2900.
- Collins, S. J. 1987. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**:1233–1244.
- Bréchar, S., J.-L. Bueb, and E. J. Tschirhart. 2005. Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium* **37**:531–540.
- Bréchar, S., A. Brunello, J.-L. Bueb, and E. J. Tschirhart. 2006. Modulation by cADPr of Ca<sup>2+</sup> mobilization and oxidative response in dimethylsulfoxide- or retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**:129–136.
- Valentin, F., J.-L. Bueb, C. Capdeville-Atkinson, and E. Tschirhart. 2001. Rac-1-mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> secretion requires Ca<sup>2+</sup> influx in neutrophil-like HL-60 cells. *Cell Calcium* **29**:409–415.
- Galis, Z. S., M. Muszynski, G. K. Sukhova, E. Simon-Morrissey, E. N. Unemori, M. W. Lark, E. Amento, and P. Libby. 1994. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.* **75**:181–189.
- Ries, C., H. Kolb, and P. E. Petrides. 1994. Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: tumor necrosis factor-alpha as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion. *Blood* **83**:3638–3646.
- Sawa, Y., H. Ichikawa, K. Kagisaki, T. Ohata, and H. Matsuda. 1998. Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **116**:511–517.
- Ridker, P. M., N. Rifai, M. J. Stampfer, and C. H. Hennekens. 2000. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* **101**:1767–1772.
- Schonbeck, U., and P. Libby. 2001. CD40 signaling and plaque instability. *Circ. Res.* **89**:1092–1103.
- Dreier, R., S. Wallace, S. Fuchs, P. Bruckner, and S. Grassel. 2001. Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J. Cell. Sci.* **114**:3813–3822.
- Christopherson, K., and R. Hromas. 2001. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* **19**:388–396.
- Miller, L. S., E. M. Pietras, L. H. Uricchio, K. Hirano, S. Rao, H. Lin, R. M. O'Connell, Y. Iwakura, A. L. Cheung, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2007. Inflammation-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus in vivo*. *J. Immunol.* **179**:6933–6942.
- Colditz, I., R. Zwahlen, B. Dewald, and M. Baggiolini. 1989. *In vivo* inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am. J. Pathol.* **134**:755–760.
- Gouwy, M., S. Struyf, J. Catusse, P. Proost, and J. Van Damme. 2004. Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* **76**:185–194.
- Siwik, D. A., P. J. Pagano, and W. S. Colucci. 2001. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**:C53–C60.
- Oishi, K., and K. Machida. 1997. Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidants in culture medium. *Scand. J. Immunol.* **45**:21–27.
- Ali, M. H., S. A. Schlidt, N. S. Chandel, K. L. Hynes, P. T. Schumacker, and B. L. Gewertz. 1999. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *Am. J. Physiol.* **277**:L1057–L1065.
- Hashimoto, S., Y. Gon, K. Matsumoto, I. Takeshita, and T. Horie. 2001. N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced p38 MAP kinase activation and p38 MAP kinase-mediated IL-8 production by human pulmonary vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **132**:270–276.
- Van Wart, H. E., and H. Birkedal-Hansen. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:5578–5582.

36. Nishio, E., and Y. Watanabe. 1997. The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Br. J. Pharmacol.* **121**:665–670.
37. Shim, H., E. Shim, H. Lee, J. Hahn, D. Kang, Y. S. Lee, and D. Jeoung. 2006. CAGE, a novel cancer/testis antigen gene, promotes cell motility by activation ERK and p38 MAPK and down-regulating ROS. *Mol. Cells* **21**:367–375.
38. Lardot, C., F. Broeckaert, D. Lison, J. P. Buchet, and R. Lauwerys. 1996. Exogenous catalase may potentiate oxidant-mediated lung injury in the female Sprague–Dawley rat. *J. Toxicol. Environ. Health* **47**:509–522.
39. Simonson, S. G., K. E. Welty-Wolf, Y. C. Huang, D. E. Taylor, S. P. Kantrow, M. S. Carraway, J. D. Crapo, and C. A. Piantadosi. 1997. Aerosolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates. I. Physiology and biochemistry. *J. Appl. Physiol.* **83**:550–558.
40. Raineri, I., E. J. Carlson, R. Gacayan, S. Carra, T. D. Oberley, T. T. Huang, and C. J. Epstein. 2001. Strain-dependent high-level expression of a transgene for manganese superoxide dismutase is associated with growth retardation and decreased fertility. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1018–1030.
41. Rando, T. A., R. S. Crowley, E. J. Carlson, C. J. Epstein, and P. K. Mohapatra. 1998. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase: a novel cause of murine muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **44**:381–386.
42. Chen, X., H. Liang, H. Van Remmen, J. Vijg, and A. Richardson. 2004. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**:197–210.

L'effet des traitements et des HCSCMC sur la concentration et l'activité ProMMP9 ainsi que sur la mobilité des #HL60, présentés dans les tableaux de la publication précédente sont repris et condensés dans les deux tableaux ci-dessous :

	Basale	fMLF	SOD	Cat	SOD fMLF	Cat fMLF
<b>Activité</b>						
#HL60/0 : Effet des traitements (% vs basale)	100	227 ± 29*	382 ± 51*	596 ± 87*	691 ± 119*	1211 ± 266*
#HL60/HCSCMC : Effet des traitements (% vs basale)	100	295 ± 94*	390 ± 51*	646 ± 133*	582 ± 200*	1018 ± 285*
#HL60/HCSCMC : Effet des HCSCMC (% vs HL60 seules)	208 ± 31 <sup>&amp;</sup>	237 ± 30 <sup>&amp;</sup>	143 ± 19 <sup>&amp;</sup>	170 ± 28 <sup>&amp;</sup>	108 ± 13	116 ± 10
<b>Concentration</b>						
#HL60/0 : Effet des traitements (% vs valeur basale)	100	235 ± 17*	264 ± 32*	372 ± 65*	369 ± 60*	467 ± 80*
#HL60/HCSCMC : Effet des traitements (% vs valeur basale)	100	204 ± 21*	182 ± 2*	284 ± 51*	225 ± 16*	355 ± 64*
#HL60/HCSCMC : Effet des HCSCMC (% vs #HL60 seules)	180 ± 20 <sup>&amp;</sup>	163 ± 36	140 ± 25	135 ± 25	105 ± 28	125 ± 15

**Tableau 6** : Effet des traitements et des HCSCMC sur la concentration et l'activité ProMMP9 des #HL60.

	Basale	fMLF	SOD	Cat	SOD fMLF	Cat fMLF
<b>Migration</b>						
#HL60/0 : Effet des traitements (% vs valeur basale)	100	105 ± 2	91 ± 4	75 ± 3*	96 ± 4	110 ± 3*
#HL60/HCSCMC : Effet des traitements (% vs valeur basale)	100	112 ± 5	98 ± 4	75 ± 2*	120 ± 2*	112 ± 3*
#HL60/HCSCMC : Effet des HCSCMC (% vs traitement des #HL60 seules)	156 ± 11 <sup>&amp;</sup>	165 ± 13 <sup>&amp;</sup>	168 ± 8 <sup>&amp;</sup>	155 ± 7 <sup>&amp;</sup>	193 ± 8 <sup>&amp;</sup>	157 ± 6 <sup>&amp;</sup>
<b>Invasion</b>						
#HL60/0 : Effet des traitements (% vs valeur basale)	100	139 ± 10*	133 ± 25	117 ± 11	107 ± 10	121 ± 16
#HL60/HCSCMC : Effet des traitements (% vs valeur basale)	100	426 ± 74*	272 ± 119	351 ± 134	345 ± 109	373 ± 94
#HL60/HCSCMC : Effet des HCSCMC (% vs #HL60 seules)	51 ± 5 <sup>&amp;</sup>	154 ± 29	87 ± 16	135 ± 33	150 ± 25	147 ± 18*

**Tableau 7** : Effet des traitements et des HCSCMC sur les propriétés migratoires et invasives des #HL60.

*Dans cet article, nous montrons que :*

- *La présence de cellules musculaires lisses de coronaires humaines, en coculture, stimule la sécrétion de la protéine MMP9 et l'activité enzymatique ProMMP9 de notre modèle de neutrophile,*
- *Les cellules musculaires lisses de coronaires humaines, placées en chambre de Boyden, stimulent la migration et potentialisent la réponse invasive au peptide fMLF de notre modèle de neutrophiles,*
- *Certaines cytokines proinflammatoires exprimées par les HCSCMC et/ou sécrétées dans le surnageant de notre modèle de coculture pourraient être impliquées dans la réponse de notre modèle de neutrophiles,*
- *L'addition d'enzymes antioxydantes a peu d'effet sur les capacités migratoires et invasives, augmente la sécrétion de la protéine MMP9 et l'activité enzymatique ProMMP9, et semble diminuer l'effet stimulant des cellules musculaires lisses de coronaires humaines sur la sécrétion et l'activité ProMMP9 de notre modèle de neutrophiles,*

Nous avons ensuite comparé, en présence de cellules musculaires lisses de coronaires humaines (HCSCMC), la réponse des HL60 non différenciées lors d'expériences de coculture, de migration et d'invasion.

## C Effet des cellules musculaires sur les HL60 non différenciées

### a Coculture et activité MMP9

Les HL60 ( $9 \times 10^5$  cellules/0,5 mL) ont été placées sur une membrane poreuse, au-dessus d'une couche de HCSCMC, et ont été stimulées par le fMLF ( $10^{-6}$  M). Nous n'avons pas observé de modification de l'activité enzymatique ProMMP9 dans le surnageant de coculture HL60/HCSCMC après 24h d'incubation (figure 17).

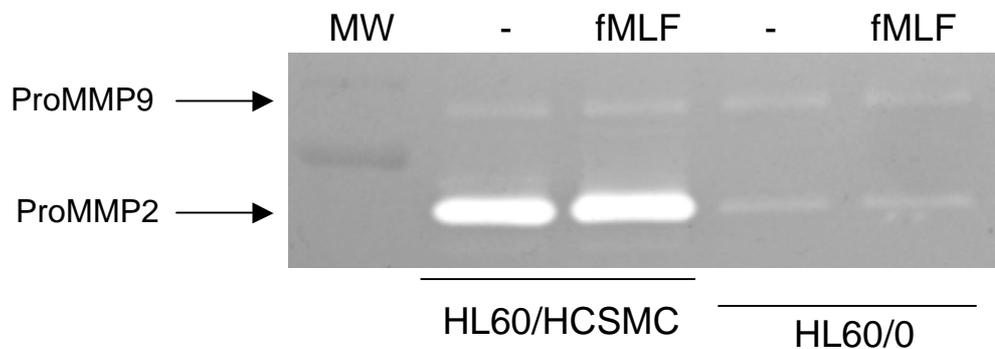


Figure 17. Exemple de zymographie représentative de surnageants de cocultures HL60/HCSCMC. Les expériences ont été réalisées avec 90000 HCSCMC, en présence ou en absence de HL60 activées (fMLF,  $10^{-6}$  M) ou non pendant 24h.

### b Migration et invasion

Nous avons déterminé l'effet des traitements sur la mobilité des HL60, en présence ou absence de HCSCMC, puis nous avons déterminé l'effet des HCSCMC sur la mobilité des HL60 dans les différentes conditions de stimulation (tableau 8).

	Basale	fMLF	SOD	Cat	SOD fMLF	Cat fMLF
<b>Migration</b>						
<i>Effet des traitements HL60/0</i> (% vs basale)	100	75 ± 6*	70 ± 5*	65 ± 6*	71 ± 7*	64 ± 5*
<i>Effet des traitements HL60/HCSMC</i> (% vs basale)	100	88 ± 3*	85 ± 10	73 ± 5*	83 ± 7	80 ± 4*
<i>Effet des HCSMC</i> (% vs HL60 seule)	134 ± 15	156 ± 12*	165 ± 29	149 ± 6*	157 ± 7*	163 ± 9*
<b>Invasion</b>						
<i>Effet des traitements HL60/0</i> (% vs basale)	100	112 ± 14	163 ± 32	167 ± 52	135 ± 22	137 ± 47
<i>Effet des traitements HL60/HCSMC</i> (% vs basale)	100	102 ± 8	139 ± 22	145 ± 15	124 ± 26	108 ± 15
<i>Effet des HCSMC</i> (% vs HL60 seule)	142 ± 52	121 ± 35	104 ± 21	121 ± 26	105 ± 19	110 ± 19

**Tableau 8 :** Effet des traitements et des HCSMC sur les propriétés de migration et d'invasion des HL60. Les résultats sont exprimés en moyenne ± E.S.M., n=3. \* : p < 0,05 pour la différence entre les conditions contrôles et stimulées.

Ces résultats indiquent que :

- la stimulation par le peptide fMLF ne permet pas d'augmenter la mobilité des HL60 non différenciées en présence ou non de HCSMC,
- les HCSMC stimulent la migration, mais n'ont pas d'effets sur les capacités invasives des HL60 non différenciées.

*La présence de HCSMC ne permet pas de stimuler l'activité enzymatique ProMMP9 et les capacités invasives des HL60 non différenciées. Il apparaît que la différenciation des HL60 par le DMSO en un modèle de neutrophiles rende ces cellules sensibles à la présence de HCSMC et entraîne l'apparition d'une réponse spécifique caractérisée par la stimulation de l'activité enzymatique ProMMP9 et des capacités invasives.*

Afin de préciser les médiateurs mis en jeu dans notre modèle de coculture #HL60/HCSMC, nous avons déterminé l'expression de cytokines inflammatoires et de leurs récepteurs par les HCSMC.

#### D Identification des médiateurs

- a Analyse de certains gènes exprimés par les cellules musculaires en coculture.

Nous avons analysé l'expression de l'ARNm de 84 cytokines et/ou de leurs récepteurs, impliqués dans divers phénomènes inflammatoires, par les HCSMC en coculture avec les #HL60, en présence ou non de fMLF (respectivement figures 18 et 19). Les valeurs dépassant les 35 cycles seuils (Ct) sont considérées comme trop faibles pour avoir une signification biologique et ne sont donc pas représentées en détail.

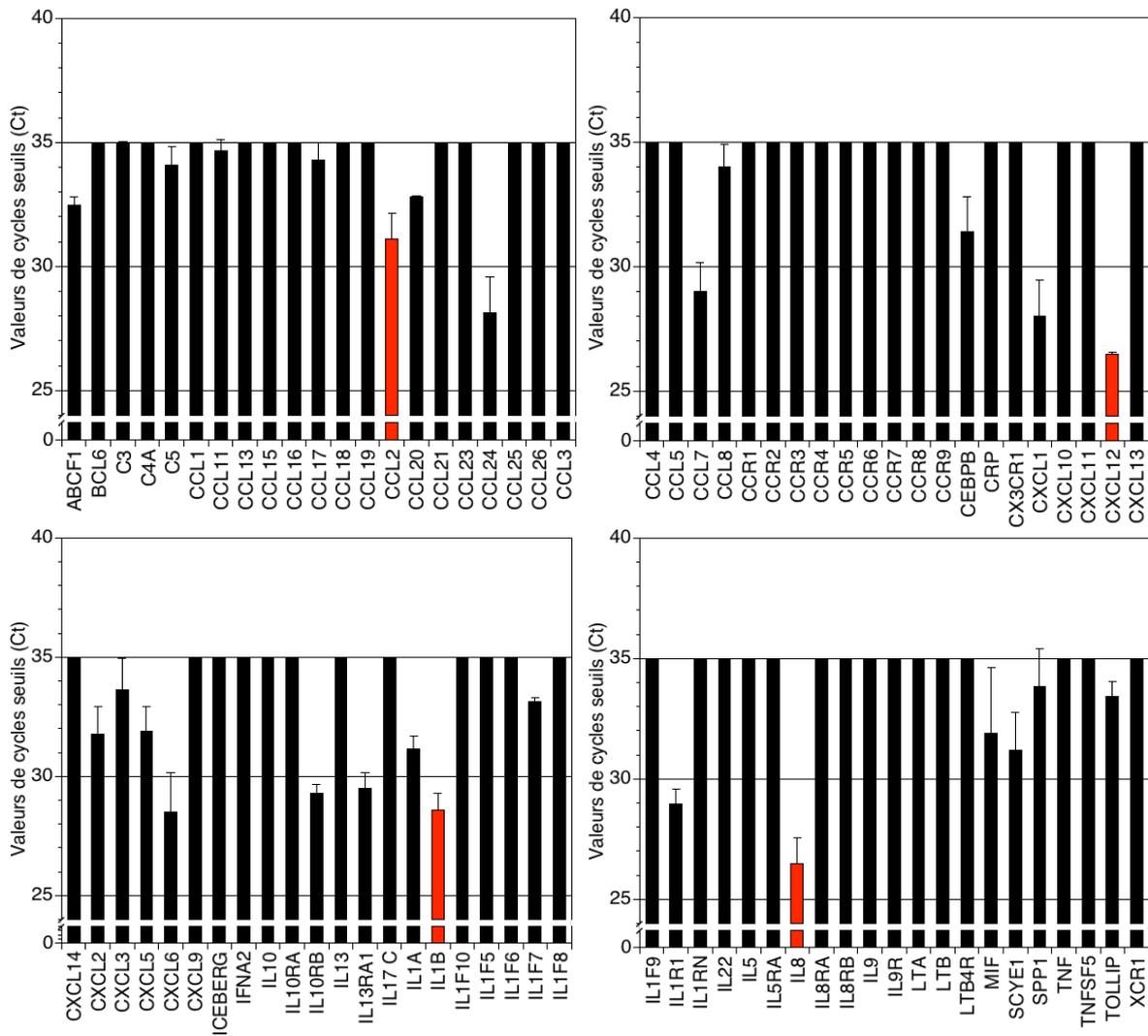
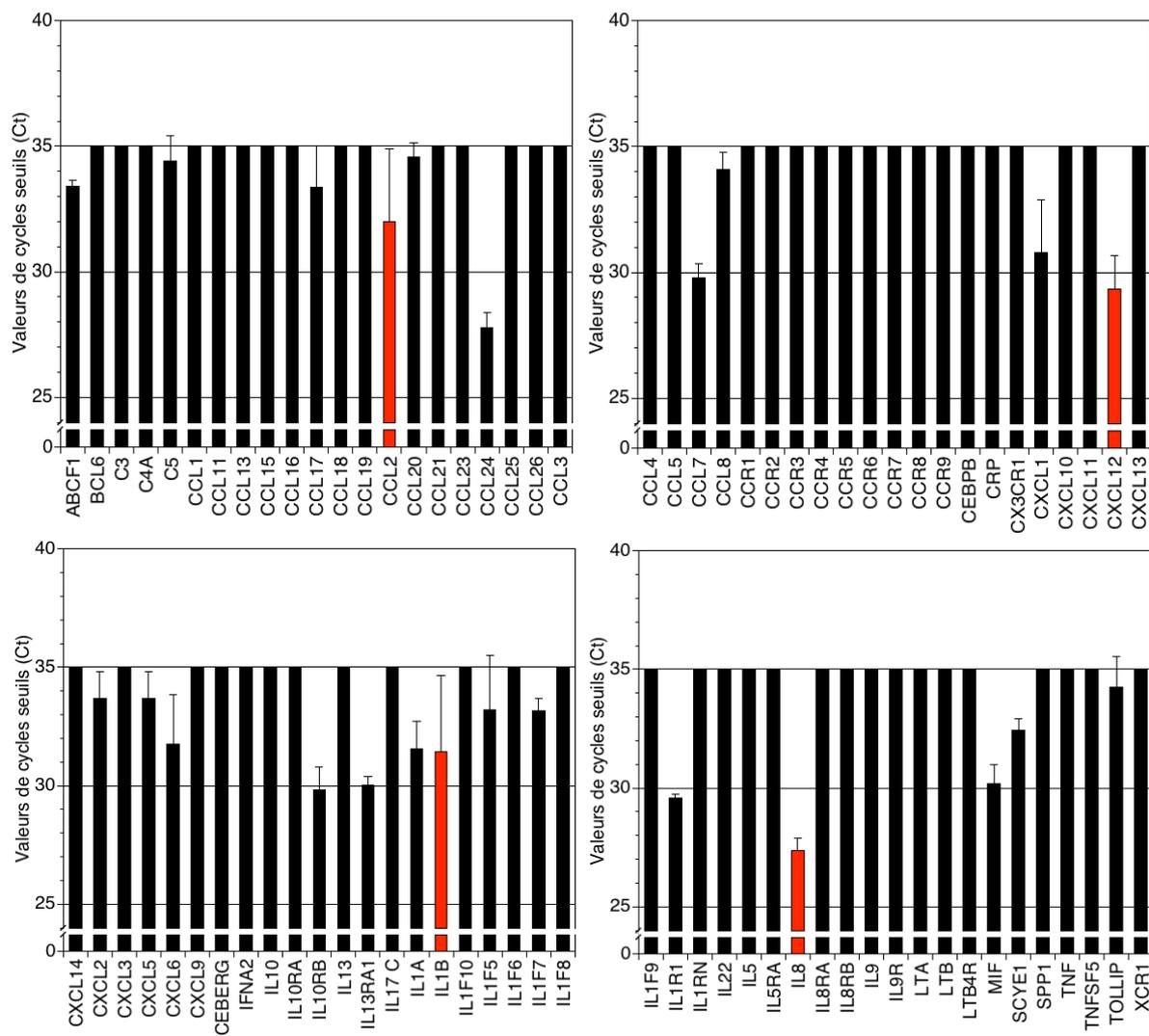


Figure 18. Analyse de l'expression de l'ARNm des cytokines proinflammatoires et/ou de leurs récepteurs par des HCSMC, en coculture avec des #HL60, exprimée en Ct  $\pm$  E.S.M. (n=3).



**Figure 19.** Analyse de l'expression de l'ARNm des cytokines proinflammatoires et/ou de leurs récepteurs par des HCSMC, en coculture avec des #HL60 stimulées par le fMLF, exprimée en Ct  $\pm$  E.S.M. (n=3).

Les résultats montrent que parmi les 84 gènes testés, moins d'une trentaine sont exprimés de façon significative (<35 Ct) par les HCSMC : exactement 25 dans le cas de cocultures avec les #HL60 (figure 18) et 28 dans le cas de cocultures avec les #HL60 stimulées par le fMLF (figure 19).

Parmi les gènes exprimés par les HCSMC, certaines cytokines et chémokines sont présentes au cours de l'athérosclérose et sont impliquées dans le

recrutement et l'activation des leucocytes comme l'IL8, l'IL1 $\beta$ , CCL2 et CXCL12 (en rouge dans les figures 18 et 19 et dans les tableaux à suivre).

b Effet de de la coculture et effet du fMLF sur l'expression de l'ARNm par les cellules musculaires.

- Effet de la coculture sur l'expression de l'ARNm par les cellules musculaires lisses de coronaires humaines.

Nous avons comparé l'expression de cytokines et/ou de leurs récepteurs par des HCSCMC en coculture à celle des HCSCMC en culture seule, en présence ou non de fMLF (respectivement tableaux 9 et 10).

Dans les tableaux suivants sont présentés :

- la description et le symbole du gène étudié,
- la moyenne et l'écart standard à la moyenne des cycles seuils ou Ct (Moyenne  $\pm$  E.S.M),
- la variation de la condition testée ( $\neq$ HL60/HCSCMC) par rapport à la condition contrôle (HCSCMC seules) en présence ou non de fMLF,
- la significativité de la variation, exprimée par la valeur du test T.

Les valeurs des cycles seuils (Ct) de l'ARNm exprimé par les HCSCMC, ont été classées par ordre croissant lors une culture seule de HCSCMC (tableau 9 et 10) ou en condition basal lors une coculture (tableau 11) et divisées en trois parties : valeurs inférieures à 30 Ct, entre 30 et 35 Ct et au-delà de 35 Ct, cette dernière catégorie n'étant pas représentée.

Panel de gènes	Symbole	Culture (Ct)	Coculture (Ct)	Variation	T test
Interleukin 8	IL8	26.94 ± 0.49	26.50 ± 1.07	1.07	0.87
Chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	27.05 ± 0.90	28.15 ± 1.44	-2.73	0.24
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	CXCL12	27.22 ± 0.52	26.80 ± 0.53	1.05	0.87
Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	CXCL6	27.96 ± 2.17	28.52 ± 1.64	-1.88	0.60
Interleukin 1, beta	IL1B	29.31 ± 1.03	28.60 ± 0.70	1.29	0.54
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	29.03 ± 0.72	28.02 ± 1.45	1.58	0.46
Chemokine (C-C motif) ligand 7	CCL7	29.83 ± 0.60	28.99 ± 1.18	1.41	0.51
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	29.89 ± 0.48	28.94 ± 0.64	1.52	0.23
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	29.95 ± 0.63	29.50 ± 0.65	1.07	0.75
Interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	30.83 ± 3.64	29.27 ± 0.38	2.33	0.56
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	31.07 ± 0.15	31.88 ± 2.73	-2.23	0.52
Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	31.42 ± 0.40	31.12 ± 1.01	-1.03	0.96
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	31.44 ± 1.68	31.39 ± 1.41	-1.23	0.80
Interleukin 1, alpha	IL1A	32.18 ± 0.39	31.49 ± 0.76	1.27	0.45
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	32.20 ± 1.14	31.78 ± 1.13	1.05	0.94
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	32.36 ± 1.76	31.90 ± 1.01	1.08	0.93
Small inducible cytokine subfamily E, member 1	SCYE1	32.65 ± 0.52	31.20 ± 1.55	2.14	0.32
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	ABCF1	33.39 ± 1.14	32.47 ± 0.33	1.49	0.34
Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	IL1F7	33.71 ± 1.12	33.12 ± 0.16	1.19	0.63
Chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	33.88 ± 0.52	33.98 ± 0.92	-1.36	0.50
Chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	33.96 ± 1.61	32.80 ± 0.03	1.75	0.46
Chemokine (C-C motif) ligand 11	CCL11	34.14 ± 0.48	34.66 ± 0.47	-1.82	0.20
Chemokine (C-C motif) ligand 17	CCL17	34.31 ± 1.20	34.27 ± 0.70	-1.23	0.78
Toll interacting protein	TOLLIP	34.53 ± 0.74	33.40 ± 0.64	1.72	0.07
Complement component 5	C5	34.86 ± 0.24	34.10 ± 0.72	1.34	0.28
Complement component 3	C3	34.87 ± 0.22	34.96 ± 0.06	-1.46	0.21
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	34.90 ± 0.17	33.61 ± 1.33	1.92	0.26
Secreted phosphoprotein 1	SPP1	34.96 ± 0.06	33.82 ± 1.60	1.73	0.43

**Tableau 9** : Analyse de l'expression de l'ARNm de cytokines inflammatoires et/ou de leurs récepteurs par les HCSMC en culture et en coculture avec les  $\neq$ HL60, exprimée en Ct (Moyenne  $\pm$  E.S.M., n=3). Les variations sont exprimées par rapport aux HCSMC seules en culture.

Panel de gènes	Symbole	Culture (Ct)	Coculture (Ct)	Variation	T test
Chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	25.97 ± 0.54	27.78 ± 0.60	-4.47	0.21
Interleukin 8	IL8	26.60 ± 0.76	27.36 ± 0.54	-2.15	0.40
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	CXCL12	27.21 ± 0.67	29.33 ± 1.34	-5.54	0.18
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	28.33 ± 0.34	30.80 ± 2.07	-7.05	0.06
Interleukin 1 receptor, type I	IL1R1	28.84 ± 0.42	29.56 ± 0.19	-2.10	0.51
Interleukin 1, beta	IL1B	29.54 ± 1.03	31.43 ± 3.22	-4.69	0.16
Chemokine (C-C motif) ligand 7	CCL7	29.74 ± 0.34	29.77 ± 0.56	-1.30	0.79
Interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	29.94 ± 0.21	29.82 ± 0.95	-1.17	0.84
Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	29.96 ± 1.15	32.01 ± 2.89	-5.24	0.14
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	30.01 ± 0.64	30.02 ± 0.38	-1.28	0.73
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	31.11 ± 1.87	30.19 ± 0.80	1.49	0.19
Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	CXCL6	31.11 ± 2.15	31.77 ± 2.08	-2.01	0.66
Interleukin 1, alpha	IL1A	31.53 ± 0.70	31.54 ± 1.18	-1.27	0.83
Small inducible cytokine subfamily E, member 1	SCYE1	31.62 ± 0.20	32.43 ± 0.51	-2.22	0.41
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	32.05 ± 1.40	33.75 ± 0.80	-4.14	0.34
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	32.95 ± 1.78	33.68 ± 1.15	-2.10	0.64
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	ABCF1	33.04 ± 0.62	33.41 ± 0.24	-1.64	0.66
Chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	33.46 ± 1.29	34.08 ± 0.70	-1.95	0.50
Chemokine (C-C motif) ligand 17	CCL17	33.76 ± 1.18	33.37 ± 1.66	1.03	0.98
Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	IL1F7	34.02 ± 1.70	33.18 ± 0.52	1.40	0.74
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	34.18 ± 0.72	33.69 ± 1.14	1.11	0.94
Toll interacting protein	TOLLIP	34.20 ± 0.92	34.27 ± 1.26	-1.33	0.73
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	34.23 ± 0.18	34.70 ± 0.30	-1.77	0.55
Complement component 5	C5	34.48 ± 0.53	34.42 ± 1.00	-1.22	0.85
Chemokine (C-C motif) ligand 11	CCL11	34.54 ± 0.19	34.98 ± 0.03	-1.73	0.54
Chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	34.56 ± 0.39	34.56 ± 0.59	-1.27	0.77
Complement component 3	C3	34.69 ± 0.30	34.87 ± 0.22	-1.44	0.73
Secreted phosphoprotein 1	SPP1	34.85 ± 0.26	34.81 ± 0.21	-1.23	0.80

**Tableau 10** : Analyse de l'expression de l'ARNm de cytokines inflammatoires et/ou de leurs récepteurs par les HCSMC culture et en coculture avec des  $\neq$ HL60 en présence de fMLF, exprimée en Ct (Moyenne  $\pm$  E.S.M., n=3). Les variations sont exprimées par rapport aux HCSMC seules en culture, en présence de fMLF.

Nos résultats indiquent qu'il n'existe pas différence significative entre l'expression des gènes des HCSMC en coculture et seules en culture, en présence ou non de fMLF. Nous constatons cependant que l'expression de certains gènes, bien que n'atteignant pas le seuil de significativité, tend à l'augmentation (TOLLIP) en condition basale ou à la diminution (CXCL1) en présence de fMLF.

- Effet du fMLF sur l'expression de l'ARNm par les HCSCM.

Nous avons ensuite analysé un potentiel effet du fMLF sur ces cocultures quant à l'expression de l'ARNm des cytokines inflammatoires et de leurs récepteurs par les HCSCM (tableau 11).

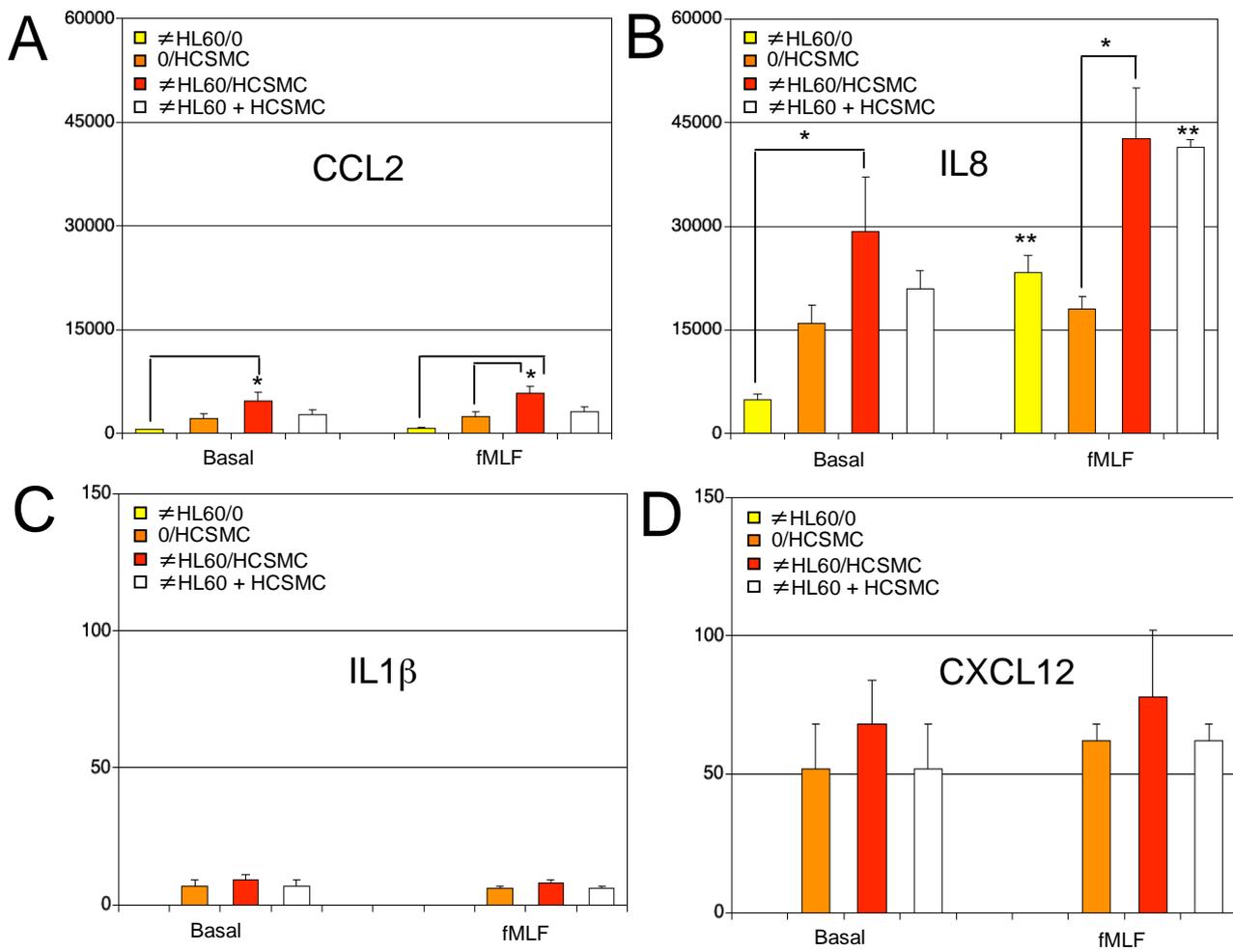
Panel de gènes	Symbole	Basal (Ct)	fMLF (Ct)	Variation	T test
Interleukin 8	IL8	26.50 ± 1.07	27.36 ± 0.54	1.12	0.89
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	CXCL12	26.80 ± 0.53	29.33 ± 1.34	-2.86	0.07
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	28.02 ± 1.45	30.80 ± 2.07	-3.39	0.11
Chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	28.15 ± 1.44	27.78 ± 0.60	2.61	0.21
Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	CXCL6	28.52 ± 1.64	31.77 ± 2.08	-4.70	0.09
Interleukin 1, beta	IL1B	28.60 ± 0.70	31.43 ± 3.22	-3.51	0.21
Interleukin 1 receptor, type 1	IL1R1	28.94 ± 0.64	29.56 ± 0.19	1.32	0.61
Chemokine (C-C motif) ligand 7	CCL7	28.99 ± 1.18	29.77 ± 0.56	1.18	0.84
Interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	29.27 ± 0.38	29.82 ± 0.95	1.38	0.29
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	29.50 ± 0.65	30.02 ± 0.38	1.42	0.46
Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	31.12 ± 1.01	32.01 ± 2.89	1.10	0.92
Small inducible cytokine subfamily E, member 1	SCYE1	31.20 ± 1.55	32.43 ± 0.51	-1.16	0.83
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	31.39 ± 1.41	33.75 ± 0.80	-2.54	0.37
Interleukin 1, alpha	IL1A	31.49 ± 0.76	31.54 ± 1.18	1.96	0.48
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	31.78 ± 1.13	33.69 ± 1.14	-1.85	0.47
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	31.88 ± 2.73	30.19 ± 0.80	6.57	0.17
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	31.90 ± 1.01	33.68 ± 1.15	-1.69	0.53
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	ABCF1	32.47 ± 0.33	33.41 ± 0.24	1.06	0.90
Chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	32.80 ± 0.03	34.56 ± 0.59	-1.66	0.31
Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	IL1F7	33.12 ± 0.16	33.18 ± 0.52	1.94	0.26
Toll interacting protein	TOLLIP	33.40 ± 0.64	34.27 ± 1.26	1.11	0.80
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	33.61 ± 1.33	34.70 ± 0.30	-1.05	0.94
Secreted phosphoprotein 1	SPP1	33.82 ± 1.60	34.81 ± 0.21	-1.04	0.97
Chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	33.98 ± 0.92	34.08 ± 0.70	1.89	0.45
Complement component 5	C5	34.10 ± 0.72	34.42 ± 1.00	1.62	0.27
Chemokine (C-C motif) ligand 17	CCL17	34.27 ± 0.70	33.37 ± 1.66	3.76	0.31
Chemokine (C-C motif) ligand 11	CCL11	34.66 ± 0.47	34.98 ± 0.03	1.62	0.36
Complement component 3	C3	34.96 ± 0.06	34.87 ± 0.22	2.16	0.16

**Tableau 11** : Analyse de l'expression de l'ARNm de cytokines inflammatoires et de leurs récepteurs par les HCSCM en coculture avec des #HL60 stimulées par le fMLF exprimée en Ct (Moyenne ± E.S.M., n=3). Les variations sont exprimées par rapport aux HCSCM en coculture avec des #HL60 non stimulées.

Les résultats indiquent qu'il n'existe pas de différence significative en présence ou non de fMLF. L'expression du gène CXCL12, bien que n'atteignant pas le seuil de significativité, tend cependant à la diminution.

c Analyse des cytokines secrétées dans le surnageant de culture et de coculture.

Nous avons mesuré la concentration des cytokines IL8, IL1 $\beta$ , CCL2 et CXL12 dans les surnageants de culture de  $\#HL60$  ( $\#HL60/0$ ) et de HCSCMC (0/HCSCMC) et dans ceux de cocultures  $\#HL60/HCSCMC$ , en présence ou en absence de fMLF. Pour chaque cytokine testée, nous avons également additionné la concentration mesurée dans une culture de  $\#HL60$  ( $\#HL60/0$ ) à celle mesurée dans une culture de HCSCMC (0/HCSCMC). Cette valeur notée  $\#HL60 + HCSCMC$  est représentée par des colonnes blanches dans les figures ci-après.



**Figure 20.** Concentrations en pg/mL des cytokines CCL2 (A), IL8 (B), IL1 $\beta$  (C) et CXCL12 (D) s $\acute{e}$ cr $\acute{e}$ t $\acute{e}$ es dans les surnageants de cultures de #HL60 ou de HCSMC et dans ceux de cocultures #HL60/HCSMC, en pr $\acute{e}$ sence ou en absence de fMLF, n=3. \* : p < 0,05 pour la diff $\acute{e}$ rence entre la coculture (#HL60/HCSMC) et les cultures seules (#HL60/0, 0/HCSMC ou #HL60/0 + 0/HCSMC), \*\* : p < 0,05 pour la diff $\acute{e}$ rence entre les conditions basales et respectivement stimul $\acute{e}$ es par le fMLF.

*Les r $\acute{e}$ sultats indiquent des concentrations beaucoup plus importantes (environ 2  $\grave{a}$  3 logs) en CCL2 et IL8 compar $\acute{e}$ es aux concentrations mesur $\acute{e}$ es pour IL1 $\beta$  et CXL12 en coculture, en pr $\acute{e}$ sence ou en absence de fMLF.*

- Effet de la coculture sur la concentration en cytokines.

Nous observons une augmentation des concentrations en cytokines CCL2 et IL8 lors d'une coculture ( $\neq$ HL60/HCSMC) comparée à une culture de  $\neq$ HL60 ( $\neq$ HL60/0) ou de HCSMC (0/HCSMC), en présence ou en absence de fMLF. Cependant, les résultats indiquent que les concentrations mesurées en coculture sont comparables à la somme des concentrations pour les  $\neq$ HL60 et les HCSMC en culture ( $\neq$ HL60/0 + 0/HCSMC). Ces résultats suggèrent que la présence de  $\neq$ HL60 et de HCSMC en coculture n'a pas d'effet sur la concentration des cytokines testées.

- Effet du fMLF sur la concentration en cytokines.

La stimulation par le fMLF ne modifie pas la concentration en CCL2, IL1 $\beta$  et CXCL12 dans le surnageant de culture de  $\neq$ HL60 ( $\neq$ HL60/0) et de HCSMC (0/HCSMC) et dans ceux de coculture ( $\neq$ HL60/HCSMC). Toutefois, le fMLF stimule la production d'IL8 par les  $\neq$ HL60 d'environ 5x comparée à la condition basale. Nous ne détectons pas de modification de la concentration en IL8 dans le surnageant de HCSMC ni dans celui de coculture. L'importante augmentation en IL8 détectée après stimulation des  $\neq$ HL60 par le fMLF reste significative après addition de la concentration mesurée sur les HCSMC en présence de fMLF ( $\neq$ HL60 + HCSMC).

Nous avons élargi l'étude à d'autres cytokines dans les conditions de coculture, en présence ou en absence de fMLF, par une technique ELISA permettant de mesurer simultanément plusieurs cytokines. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Panel de cytokines	Symbole	Basal (pg/ml)	fMLF (pg/ml)
Interleukin 1 $\alpha$	IL1 $\alpha$	n.d	n.d
Interleukin 6	IL6	1483 $\pm$ 493	1297 $\pm$ 441
Interleukin 10	IL10	n.d	n.d
Interleukin 12	IL12	n.d	n.d
Interferon gamma	IFN $\gamma$	n.d	n.d
Tumor necrosis factor alpha	TNF $\alpha$	n.d	n.d

Tableau 12 : Concentrations en cytokines dans une coculture #HL60/HCSMC en présence ou en absence de fMLF, n=3. \* : p < 0,05 pour la différence entre les conditions basales et stimulées par le fMLF, n.d : non détectable.

Nous n'avons pas détecté dans le surnageant de coculture les cytokines pro-inflammatoires IL1 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , ou IL12, ni la cytokine anti-inflammatoire IL10. Seule l'IL6, parmi ces quelques cytokines testées, est sécrétée dans notre modèle de coculture. Elle figure parmi les médiateurs impliqués dans le développement des lésions d'athérosclérose (Dubinski *et coll.*, 2007), entre autres dans la prolifération des HCSMC (Brasier *et coll.*, 2002; Ikeda *et coll.*, 1991).

## DISCUSSION

L'athérosclérose, considérée comme une maladie inflammatoire, est caractérisée par une infiltration et une activation des leucocytes dans la paroi artérielle, situation se traduisant, entre autres, par l'établissement d'un stress oxydatif. L'interaction des leucocytes avec les composants de la paroi artérielle, entraîne une activation des métalloprotéinases matricielles impliquées dans le développement et la rupture de la plaque d'athérome.

*La discussion s'articule autour de 4 thèmes :*

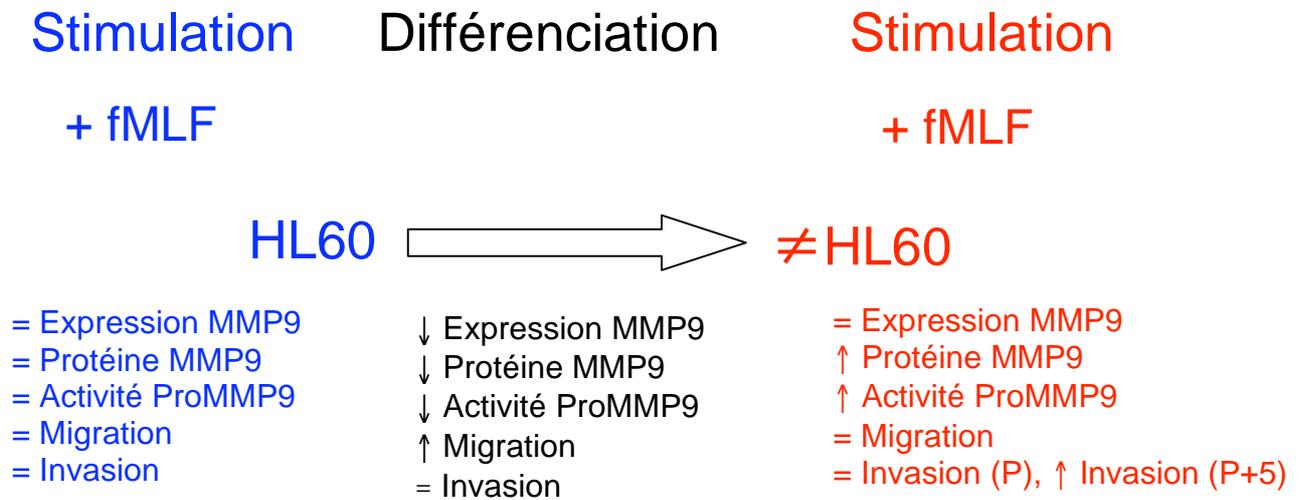
- I l'étude des capacités sécrétoires et migratoires d'un modèle de neutrophiles,*
- II les effets d'un stress oxydatif et les effets d'interactions entre un modèle de neutrophiles et des cellules vasculaires de coronaires humaines sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 de ces cellules,*
- III le rôle des cellules musculaires lisses de coronaires humaines et des espèces réactives de l'oxygène sur la mobilité d'un modèle de neutrophiles,*
- IV l'identification de certains médiateurs exprimés par les cellules musculaires lisses, sécrétés en coculture et impliqués dans les interactions avec un modèle de neutrophiles.*

## **I Etude des capacités sécrétoires et migratoires d'un modèle de neutrophiles**

Dans la première partie de ce travail, nous avons déterminé certaines caractéristiques sécrétoires et migratoires de la lignée promyélocytaire HL60 en présence ou non d'un agent de différenciation. Les HL60 sont des cellules cancéreuses issues d'un patient atteint d'une leucémie aiguë promyélocytaire. Elles sont caractérisées par des mutations sur les oncogènes c-myc, N-Ras et p53 entraînant une prolifération rapide et continue en culture. La maturation de la lignée HL60 permet l'acquisition de certaines propriétés morphologiques et fonctionnelles du polynucléaire neutrophile (PN) (Collins, 1987). Le DMSO a été utilisé comme agent de différenciation; il permet une meilleure réponse oxydative de notre modèle de neutrophiles comparé par exemple à l'acide rétinoïque, un autre agent de maturation granulocytaire (Bréchar *et coll.*, 2006; Perussia *et coll.*, 1981). Toutefois, les #HL60 sont caractérisées par une absence de granules secondaires et tertiaires, et des différences qualitatives et quantitatives sont observées dans l'expression des gènes entre les #HL60 et les PN ( Newburger *et coll.*, 1979; Borregaard *et coll.*, 1997; Itoh *et coll.*, 1998). Ainsi, la maturation en un modèle de neutrophiles s'accompagne de l'expression constitutive de protéines soumises à régulation chez le PN. Le cytochrome b558, constituant de la NADPH oxydase situé dans des granules spécifiques chez le PN, est localisé de façon constitutive à la membrane des #HL60 (Newburger *et coll.*, 1984). Néanmoins, l'expression de CD11b, un marqueur de différenciation neutrophilique, augmente considérablement chez les #HL60. De plus, la stimulation par le peptide fMLF entraîne, outre l'activation de la NADPH oxydase et la production d'ERO, une augmentation de la sécrétion et de l'activité ProMMP9 ainsi qu'une stimulation

des capacités invasives, soit quelques arguments supplémentaires en faveur d'une différenciation des HL60 vers un modèle de neutrophiles (figure 21A). En culture, la production de MMP9 et la mobilité des #HL60 et des HL60 présentent d'importantes variations liées au passage cellulaire. De précédentes études ont montré une diminution de certaines fonctions comme la sécrétion de la  $\beta$ -glucuronidase ou la production d'ERO, pendant une longue période de culture (200 passages) (Hadjokas *et coll.*, 1992). Dans nos conditions expérimentales, la production d'ERO diminue rapidement (une vingtaine de passages après réception des cellules de l'ATCC). Ainsi, dans la fourchette limitée de passages disponibles, nous observons une augmentation de l'amplitude des réponses des HL60 et des #HL60 entre P et P+5 : les variations de sécrétion et de mobilité sont donc plus facilement identifiables au plus élevé des deux passages (figure 21B).

A



B

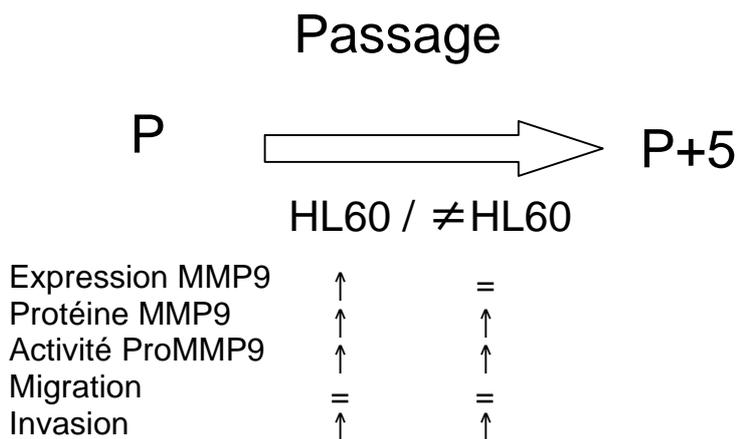


Figure 21. **A** Effet de la différenciation et de la stimulation par le fMLF sur l'expression, la sécrétion et l'activité de la ProMMP9 ainsi que sur la mobilité des HL60 et des ≠HL60. **B** Effet du passage cellulaire sur l'expression, la sécrétion et l'activité de la ProMMP9 ainsi que sur la mobilité des HL60 et des ≠HL60.

Ces variations fonctionnelles semblent accompagnées d'une modulation de l'expression de certains marqueurs de surface (CD11b, CD14, CD71),

illustrant une éventuelle différenciation spontanée des HL60 en culture. Toute nouvelle étude de fonction sur les HL60, et sans doute sur les lignées cellulaires en général, devrait donc débiter par une caractérisation de l'évolution de cette fonction au cours des passages cellulaires utilisés, afin d'éviter une éventuelle mauvaise interprétation des résultats.

*Les #HL60 au plus élevé des deux passages étudiés présentent une meilleure amplitude de réponse pour la sécrétion de MMP9 ainsi que pour l'invasion, et ont donc été utilisées à ce stade pour l'étude de l'activation et de l'infiltration leucocytaire.*

## **II Effets d'un stress oxydatif et effets d'interactions entre un modèle de neutrophiles et des cellules vasculaires de coronaires humaines sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9**

### **1 Effet des espèces réactives de l'oxygène sur l'activité MMP2 et MMP9 de cellules vasculaires**

Les protocoles de stress oxydatif (biochimique ou cellulaire) n'ont pas permis de modifier *in vitro* l'activité enzymatique MMP2 ou MMP9 de nos échantillons de cellules vasculaires de coronaires humaines (HCAEC et HCSCMC). *In vivo* cependant, l'infarctus du myocarde est accompagné de la production d'ERO (Mallat *et coll.*, 1998). *In vitro*, différentes études ont montré un effet des ERO sur la production de MMP9 ou de MMP2 par des cellules animales. Ainsi, l'addition d'ERO ou la stimulation de la production d'ERO sur différents types cellulaires, comme les cellules endothéliales de bovins, les cellules musculaires lisses ou les fibroblastes cardiaques de souris, entraînent une augmentation de l'expression de l'ARNm, de la sécrétion protéique ou de

l'activité enzymatique MMP2 et MMP9 (Grote *et coll.*, 2003; Inoue *et coll.*, 2001; Rajagopalan *et coll.*, 1996; Siwik *et coll.*, 2001).

*Nous pouvons en conclure que :*

- *soit la présence d'ERO, dans nos conditions expérimentales, n'a pas d'effet sur la sécrétion protéique ou l'activation enzymatique des MMP2 ou MMP9 par les cellules vasculaires de coronaires humaines,*
- *soit la production cellulaire d'ERO est insuffisante pour stimuler l'activité enzymatique des MMP2 ou MMP9 de nos échantillons de cellules vasculaires de coronaires humaines,*
- *soit la faible demi-vie des ERO limite l'efficacité des protocoles de stress oxydatif dans nos conditions de culture,*
- *soit les cellules vasculaires des explants de nos donneurs sont moins réactives que celles d'autres donneurs.*

## **2 Effet d'interactions entre #HL60 et cellules vasculaires de coronaires humaines sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9**

Des expériences de cocultures ont ensuite été réalisées afin de rendre possible un contact immédiat entre nos échantillons de cellules vasculaires et les ERO produites par les #HL60 activées. En ce qui concerne les cellules endothéliales, nous n'observons pas de modification de l'activité enzymatique ProMMP2, ni de l'activité enzymatique ProMMP9 lors d'une coculture HCAEC/#HL60. Au cours de l'athérosclérose, l'adhérence des leucocytes est suivie de leur migration et de la production de métalloprotéinases (Seely *et coll.*, 2003). Différentes études ont souligné l'importance du contact avec les

cellules endothéliales dans la production de MMP9 par les leucocytes. Ainsi, *in vitro*, l'adhérence des lymphocytes T aux cellules endothéliales entraîne une stimulation de l'expression de l'ARNm et de l'activité enzymatique de la MMP9 de façon dépendante de l'intégrine ICAM (Aoudjit *et coll.*, 1998). De même, l'inhibition de l'adhérence entre monocytes et cellules endothéliales diminue l'activité enzymatique MMP9 (Mostafa Mtairag *et coll.*, 2001). Nos résultats indiquent que la présence de HCAEC en coculture, séparées des #HL60 par une membrane poreuse, ne permet pas de modifier l'activité enzymatique MMP2 ou MMP9. Par contre, la coculture HCSMC/#HL60 entraîne une stimulation de la sécrétion de la protéine MMP9 et de l'activité enzymatique ProMMP9. Les HCSMC stimulent la sécrétion de la protéine MMP9 et l'activité enzymatique ProMMP9 des #HL60 par une voie qui ne requiert pas le contact cellulaire. De précédents travaux ont également montré l'existence d'interactions entre cellules musculaires et macrophages entraînant une augmentation de l'activité métalloprotéasique (Lee *et coll.*, 1995). La présence de HCSMC à proximité de PN pourrait ainsi participer à la stimulation de la production de MMP9 et au développement des lésions au cours de l'athérosclérose.

Il n'est pas clairement défini si les protéinases sécrétées par les PN recrutés conduisent à l'érosion et/ou à la rupture de la plaque, ou si ces cellules s'accumulent au foyer inflammatoire (Dollery *et coll.*, 1995; Dollery *et coll.*, 2003; Owen *et coll.*, 1999). Les PN ne sont généralement pas détectés dans les lésions d'athérosclérose de type stable, mais leur présence a néanmoins été montrée au cours de l'érosion ou de la rupture de plaques chez des patients présentant des syndromes coronariens aigus (Naruko *et coll.*, 2002).

La production de MMP9 par les PN, stimulés entre autres par la proximité des HCSCMC lors du remodelage de la plaque, pourrait ainsi contribuer à la fragilisation de la plaque athéromateuse.

*Lors de syndromes coronariens aigus, les cellules musculaires lisses de coronaires pourraient renforcer l'activation des PN en stimulant la production de MMP9, entraînant la fragilisation de la plaque athéromateuse et son éventuelle rupture.*

### **3 Effet modulateur des espèces réactives de l'oxygène sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9**

Le stress oxydatif est décrit comme une augmentation de la production d'ERO ou par une réduction de leur élimination (Azzi, 2007). Les organismes vivants ont développé des mécanismes de défense afin d'éliminer l'excès d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à l'origine d'un excès d'ERO. Ainsi, des enzymes antioxydantes comme la SOD et la catalase catalysent la conversion, respectivement, du O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (Esper *et coll.*, 2006). La surexpression d'enzymes antioxydantes, *in vitro*, permet de prévenir les effets délétères dus au stress oxydatif (Krall *et coll.*, 1988; Mele *et coll.*, 2006). Dans notre modèle de coculture, l'addition de SOD ou de catalase stimule l'expression de l'ARNm, la sécrétion de la protéine MMP9 ainsi que l'activité ProMMP9 des #HL60. *In vitro*, la SOD et la catalase inhibent l'expression de l'ARNm de la MMP2 induite par les ERO sur des fibroblastes (Zaw *et coll.*, 2006). L'utilisation d'un inhibiteur d'ERO, mimant les effets de la SOD et de la catalase, prévient l'effet stimulant des ERO sur l'activité enzymatique MMP2 et MMP9 des

fibroblastes cardiaques (Siwik *et coll.*, 2001). Ainsi, et de façon opposée aux résultats *in vitro* décrits dans la littérature, l'utilisation d'enzymes antioxydantes, dans nos conditions de culture, stimule l'activité enzymatique ProMMP9 de notre modèle de neutrophiles. Les #HL60 présentent des caractéristiques proches des neutrophiles matures. Or, *in vitro*, l'addition de catalase inhibe l'apoptose des PN (Rollet-Labelle *et coll.*, 1998). De même, la SOD et la catalase empêchent l'apoptose du PN induite par les interactions entre le monoxyde d'azote et les ERO (Oishi *et coll.*, 1997; Sulowska *et coll.*, 2005). Dans nos conditions de culture, l'addition de SOD et de catalase pourrait avoir un rôle protecteur sur notre modèle de neutrophiles en culture, se traduisant par une augmentation de la sécrétion de la protéine MMP9 et de l'activité enzymatique ProMMP9. De plus, les ERO pourraient intervenir dans la stimulation de la sécrétion de la protéine MMP9 et de l'activité enzymatique ProMMP9 induite sur notre modèle de neutrophiles par les HCSCMC. En effet, la sécrétion de la protéine MMP9 et l'activité enzymatique ProMMP9 induite sur notre modèle de neutrophiles par les HCSCMC semblent diminuées par l'addition d'enzymes antioxydantes, particulièrement en présence de fMLF. L'addition de N-acétylcystéine, dont le groupement thiol peut être oxydé et ainsi réduire la quantité d'ERO, diminue la sécrétion d'IL6 par des cellules endothéliales de veines humaines en condition d'hypoxie et la production d'IL8, induite par le  $TNF\alpha$ , de cellules endothéliales pulmonaires humaines (Ali *et coll.*, 1999; Hashimoto *et coll.*, 2001). Ainsi, les ERO présentes dans le milieu extracellulaire, et notamment le peroxyde d'hydrogène qui diffuse librement à travers les membranes, pourraient être impliqués dans la libération de médiateurs par les HCSCMC, entraînant la stimulation de la

sécrétion de la protéine et de l'activité enzymatique ProMMP9 de notre modèle de neutrophiles.

*In vivo*, la SOD extracellulaire (Ec-SOD) est fortement exprimée dans les lésions d'athérosclérose. Elle pourrait prévenir les effets délétères de l'anion superoxyde, mais aussi préserver l'activité du monoxyde d'azote en empêchant la formation de peroxynitrite (Luoma *et coll.*, 1998). La surexpression de Cu/Zn-SOD et de catalase permet de prévenir le développement des lésions d'athérosclérose chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE <sup>-/-</sup>) (Yang *et coll.*, 2004). Cependant, d'autres travaux chez la souris ont montré que la surexpression de Cu/Zn-SOD et de Mn-SOD augmentait les dommages cellulaires dus au stress oxydatif (Jaarsma *et coll.*, 2000; Raineri *et coll.*, 2001; Rando *et coll.*, 1998; Rando *et coll.*, 1999).

En résumé, la littérature montre que l'addition ou la surexpression d'enzymes antioxydantes adiminue les effets délétères du stress oxydatif *in vitro*, mais conduit à des résultats contrastés *in vivo*. Le contrôle de la concentration en enzymes antioxydantes semble être particulièrement important pour la préservation de l'intégrité cellulaire. Un déséquilibre dû à une accumulation trop importante d'enzymes pourrait être potentiellement dangereux pour les cellules *in vivo*.

*In vitro*, les enzymes antioxydantes pourraient avoir un rôle protecteur sur les  $\neq$ HL60, et semblent diminuer l'effet des HCSMC sur la stimulation de la sécrétion de la protéine MMP9 et de l'activité enzymatique ProMMP9 des  $\neq$ HL60. Ainsi les espèces réactives de l'oxygène, sans doute produites par les

*HL60 en coculture, pourraient stimuler les HCSMC, entraînant de la part de ces dernières une possible sécrétion de médiateurs conduisant à la stimulation de la production de MMP9 par notre modèle de neutrophiles.*

### **III Rôle des cellules musculaires lisses de coronaires humaines et des espèces réactives de l'oxygène sur la mobilité d'un modèle de neutrophiles**

Au cours de la réponse inflammatoire, l'adhérence des leucocytes est suivie de leur migration au travers des cellules endothéliales et dans l'intima. De nombreuses cytokines chémotactiques, appelés chémokines, sont produites par les cellules vasculaires et permettent de diriger cette migration (Hansson, 2001).

#### **1 Effet des cellules musculaires sur la mobilité de notre modèle de neutrophiles**

Les expériences de migration à travers une membrane poreuse montrent que la sécrétion de médiateurs par les HCSMC favorise la migration des HL60 en présence ou non de stimulus (fMLF). L'activation des cellules musculaires lisses par des composants du complément entraîne la sécrétion de médiateurs chémotactiques pour les monocytes (Torzewski *et coll.*, 1996). Dans nos conditions, la seule présence de HCSMC permet d'augmenter la migration des HL60. Lors du remodelage vasculaire, l'érosion superficielle de la plaque pourrait exposer les HCSMC aux éléments circulants favorisant l'activation et le recrutement des PN. D'autre part, la proximité des HCSMC lors de l'infiltration des PN pourrait stimuler l'invasion de ces derniers dans la

paroi artérielle. L'infiltration des leucocytes dans la paroi artérielle nécessite la pénétration dans l'espace sous-endothélial. Des expériences d'invasion, réalisées avec une matrice extracellulaire reconstituée, montrent un effet variable des HCSMC sur la mobilité de notre modèle de neutrophiles, en fonction des conditions. Ainsi, les HCSMC diminuent l'invasion en condition basale, mais potentialisent la réponse des  $\neq$ HL60 au peptide bactérien fMLF. *In vitro*, la présence de bactéries stimule la migration des PN au travers d'une couche de cellules endothéliales (Moreland *et coll.*, 2004), ainsi que la production de cytokines comme l'IL8 ou le  $\text{TNF}\alpha$  par les cellules épithéliales (Khair *et coll.*, 1996). *In vivo*, la présence de fMLF se traduit par la migration des PN à travers les cellules endothéliales (Feng *et coll.*, 1998; Hoshi *et coll.*, 2004). Dans notre modèle, la présence de fMLF pourrait s'accompagner de la production de cytokines inflammatoires par les HCSMC, entraînant la stimulation des capacités invasives des  $\neq$ HL60.

*L'exposition des cellules musculaires lisses à la circulation, lors du remodelage de la paroi vasculaire, pourrait contribuer au recrutement des PN dans l'intima, entraînant la fragilisation de la plaque et la survenue de syndromes coronariens aigus.*

## **2 Effet modulateur des espèces réactives de l'oxygène sur la mobilité de notre modèle de neutrophiles**

Les enzymes antioxydantes, SOD et catalase, ont été ajoutées afin de catalyser respectivement la conversion du  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . La SOD ou la catalase ne modifient pas les capacités invasives des  $\neq$ HL60.

L'addition de catalase diminue la simple migration des #HL60 à travers une membrane microporeuse, mais en présence de fMLF augmente cette migration. De précédentes études ont montré que la surexpression de la catalase ou l'addition de catalase diminuaient la migration cellulaire, suggérant un rôle du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans cette fonction (Harfouche *et coll.*, 2005; Kim *et coll.*, 2006; Nishio *et coll.*, 1997). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffuse librement à travers la membrane plasmique et peut jouer le rôle de second messenger dans la migration cellulaire (Sundaresan *et coll.*, 1995). Dans notre modèle cellulaire et à la concentration de catalase utilisée (25 U.mL<sup>-1</sup>), le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble cependant jouer un rôle limité sur la migration à travers une membrane poreuse et n'a pas d'effet sur les capacités invasives des #HL60.

*La stimulation de la mobilité de notre modèle de neutrophiles vers les HCSCMC semble donc s'effectuer de façon indépendante des ERO.*

#### **IV Identification de certains médiateurs exprimés par les cellules musculaires lisses et impliqués dans leurs interactions avec un modèle de neutrophiles**

##### **1 Analyse de certains gènes exprimés par les cellules musculaires en coculture**

Nos HCSCMC expriment une trentaine de gènes parmi les 84 gènes testés dans le domaine de l'inflammation. La comparaison de l'expression des gènes par les HCSCMC en coculture et seules en culture, ou l'étude de l'effet du fMLF en coculture, a permis de montrer des tendances à la hausse (TOLLIP) ou à la baisse (CXCL1, CXCL12) mais pas de différences significatives. Ainsi, le gène TOLLIP, dont la surexpression entraîne la diminution de l'activation du récepteur NF- $\kappa$ B (Burns *et coll.*, 2000), semble stimulé lors d'une coculture avec les  $\neq$ HL60 comparé à une culture de HCSCMC seules. Au cours de la réponse inflammatoire, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B joue un rôle très important dans la régulation de l'expression de cytokines proinflammatoires, de molécules d'adhérence, de chémokines ou de facteurs de croissance, par exemple. Le gène CXCL1, dont la protéine est une chémokine attractante pour les neutrophiles (Christopherson *et coll.*, 2001) ainsi que le gène CXCL12, impliqué dans le développement des lésions athérosclérotiques, semblent moins exprimés par les HCSCMC en coculture avec des  $\neq$ HL60 en présence de fMLF comparé respectivement, à une culture de HCSCMC seules ou à une coculture sans fMLF. Ces résultats suggèrent que la présence de  $\neq$ HL60, activées ou non par le fMLF, ne permet pas de stimuler l'expression, par les HCSCMC, de cytokines proinflammatoires identifiées dans le développement de maladies athéroscléroseuses.

Cependant, parmi les chémokines exprimées par les HCSCMC, signalons également l'interleukine 8 (IL8), l'interleukine 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), la chemokine ligand (MCP-1 ou CCL2) et la chemokine ligand 12 (SDF-1 ou CXCL12). La production locale de ces chémokines conduit en effet au recrutement et à l'activation leucocytaire dans la paroi artérielle, entraînant le développement des lésions d'athérosclérose (Braunersreuther *et coll.*, 2007). Dans notre modèle de coculture, l'IL8 est la chémokine la plus fortement exprimée par les HCSCMC, sa présence est liée au développement des lésions d'athérosclérose (Gerszten *et coll.*, 1998; Gerszten *et coll.*, 1999). L'IL8 constitue l'un des chémoattractants les mieux caractérisés des PN (Charo *et coll.*, 2004); elle est également impliquée dans la sécrétion de la protéine MMP9 par le PN (Chakrabarti *et coll.*, 2005). L'interleukine 1 $\beta$  est également exprimée par les HCSCMC, or elle est abondamment présente dans les lésions d'athérosclérose (Schonbeck *et coll.*, 2001). Elle stimule la sécrétion de la protéine MMP9 et le recrutement des neutrophiles au foyer inflammatoire (Keck *et coll.*, 2002; Miller *et coll.*, 2007).

*L'expression par nos cellules musculaires lisses de coronaires humaines de cytokines inflammatoires telles que l'IL8, l'IL6, et le MCP-1/CCL2 ou le SDF-1/CXCL12, impliquées dans la migration et l'activation des leucocytes au cours de l'athérosclérose, pourrait expliquer la stimulation de la production de MMP9 et de la mobilité de notre modèle de neutrophiles. Ces gènes ne sont cependant pas modulés par la présence en coculture de notre modèle de neutrophiles, stimulés ou non par le fMLF. Ces résultats suggèrent un rôle limité des espèces réactives de l'oxygène ou de médiateurs sécrétés par*

*notre modèle de neutrophiles, dans nos conditions, sur l'expression des gènes étudiés dans les cellules musculaires lisses.*

## **2 Analyse de certaines cytokines sécrétées en coculture**

Nous avons mesuré la concentration en IL8, IL1 $\beta$ , MCP-1/CCL2, et SDF1/CXCL12 dans une coculture  $\neq$ HL60/HCSMC et dans une culture de  $\neq$ HL60 et de HCSMC, en présence ou en absence de fMLF. Comme nous l'avons signalé précédemment, IL8 et IL1 $\beta$  sont des cytokines impliquées dans la production de MMP9 (Casale *et coll.*, 1999; Keck *et coll.*, 2002) et la mobilité du PN (Chakrabarti *et coll.*, 2005; Gouwy *et coll.*, 2004) alors que CCL2 et CXCL12 sont connues pour stimuler, entre autres, la migration des monocytes (Christopherson *et coll.*, 2001). Cependant, la présence de CXCL12 ou CCL2 potentialise l'effet stimulant de l'IL8 sur la migration du PN. En effet, la combinaison des cytokines IL8/CXCL12 ou IL8/CCL2 a un effet synergique sur la mobilité du PN à travers une membrane poreuse (Gouwy *et coll.*, 2004). Dans notre modèle de coculture, IL8 et CCL2 sont fortement sécrétées comparativement à IL1 $\beta$  et CXCL12, en présence ou en absence de fMLF.

*Les cytokines IL8 et CCL2 pourraient être impliquées dans la mobilité et la production de MMP9 de notre modèle de neutrophiles, induites par la présence des HCSMC.*

Afin de préciser l'effet de la coculture sur la concentration des cytokines testées, nous avons comparé les concentrations des cytokines en coculture (≠HL60/HCSMC) à celles mesurées dans une culture de ≠HL60 (≠HL60/0) et de HCSMC (0/HCSMC). Les expériences de coculture montrent une augmentation de la concentration en IL8 et CCL2 par comparaison aux concentrations mesurées dans une culture de ≠HL60 ou de HCSMC, en présence ou en absence de fMLF. Cependant, les concentrations d'IL8 et de CCL2 en coculture sont comparables à la somme des concentrations mesurées dans une culture de ≠HL60 et de HCSMC (≠HL60 + HCSMC). Ainsi, l'augmentation de concentration en IL8 et CCL2 en coculture serait due à un effet additif des sécrétions respectives par les ≠HL60 et HCSMC plutôt qu'à un effet synergique. Par ailleurs, nous pouvons souligner que le fMLF stimule la production d'IL8 par les ≠HL60 (≠HL60/0). Le fMLF n'a cependant pas d'effet sur la production d'IL8 par le PN, mais potentialise l'effet stimulant d'agonistes comme le LPS (Strieter *et coll.*, 1992).

Parmi les autres cytokines testées en coculture, dont certaines sont exprimées par les HCSMC, seule l'IL6 est sécrétée. L'IL6 est une cytokine abondamment produite par les monocytes et les cellules musculaires dans les lésions athérosclérotiques (Brasier *et coll.*, 2002). Elle est notamment impliquée dans la prolifération des cellules musculaires au cours du développement de l'athérosclérose (Ikeda *et coll.*, 1991). Des expériences de coculture ont montré une interaction paracrine impliquant l'IL6 et l'IL8 sécrétées respectivement par les cellules épithéliales et les cellules endothéliales humaines. Ces interactions conduisent à une augmentation de la sécrétion de ces cytokines ainsi qu'à une stimulation de la migration du PN

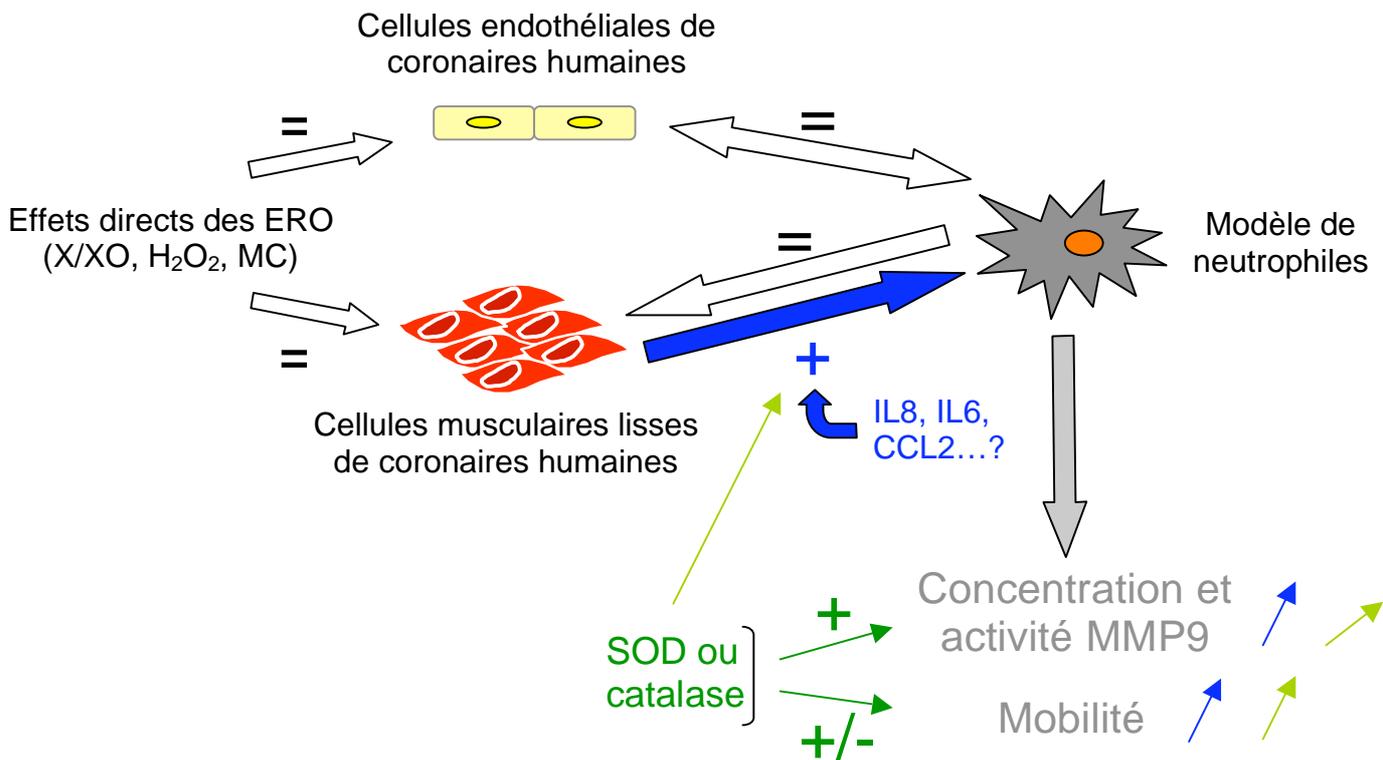
(Mul *et coll.*, 2000). Dans notre modèle de coculture la présence d'IL6 et d'IL8, sous l'effet des HCSMC, pourrait contribuer à stimuler la migration de notre modèle de neutrophiles, induite par les HCSMC.

*La présence concomitante d'IL8, d'IL6 et de CCL2 dans notre modèle de coculture pourrait illustrer un exemple de coopération de cytokines impliquées dans la mobilité et la production de MMP9 de notre modèle de neutrophiles, induites par les HCSMC.*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En résumé, notre travail a permis de montrer que :

- 1 les espèces réactives de l'oxygène ne modifient pas *in vitro*, dans nos conditions de culture, les activités enzymatiques des métalloprotéinases matricielles de cellules vasculaires endothéliales ou musculaires de coronaires humaines,
- 2 les cellules musculaires lisses de coronaires humaines stimulent la production de MMP9 et la mobilité des #HL60, notre modèle de neutrophiles,
- 3 la superoxyde dismutase et la catalase augmentent la production de MMP9 par les #HL60, semblent diminuer l'effet stimulant des HCSCMC, et ont peu d'effets sur la mobilité de notre modèle de neutrophiles vers les cellules musculaires lisses de coronaires humaines,
- 4 l'IL8, l'IL6 et le MCP-1/CCL2, impliqués dans le recrutement et l'activation leucocytaire au cours de l'athérosclérose, sont exprimés par les HCSCMC et/ou sécrétés dans notre modèle de coculture.



**Figure 22** : Effets des espèces réactives de l'oxygène (ERO; xanthine/xanthine oxydase (X/XO), peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et milieu conditionné (MC)) et effets d'interactions entre cellules vasculaires et un modèle de neutrophiles sur la sécrétion et l'activité de la MMP9 et sur la mobilité de ce modèle de neutrophiles.

L'infiltration leucocytaire et la production de MMP9 sont associées au développement et à la rupture de la plaque athéromateuse, initiant les événements cliniques de la maladie athéroscléreuse. Au niveau de la paroi athéromateuse, l'activité accrue des MMPs et l'infiltration leucocytaire apparaissent liées, entre autres, à l'action de médiateurs inflammatoires tels que IL8, IL6, MCP-1/CCL2, également sécrétés dans notre modèle de coculture #HL60/HCSMC. L'utilisation, par exemple, d'anticorps inhibiteurs du récepteur de l'IL8 (anti-CXCR2), de l'IL6 (anti-IL6R) ou de MCP-1/CCL2 (anti-CCR2) permettrait de mieux préciser les médiateurs mis en jeu dans la

réponse fonctionnelle de notre modèle de neutrophiles aux cellules musculaires lisses de coronaires humaines.

L'augmentation de l'activité matricielle semble être un événement clé de la rupture de plaque, qui conditionne l'expression clinique aiguë de la maladie (Beaudeau *et coll.*, 2004). Les plaques instables sont caractérisées par leur richesse en cellules inflammatoires activées, initiatrices, entre autres, de la production d'ERO.

L'utilisation de SOD ou de catalase comme agent thérapeutique connaît un succès mitigé (Lardot *et coll.*, 1996; Shaffer *et coll.*, 1987; Simonson *et coll.*, 1997; Thibeault *et coll.*, 1991). En effet, l'administration d'enzymes antioxydantes, par voie aérienne ou intramusculaire, ne permet pas d'empêcher les effets délétères du stress oxydatif dans certaines pathologies cardiovasculaires ou pulmonaires. Les principales limites d'utilisation *in vivo* de ces enzymes sont dues à leurs faibles perméabilité et demi-vie (Cuzzocrea *et coll.*, 2001).

De nombreuses études ont montré que les ERO intracellulaires pouvaient jouer le rôle de second messager (pour revue : Finkel, 2001), influençant les voies de transduction intracellulaires comme la voie des MAP kinases (Sugden *et coll.*, 2006) dans différents systèmes dont le système cardiovasculaire (Finkel, 1999). Cette concentration en ERO intracellulaires peut elle-même être modulée par des protéines ou des facteurs de transcription comme p66shc (Migliaccio *et coll.*, 1999), p53 (Sablina *et coll.*, 2005), FOXO3a (Kops *et coll.*, 2002) ou Nrf2-Keap1 (Zhang, 2006). De tels acteurs, impliqués dans la régulation des ERO intracellulaires semblent ainsi

constituer une cible importante pour le développement de nouvelles thérapies antioxydantes *in vivo*.

La coculture entre un modèle de neutrophiles et des cellules musculaires lisses de coronaires humaines pourrait illustrer *in vitro* un exemple de communication entre cellules immunitaires et cellules vasculaires lors de l'inflammation de la paroi vasculaire au cours de l'athérosclérose. Notre modèle de coculture  $\neq$ HL60/HCSMC permettrait ainsi d'évaluer *in vitro* l'impact de médiateurs sur certains aspects du développement du processus d'athérosclérose.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ali, M.H., et al., *Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 1): p. L1057-65.
2. Altieri, D.C. and T.S. Edgington, *A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1)*. J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2656-60.
3. Aoudjit, F., E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2967-73.
4. Aoyagi, M., et al., *Immunolocalization of matrix metalloproteinases in rabbit carotid arteries after balloon denudation*. Histochem Cell Biol, 1998. **109**(2): p. 97-102.
5. Azzi, A., *Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis?* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(2): p. 230-2.
6. Babior, B.M., J.T. Curnutte, and B.J. McMurrich, *The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst*. J Clin Invest, 1976. **58**(4): p. 989-96.
7. Babior, B.M., *The respiratory burst of phagocytes*. J Clin Invest, 1984. **73**(3): p. 599-601.
8. Baehner, R.L., *Neutrophil structure and function in hematology: Basic Principles and Practice*. . New York: Churchill-Livingstone, 2000. **38**: p. 667-669.
9. Bainton, D.F. and M.G. Farquhar, *Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes*. J Cell Biol, 1966. **28**(2): p. 277-301.
10. Baricos, W.H., et al., *Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 790-5.
11. Bashir, S., et al., *Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 1993. **52**(9): p. 659-66.
12. Bauters, C., et al., *Growth factors and endothelial dysfunction*. Drugs, 1999. **58 Spec No 1**: p. 11-5.
13. Beaudoux, J.L., et al., *Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(2): p. 121-131.
14. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
15. Belaaouaj, A., et al., *Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis*. Nat Med, 1998. **4**(5): p. 615-8.

16. Bendeck, M.P., et al., *Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat*. *Circ Res*, 1994. **75**(3): p. 539-45.
17. Betsuyaku, T., et al., *Gelatinase B deficiency does not protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury*. *Chest*, 1999. **116**(1 Suppl): p. 17S-18S.
18. Biasucci, L.M., et al., *Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia*. *J Am Coll Cardiol*, 1996. **27**(3): p. 611-6.
19. Blais, V. and S. Rivest, *[Role of the innate immune response in the brain]*. *Med Sci (Paris)*, 2003. **19**(10): p. 981-7.
20. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. *Circulation*, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
21. Bonfanti, R., et al., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. *Blood*, 1989. **73**(5): p. 1109-12.
22. Borregaard, N., et al., *Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation*. *J Cell Biol*, 1983. **97**(1): p. 52-61.
23. Borregaard, N., et al., *Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(2): p. 408-16.
24. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. *Blood*, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
25. Brasier, A.R., A. Recinos, 3rd, and M.S. Eledrisi, *Vascular inflammation and the renin-angiotensin system*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(8): p. 1257-66.
26. Braunersreuther, V., F. Mach, and S. Steffens, *The specific role of chemokines in atherosclerosis*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(5): p. 714-21.
27. Brechard, S., et al., *Modulation by cADPr of Ca<sup>2+</sup> mobilization and oxidative response in dimethylsulfoxide- or retinoic acid-differentiated HL-60 cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(1): p. 129-36.
28. Bretz, U. and M. Baggiolini, *Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes*. *J Cell Biol*, 1974. **63**(1): p. 251-69.
29. Brown, D.L., et al., *Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina*. *Circulation*, 1995. **91**(8): p. 2125-31.
30. Burke, A.P., et al., *Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(3): p. 297-303.
31. Burns, K., et al., *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(6): p. 346-51.
32. Caligiuri, G., *[Role of the immune response in atherosclerosis and acute coronary syndromes]*. *Med Sci (Paris)*, 2004. **20**(2): p. 175-81.
33. Capron, L., *Inflammatory mechanisms of atherosclerosis: pathogenic and etiologic inferences*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1993. **86**(1): p. 19-30.

34. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
35. Carrell, T.W., et al., *Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms*. Circulation, 2002. **105**(4): p. 477-82.
36. Casale, T.B. and E.J. Carolan, *Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium*. Inflamm Res, 1999. **48**(1): p. 22-7.
37. Chakrabarti, S. and K.D. Patel, *Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 279-88.
38. Chanock, S.J., et al., *The respiratory burst oxidase*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24519-22.
39. Charo, I.F. and M.B. Taubman, *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease*. Circ Res, 2004. **95**(9): p. 858-66.
40. Christopherson, K., 2nd and R. Hromas, *Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 388-96.
41. Collins, S.J., *The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression*. Blood, 1987. **70**(5): p. 1233-44.
42. Creemers, E.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?* Circ Res, 2001. **89**(3): p. 201-10.
43. Crisby, M., et al., *Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization*. Circulation, 2001. **103**(7): p. 926-33.
44. Cuzzocrea, S., et al., *Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 135-59.
45. Davenpeck, K.L., S.A. Sterbinsky, and B.S. Bochner, *Rat neutrophils express alpha4 and beta1 integrins and bind to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)*. Blood, 1998. **91**(7): p. 2341-6.
46. Davies, M.J. and A.C. Thomas, *Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina*. Br Heart J, 1985. **53**(4): p. 363-73.
47. Delclaux, C., et al., *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **14**(3): p. 288-95.
48. Denoyelle, C., et al., *Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study*. Carcinogenesis, 2001. **22**(8): p. 1139-48.
49. Diebold, B.A. and G.M. Bokoch, *Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 211-5.
50. Dollery, C.M., J.R. McEwan, and A.M. Henney, *Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease*. Circ Res, 1995. **77**(5): p. 863-8.

51. Dollery, C.M., et al., *Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages*. *Circulation*, 2003. **107**(22): p. 2829-36.
52. Dubinski, A. and Z. Zdrojewicz, *[The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis]*. *Pol Merkur Lekarski*, 2007. **22**(130): p. 291-4.
53. el Benna, J., J.M. Ruedi, and B.M. Babior, *Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6729-34.
54. English, W.R., et al., *Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(19): p. 14046-55.
55. Entman, M.L., et al., *Inflammation in the course of early myocardial ischemia*. *Faseb J*, 1991. **5**(11): p. 2529-37.
56. Esper, R.J., et al., *Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal*. *Cardiovasc Diabetol*, 2006. **5**: p. 4.
57. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. *J. Exp. Med.*, 1998. **187**(6): p. 903-915.
58. Finegold, A.A., et al., *Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(49): p. 31021-4.
59. Finkel, T., *Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(3): p. 337-40.
60. Finkel, T., *Reactive oxygen species and signal transduction*. *IUBMB Life*, 2001. **52**(1-2): p. 3-6.
61. Forman, H.J., M. Torres, and J. Fukuto, *Redox signaling*. *Mol Cell Biochem*, 2002. **234-235**(1-2): p. 49-62.
62. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
63. Galis, Z.S., et al., *Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **748**: p. 501-7.
64. Galis, Z.S., et al., *Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(2): p. 402-6.
65. Galis, Z.S., G.K. Sukhova, and P. Libby, *Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue*. *Faseb J*, 1995. **9**(10): p. 974-80.
66. Gallin, J.I. and B.E. Seligmann, *Mobilization and adaptation of human neutrophil chemoattractant fMet-Leu-Phe receptors*. *Fed Proc*, 1984. **43**(12): p. 2732-6.
67. Ganne, F., et al., *Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits urokinase/urokinase-receptor expression and MMP-9 secretion*

- by peripheral blood monocytes--a possible protective mechanism against atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2000. **84**(4): p. 680-8.
68. Garcia, R., et al., *Elastase is the only human neutrophil granule protein that alone is responsible for in vitro killing of Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 1998. **66**(4): p. 1408-12.
  69. George, S.J., A.B. Zaltsman, and A.C. Newby, *Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein*. *Cardiovasc Res*, 1997. **33**(2): p. 447-59.
  70. Gerszten, R.E., et al., *Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells: implications for atherogenesis*. *Circ Res*, 1998. **82**(8): p. 871-8.
  71. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
  72. Godin, D., et al., *Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model*. *Circulation*, 2000. **102**(23): p. 2861-6.
  73. Gorzalczyk, Y., et al., *A prenylated p67phox-Rac1 chimera elicits NADPH-dependent superoxide production by phagocyte membranes in the absence of an activator and of p47phox: conversion of a pagan NADPH oxidase to monotheism*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18605-10.
  74. Gougerot-Pocidallo, M.A., et al., *[Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]*. *J Soc Biol*, 2002. **196**(1): p. 37-46.
  75. Gouwy, M., et al., *Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(1): p. 185-94.
  76. Gown, A.M., T. Tsukada, and R. Ross, *Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions*. *Am J Pathol*, 1986. **125**(1): p. 191-207.
  77. Grayson, M.H., et al., *alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)*. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2187-91.
  78. Grote, K., et al., *Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species*. *Circ Res*, 2003. **92**(11): p. e80-6.
  79. Gurjar, M.V., et al., *Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(6): p. H2568-74.
  80. Hadjokas, N., C. Bayer, and C.P. Nielson, *Impaired stimulus-response coupling in association with increased growth rate of HL60 cells*. *J Leukoc Biol*, 1992. **52**(2): p. 157-60.
  81. Hajizadeh, S., et al., *Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2003. **5**(5): p. R234-40.
  82. Hakim, J., *[Reactive oxygen species and inflammation]*. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1993. **187**(3): p. 286-95.

83. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
84. Hanlon, W.A., et al., *rTNF alpha facilitates human polymorphonuclear leukocyte adherence to fibrinogen matrices with mobilization of specific and tertiary but not azurophilic granule markers*. J Leukoc Biol, 1991. **50**(1): p. 43-8.
85. Hansson, G.K., *Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **947**: p. 157-65; discussion 165-6.
86. Harfouche, R., et al., *Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling*. Faseb J, 2005. **19**(12): p. 1728-30.
87. Hashimoto, S., et al., *N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced p38 MAP kinase activation and p38 MAP kinase-mediated IL-8 production by human pulmonary vascular endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(1): p. 270-6.
88. Hitchon, C.A. and H.S. El-Gabalawy, *Oxidation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(6): p. 265-78.
89. Hogg, N., et al., *Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide*. Biochem J, 1992. **281** ( Pt 2): p. 419-24.
90. Hoshi, O. and T. Ushiki, *Neutrophil extravasation in rat mesenteric venules induced by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucylphenylalanine (fMLP), with special attention to a barrier function of the vascular basal lamina for neutrophil migration*. Arch Histol Cytol, 2004. **67**(1): p. 107-14.
91. Hsu-Lin, S., et al., *A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets*. J Biol Chem, 1984. **259**(14): p. 9121-6.
92. Huang, J., N.D. Hitt, and M.E. Kleinberg, *Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558*. Biochemistry, 1995. **34**(51): p. 16753-7.
93. Huber, A.R. and S.J. Weiss, *Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an in vitro construct of a blood vessel wall*. J Clin Invest, 1989. **83**(4): p. 1122-36.
94. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
95. Ikeda, U., et al., *Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner*. Am J Physiol, 1991. **260**(5 Pt 2): p. H1713-7.
96. Inoue, N., et al., *Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells*. Atherosclerosis, 2001. **155**(1): p. 45-52.
97. Itoh, K., et al., *Expression profile of active genes in granulocytes*. Blood, 1998. **92**(4): p. 1432-41.
98. Jaarsma, D., et al., *Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates*

- motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(6 Pt B): p. 623-43.
99. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(2): p. 131-8.
  100. Kai, H., et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(2): p. 368-72.
  101. Karnovsky, M.L., *Metabolic basis of phagocytic activity*. Physiol Rev, 1962. **42**: p. 143-68.
  102. Keck, T., et al., *Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 188-201.
  103. Khair, O.A., R.J. Davies, and J.L. Devalia, *Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells*. Eur. Respir. J., 1996. **9**(9): p. 1913-1922.
  104. Khwaja, A., et al., *Dynamic modulation of the cell surface expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor*. Br J Haematol, 1993. **85**(1): p. 42-9.
  105. Kim, W.H., et al., *Histopathologic analysis of in-stent neointimal regression in a porcine coronary model*. Coron Artery Dis, 2000. **11**(3): p. 273-7.
  106. Kim, Y.M., et al., *Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6167-74.
  107. Klein, C.L., et al., *Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells*. Pathobiology, 1995. **63**(4): p. 204-12.
  108. Kops, G.J., et al., *Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 316-21.
  109. Koshikawa, N., et al., *Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5*. J Cell Biol, 2000. **148**(3): p. 615-24.
  110. Krall, J., et al., *Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mammalian cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(4): p. 1910-4.
  111. Kranzhofer, A., et al., *Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 during neointima formation in organ cultures of human saphenous vein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(2): p. 255-65.
  112. Kunsch, C. and R.M. Medford, *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 753-66.
  113. Lapouge, K., et al., *Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10121-8.
  114. Lardot, C., et al., *Exogenous catalase may potentiate oxidant-mediated lung injury in the female Sprague-Dawley rat*. J Toxicol Environ Health, 1996. **47**(6): p. 509-22.
  115. Lee, E., et al., *Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1995. **15**(12): p. 2284-2289.

116. Lee, E., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1996. **78**(1): p. 44-9.
117. Lee, R.T., et al., *Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(17): p. 13847-51.
118. Li, Z., et al., *Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(1): p. 121-8.
119. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
120. Lieschke, G.J. and A.W. Burgess, *Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1)*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(1): p. 28-35.
121. Liotta, L.A., W.G. Stetler-Stevenson, and P.S. Steeg, *Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements*. *Cancer Invest*, 1991. **9**(5): p. 543-51.
122. Luoma, J.S., et al., *Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(2): p. 157-67.
123. Lusciuskas, F.W. and J. Lawler, *Integrins as dynamic regulators of vascular function*. *Faseb J*, 1994. **8**(12): p. 929-38.
124. Mackarel, A.J., et al., *Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(6): p. 1209-19.
125. Madjid, M., et al., *Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(10): p. 1945-56.
126. Malik, A.B. and S.K. Lo, *Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation*. *Pharmacol Rev*, 1996. **48**(2): p. 213-29.
127. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure*. *Circulation*, 1998. **97**(16): p. 1536-9.
128. Mallat, Z. and A. Tedgui, *[Apoptosis and acute coronary syndromes]*. *Med Sci (Paris)*, 2004. **20**(3): p. 298-303.
129. Marklund, S.L., *Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(24): p. 7634-8.
130. Mason, D.P., et al., *Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery*. *Circ Res*, 1999. **85**(12): p. 1179-85.
131. Matsuba, K.T., et al., *Apoptosis in circulating PMN: increased susceptibility in L-selectin-deficient PMN*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2852-8.
132. McCord, J.M. and I. Fridovich, *The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction*

- of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen.* J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6056-63.
133. McFarlane, S.I., et al., *Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1451-8.
134. Mehta, J., et al., *Neutrophil function in ischemic heart disease.* Circulation, 1989. **79**(3): p. 549-56.
135. Mele, J., et al., *Characterization of transgenic mice that overexpress both copper zinc superoxide dismutase and catalase.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(3-4): p. 628-38.
136. Migliaccio, E., et al., *The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals.* Nature, 1999. **402**(6759): p. 309-13.
137. Miller, L.S., et al., *Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo.* J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6933-42.
138. Moreland, J.G., et al., *Organism-specific neutrophil-endothelial cell interactions in response to Escherichia coli, Streptococcus pneumoniae, and Staphylococcus aureus.* J. Immunol., 2004. **172**(1): p. 426-432.
139. Mostafa Mtairag, E., et al., *Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion.* Cardiovasc Res, 2001. **49**(4): p. 882-90.
140. Mugge, A., et al., *Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity.* Am J Physiol, 1991. **260**(2 Pt 1): p. C219-25.
141. Mul, F.P., et al., *Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells.* J Leukoc Biol, 2000. **68**(4): p. 529-37.
142. Nalbone, G., et al., *Statins: maid-of-all-work in cardiovascular diseases!* Arch Mal Coeur Vaiss, 2003. **96**(3): p. 207-13.
143. Naruko, T., et al., *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes.* Circulation, 2002. **106**(23): p. 2894-900.
144. Newburger, P.E., et al., *Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation.* J Cell Biol, 1979. **82**(2): p. 315-22.
145. Newburger, P.E., et al., *Development of the superoxide-generating system during differentiation of the HL-60 human promyelocytic leukemia cell line.* J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3771-6.
146. Newby, A.C., *Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture.* Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 1-31.
147. Nicoletti, A., et al., *The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation.* Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 512-21.
148. Nishio, E. and Y. Watanabe, *The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration.* Br J Pharmacol, 1997. **121**(4): p. 665-70.

149. Noji, Y., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis*. Clin Chem Lab Med, 2001. **39**(5): p. 380-4.
150. O'Brien, E.R., et al., *Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 883-94.
151. Oak, M.H., et al., *Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1861-7.
152. Oishi, K. and K. Machida, *Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidants in culture medium*. Scand. J. Immunol., 1997. **45**(1): p. 21-27.
153. Omary, M.B., I.S. Trowbridge, and J. Minowada, *Human cell-surface glycoprotein with unusual properties*. Nature, 1980. **286**(5776): p. 888-91.
154. Oorni, K., et al., *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions*. J Lipid Res, 2000. **41**(11): p. 1703-14.
155. Oury, T.D., B.J. Day, and J.D. Crapo, *Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(7): p. 957-65.
156. Owen, C.A. and E.J. Campbell, *The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(2): p. 137-50.
157. Pendas, A.M., et al., *Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(12): p. 5304-13.
158. Perona, R., et al., *Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins*. Genes Dev, 1997. **11**(4): p. 463-75.
159. Perussia, B., et al., *Terminal differentiation surface antigens of myelomonocytic cells are expressed in human promyelocytic leukemia cells (HL60) treated with chemical inducers*. Blood, 1981. **58**(4): p. 836-43.
160. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Statins for the prevention of vein graft stenosis: a role for inhibition of matrix metalloproteinase-9*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(2): p. 120-6.
161. Quinn, M.T., M.L. Mullen, and A.J. Jesaitis, *Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7303-9.
162. Raineri, I., et al., *Strain-dependent high-level expression of a transgene for manganese superoxide dismutase is associated with growth retardation and decreased fertility*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(8): p. 1018-30.
163. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability*. J Clin Invest, 1996. **98**(11): p. 2572-9.
164. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix*

- metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability.* J. Clin. Invest., 1996. **98**(11): p. 2572-2579.
165. Rando, T.A., et al., *Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase: a novel cause of murine muscular dystrophy.* Ann Neurol, 1998. **44**(3): p. 381-6.
  166. Rando, T.A. and C.J. Epstein, *Copper/zinc superoxide dismutase: more is not necessarily better!* Ann Neurol, 1999. **46**(1): p. 135-6.
  167. Reinhardt, D., et al., *Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP.* Heart, 2002. **88**(5): p. 525-30.
  168. Rekhter, M.D. and D. Gordon, *Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques.* Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 668-77.
  169. Ries, C., H. Kolb, and P.E. Petrides, *Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: tumor necrosis factor-alpha as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion.* Blood, 1994. **83**(12): p. 3638-46.
  170. Robbins, J.R., et al., *Diminished matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in ectomesenchyme-derived tissues of the Patch mutant mouse: regulation of MMP-2 by PDGF and effects on mesenchymal cell migration.* Dev Biol, 1999. **212**(2): p. 255-63.
  171. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 180-6.
  172. Rollet-Labelle, E., et al., *Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis.* Free. Radic. Biol. Med., 1998. **24**(4): p. 563-572.
  173. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts).* N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
  174. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts).* N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.
  175. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
  176. Ryan, G.B. and J.V. Hurley, *The chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes towards damaged tissue.* Br J Exp Pathol, 1966. **47**(5): p. 530-6.
  177. Sablina, A.A., et al., *The antioxidant function of the p53 tumor suppressor.* Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1306-13.
  178. Saran, M., C. Michel, and W. Bors, *Reaction of NO with O<sub>2</sub>-. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF).* Free Radic Res Commun, 1990. **10**(4-5): p. 221-6.
  179. Sato, H., et al., *A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells.* Nature, 1994. **370**(6484): p. 61-5.
  180. Scholz, D., et al., *Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture.* Cell Tissue Res, 1996. **284**(3): p. 415-23.
  181. Schonbeck, U. and P. Libby, *CD40 signaling and plaque instability.* Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1092-103.

182. Seely, A.J., J.L. Pascual, and N.V. Christou, *Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance*. Crit Care, 2003. **7**(4): p. 291-307.
183. Segal, A.W., et al., *Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease*. Lancet, 1978. **2**(8087): p. 446-9.
184. Sengelov, H., M.H. Nielsen, and N. Borregaard, *Separation of human neutrophil plasma membrane from intracellular vesicles containing alkaline phosphatase and NADPH oxidase activity by free flow electrophoresis*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14912-7.
185. Shaffer, S.G., D.H. O'Neill, and D.W. Thibeault, *Administration of bovine superoxide dismutase fails to prevent chronic pulmonary sequelae of neonatal oxygen exposure in the rat*. J Pediatr, 1987. **110**(6): p. 942-6.
186. Shuto, T., et al., *Increased responsiveness to TLR2 and TLR4 ligands during dimethylsulfoxide-induced neutrophil-like differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells*. Leuk Res, 2007.
187. Simonson, S.G., et al., *Aerosolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates. I. Physiology and biochemistry*. J Appl Physiol, 1997. **83**(2): p. 550-8.
188. Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(1): p. C53-60.
189. Southgate, K.M., et al., *Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries*. Circ Res, 1996. **79**(6): p. 1177-87.
190. Spicer, S.S. and J.H. Hardin, *Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. A review*. Lab Invest, 1969. **20**(5): p. 488-97.
191. Starcher, B. and B. Peterson, *The kinetics of elastolysis: elastin catabolism during experimentally induced fibrosis*. Exp Lung Res, 1999. **25**(5): p. 407-24.
192. Stemme, S., et al., *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3893-7.
193. Stralin, P., et al., *The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 2032-6.
194. Strieter, R.M., et al., *Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8*. Am J Pathol, 1992. **141**(2): p. 397-407.
195. Strongin, A.Y., et al., *Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2*. J Biol Chem, 1993. **268**(19): p. 14033-9.
196. Studzinski, G.P., A.K. Bhandal, and Z.S. Brelvi, *A system for monocytic differentiation of leukemic cells HL 60 by a short exposure to 1,25-dihydroxycholecalciferol*. Proc Soc Exp Biol Med, 1985. **179**(3): p. 288-95.
197. Studzinski, G.P., et al., *Transition to tetraploidy in 1,25-dihydroxyvitamin D3-resistant HL60 cells is preceded by reduced*

- growth factor dependence and constitutive up-regulation of Sp1 and AP-1 transcription factors.* Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5513-21.
198. Sugden, P.H. and A. Clerk, *Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 2111-24.
  199. Sulowska, Z., et al., *Flow cytometric evaluation of human neutrophil apoptosis during nitric oxide generation in vitro: the role of exogenous antioxidants.* Mediators Inflamm, 2005. **2005**(2): p. 81-7.
  200. Sundaresan, M., et al., *Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction.* Science, 1995. **270**(5234): p. 296-299.
  201. Sutherland, R., et al., *Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4515-9.
  202. Tanaka, H., et al., *Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury.* Circulation, 1993. **88**(4 Pt 1): p. 1788-803.
  203. Tedder, T.F., et al., *The selectins: vascular adhesion molecules.* Faseb J, 1995. **9**(10): p. 866-73.
  204. Thibeault, D.W., et al., *Prevention of chronic pulmonary oxygen toxicity in young rats with liposome-encapsulated catalase administered intratracheally.* Pediatr Pulmonol, 1991. **11**(4): p. 318-27.
  205. Tidow, N. and K. Welte, *Advances in understanding postreceptor signaling in response to granulocyte colony-stimulating factor.* Curr Opin Hematol, 1997. **4**(3): p. 171-5.
  206. Tkalcevic, J., et al., *Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G.* Immunity, 2000. **12**(2): p. 201-10.
  207. Todd, R.F., 3rd, et al., *Subcellular localization of the large subunit of Mo1 (Mo1 alpha; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion.* J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1280-90.
  208. Torzewski, J., et al., *Complement-induced release of monocyte chemotactic protein-1 from human smooth muscle cells. A possible initiating event in atherosclerotic lesion formation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(5): p. 673-7.
  209. Uglow, E.B., et al., *Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation.* Circ Res, 2003. **92**(12): p. 1314-21.
  210. Valentin, F., et al., *Rac-1-mediated O<sub>2</sub>- secretion requires Ca<sup>2+</sup> influx in neutrophil-like HL-60 cells.* Cell Calcium, 2001. **29**(6): p. 409-415.
  211. Van der Vieren, M., et al., *The leukocyte integrin alpha D beta 2 binds VCAM-1: evidence for a binding interface between I domain and VCAM-1.* J Immunol, 1999. **163**(4): p. 1984-90.
  212. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
  213. Varki, A., *Selectin ligands: will the real ones please stand up?* J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S31-5.

214. Vincent, L., et al., *Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect.* FEBS Lett, 2001. **495**(3): p. 159-66.
215. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
216. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.* Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
217. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature.* Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 349-74.
218. Wang, M., et al., *Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats.* Am J Pathol, 2005. **167**(5): p. 1429-42.
219. West, N.E., et al., *Nitric oxide synthase (nNOS) gene transfer modifies venous bypass graft remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production.* Circulation, 2001. **104**(13): p. 1526-32.
220. Wilhelm, S.M., et al., *SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages.* J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17213-21.
221. Wright, D.G. and J.I. Gallin, *Secretory responses of human neutrophils: exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence in vitro and during exudation in vivo.* J Immunol, 1979. **123**(1): p. 285-94.
222. Yang, H., et al., *Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E.* Circ. Res., 2004. **95**(11): p. 1075-1081.
223. Yang, J., et al., *Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration.* J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1769-82.
224. Yu, L., et al., *Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7993-8.
225. Zachariae, C.O., *Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8.* Acta Derm Venereol Suppl (Stockh), 1993. **181**: p. 1-37.
226. Zaw, K.K., et al., *Catalase restores the altered mRNA expression of collagen and matrix metalloproteinases by dermal fibroblasts exposed to reactive oxygen species.* Eur J Dermatol, 2006. **16**(4): p. 375-9.
227. Zempo, N., et al., *Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery.* J Vasc Surg, 1994. **20**(2): p. 209-17.
228. Zhang, D.D., *Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway.* Drug Metab Rev, 2006. **38**(4): p. 769-89.

229. Zimmerman, G.A., S.M. Prescott, and T.M. McIntyre, *Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules*. Immunol Today, 1992. **13**(3): p. 93-100.



Yohann BERNARD

## Liste des travaux

### ***Publications***

Bernard Y, Melchior C, Tschirhart E, Bueb J-L. *Co-cultures of human coronary smooth muscle cells and dimethylsulfoxide-differentiated HL60 cells upregulate ProMMP9 activity and promote mobility - Modulation by reactive oxygen species.* Inflammation, 2008. **31**(5): p. 287-298.

Bernard Y, Plançon S, Melchior C, Tschirhart E, Bueb J-L. *Cell passaging rapidly affects expression, secretion and activity of MMP9 as well as mobility of HL60 leukemia cells.*

Journal of Animal and Cell Biology, 2008. **2**(9): p. 160-165.

### ***Communications orales***

Bernard Y, C Melchior, E Tschirhart, Bueb J-L. *Co-cultures of human coronary smooth muscle cells and dimethyl-sulfoxide-differentiated HL60 cells upregulate ProMMP9 activity and promote mobility – modulation by reactive oxygen species.* 22èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Caen (F), 2008.

Bernard Y, J-L Bueb, Tschirhart E. *HL60, stress oxydant et activation des MMP-2 et MMP-9 par des cellules musculaires lisses de coronaires humaines.* Club oxydase, Grenoble (F), 2005.

Bernard Y, J-L Bueb, Wagner D, Tschirhart E. *Impact of oxidative stress on MMP-2 and MMP-9 activation in human coronary artery smooth muscle cells.* 8ème Réunion de la Société Française de Pharmacologie, Strasbourg (F). *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 18(2): 216, 2004.

### ***Communications par affiches***

Bernard Y, C Melchior, E Tschirhart, Bueb J-L. Co-cultures of human coronary smooth muscle cells and dimethyl-sulfoxide-differentiated HL60 cells upregulate ProMMP9 activity and promote mobility – modulation by reactive oxygen species. 22èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Caen (F), 2008.

Hemmer M, Bambi S-M, de Tullio P, Bernard Y, Konradowski E, Frankenne F, Bueb J-L, Tschirhart E, Pirotte B, Conception, synthèse et évaluation biologique de composés coumariniques en tant qu'agents anti-cancéreux potentiels. 21èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Namur (B), 2007.

Bernard Y, Bueb J-L, Tschirhart E. Modification of matrix metalloproteinase 9 activity during interactions between human coronary smooth muscle cells and neutrophil-like dimethylsulfoxide differentiated HL60 cells. Eurobiologie 10ème Colloque de Biologie Prospective, Nancy (F), 2006.

Hemmer M, Plançon S, Bernard Y, Bueb J-L, Tschirhart E, Pirotte E. Conception, synthèse et évaluation biologique de composés coumariniques en tant qu'agents anticancéreux et anti-angiogéniques potentiels. 20èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Lille (F), 2006.

### ***Activités d'enseignement***

90 heures d'enseignement par an, du 15/01/05 au 15/01/08, comme  
Assistant de Travaux Pratiques et Dirigés en :

- Biologie cellulaire
- Biochimie,

dans les sections

- Médecine,
- Pharmacie,
- Biologie.



**UMR 7175 – LC1**

Directeur : Claude KEDINGER  
Dir. Adjoint : Luc LEBEAU

Département  
Pharmacologie et Physico-  
Chimie  
des Interactions Cellulaires  
et Moléculaires

Directeur : Kenneth TAKEDA

Université Henri Poincaré  
Faculté de Pharmacie  
A l'attention de Mme Christelle VOIGNIER  
5, Rue Albert Lebrun  
Nancy 1  
54001 Nancy Cedex

**Objet :** Rapport de la thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré – Nancy I –  
Mention Pharmacologie de Monsieur Yohann Bernard

La thèse présentée par Monsieur Yohann Bernard est un travail réalisé au sein du Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée de l'Université du Luxembourg, sous la direction du Professeur Jean-Luc Bueb.

Jean-Pierre GIES  
Professeur

Monsieur Bernard s'est intéressé à l'aspect inflammatoire du développement de l'athérosclérose. Il a étudié tout particulièrement le stress oxydatif, l'inflammation et les métalloprotéinases impliqués dans des interactions fonctionnelles et pouvant intervenir dans le remodelage vasculaire.

Les modèles d'études qui ont été utilisés sont d'une part des cellules endothéliales et des cellules de muscle lisse issues d'explants de coronaires humaines et d'autre part des cellules de lignées HL60 différenciées en un modèle de neutrophiles.

Monsieur Bernard a notamment montré qu'une interaction entre les cellules HL60 et les cellules de muscle lisse entraîne une augmentation de production de métalloprotéinases (de type 9) par les cellules HL60, modulée par les espèces réactives de l'oxygène. Cette interaction HL60-cellules musculaires stimule également la mobilité des cellules HL60. Ces augmentations de la réponse sécrétoire et migratoire des cellules HL60 seraient sous la dépendance de cytokines, libérées par les cellules de muscle lisse, qui entretiennent par ailleurs le fond inflammatoire de l'athérosclérose.

La thèse est bien ordonnée et la rédaction de bonne qualité. Le travail est bien documenté et étayé par des références bibliographiques récentes.

Le travail de Monsieur Bernard qui a fait appel à des techniques de biochimie, de biologie moléculaire et de cytométrie est un parfait exemple d'un travail multidisciplinaire.

En conclusion, les travaux réunis dans cette thèse, par leur originalité, leur importance et leur qualités illustrées par deux publications internationales justifient sans aucun doute que Monsieur Yohann Bernard présente l'ensemble de ses résultats pour l'obtention du Doctorat d'Université Henri Poincaré de Nancy-I.

Jean-Pierre Gies

Faculté de Pharmacie  
74 route du Rhin  
BP 60024  
F-67401 ILLKIRCH Cedex,  
France

Tél. : (33) 03 90 24 41 40  
Fax : (33) 03 90 24 43 13

## RAPPORT D'EVALUATION DE LA THESE DE DOCTORAT DE YOHANN BERNARD

La thèse de Yohann BERNARD intitulée « Stress oxydatif, inflammation vasculaire et métalloprotéases : étude *in vitro* sur un modèle de coculture » aborde les effets du stress oxydatif et les effets d'interactions potentielles entre un modèle de neutrophiles ( $\neq$ HL60) et des cellules endothéliales (HCAEC) ou musculaires lisses (HCSMC) de coronaires humaines sur les métalloprotéases (MMPs) cellulaires et la mobilité des  $\neq$ HL60.

Le mémoire comprend dans sa première partie une introduction rappelant un certain nombre de généralités sur le rôle des polynucléaires neutrophiles dans l'inflammation, le lien entre athérosclérose et réponse inflammatoire et le rôle des métalloprotéases matricielles au cours de l'athérosclérose. Ces rappels clairement présentés sont utiles avant d'aborder la partie expérimentale du travail.

Yohann Bernard définit les objectifs de son travail expérimental en quatre points :

- 1) réaliser une étude préalable sur les capacités sécrétoires et migratoires d'un modèle de neutrophiles humains ;
- 2) caractériser les effets d'un stress oxydatif sur l'activité MMP2 et MMP9 de cellules vasculaires de coronaires humaines, endothéliales ou musculaires ;
- 3) déterminer l'existence d'interactions potentielles entre un modèle de neutrophiles humains et des cellules vasculaires humaines, en caractérisant la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 ainsi que la mobilité cellulaire,
- 4) préciser le rôle d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans ces interactions cellules-cellules et identifier certains médiateurs.

La partie « matériels et méthodes » de son travail comprend la description détaillée du matériel biologique utilisé et de tous les protocoles expérimentaux mis au point (traitement des cellules endothéliales et musculaires, études moléculaires, études biochimiques, études fonctionnelles). Il apparaît clairement que le candidat au cours de son travail expérimental s'est initié à de nombreuses techniques dans le but de vérifier ses hypothèses de travail.

Les résultats de ses travaux sont présentés sous la forme de deux publications. La première publication décrit l'effet d'un stress oxydatif sur les cellules vasculaires de coronaires humaines (cellules endothéliales et cellules musculaires). Le second article décrit les effets des cellules musculaires sur les HL60 non différenciés (coculture et activité MMP9 ; migration et invasion) et l'identification de médiateurs (analyse de certains gènes exprimés par les cellules musculaires en coculture, effet de la coculture et du fMLF sur l'expression de l'ARNm par les cellules musculaires, analyse des cytokines sécrétées par les cocultures).

La discussion des résultats porte sur les quatre points définis en tant qu'objectifs du travail.

- 1) Etude des capacités sécrétoires et migratoires d'un modèle de neutrophiles

Certaines caractéristiques sécrétoires et migratoires de la lignée promyélocytaire HL60 (cellules cancéreuses issues d'un patient atteint d'une leucémie aiguë promyélocytaire) ont été déterminées. La maturation de la lignée HL60 (en l'occurrence ici par le DMSO) permet l'acquisition de certaines propriétés morphologiques et fonctionnelles du polynucléaire neutrophile (PN). On obtient dans ce cas-ci une lignée désignée sous le vocable  $\neq$ HL60

exprimant effectivement un certain nombre de caractéristiques propres des PN. En culture, les lignées HL60 et  $\neq$ HL60 présentent d'importantes variations liées au passage cellulaire notamment en termes de production de MMP9 et de mobilité. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) diminue rapidement au fil des passages cellulaires. Les  $\neq$ HL60 au plus élevé des deux passages étudiés présentent une meilleure amplitude de réponse pour la sécrétion de MMP9 ainsi que pour l'invasion, et ont donc été utilisées pour l'étude de l'activation et de l'infiltration leucocytaire.

2) Effets d'un stress oxydatif et effets d'interactions entre un modèle de neutrophiles et des cellules vasculaires de coronaires humaines sur l'activité MMP2 et MMP9

L'effet des ERO sur l'activité MMP2 et MMP9 de cellules vasculaires de coronaires humaines a été étudié. Dans les protocoles expérimentaux utilisés, il n'a pas été possible d'observer une modification de l'activité enzymatique MMP2 et MMP9, contrairement à ce qui est décrit habituellement dans la littérature.

L'effet d'interactions entre  $\neq$ HL60 et cellules vasculaires de coronaires humaines (coculture) sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 a également été étudié. Les expériences de coculture destinées à étudier l'effet des ERO produites par les  $\neq$ HL60 sur les cellules vasculaires HCAEC (cellules endothéliales) ne montre pas de modification de l'activité enzymatique proMMP2 et pro MMP9. Par contre, la coculture HCSCMC (cellules musculaires) avec  $\neq$ HL60 entraîne une stimulation de la sécrétion de MMP9 et de l'activité de la proMMP9 des  $\neq$ HL60 par une voie qui ne requiert pas le contact cellulaire. La présence de HCSCMC à proximité des PN pourrait ainsi participer à la stimulation de la production de MMP9 et au développement des lésions au cours de l'athérosclérose ou à la fragilisation de la plaque athéromateuse.

L'effet modulateur des ERO sur la sécrétion et l'activité MMP2 et MMP9 a été étudié plus avant par l'utilisation d'enzymes antioxydantes. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, dans le cas des cocultures étudiées, l'utilisation d'enzymes antioxydantes stimule l'activité enzymatique proMMP9 du modèle de neutrophiles ( $\neq$ HL60).

3) Rôle des cellules musculaires lisses de coronaires humaines et des espèces réactives de l'oxygène sur la mobilité d'un modèle de neutrophiles

L'effet des cellules musculaires sur la mobilité des  $\neq$ HL60 (modèle de neutrophiles) a été étudié par des expériences de migration à travers une membrane poreuse en présence ou non de stimulus (peptide bactérien fMLF). La seule présence de HCSCMC permet d'augmenter la migration des  $\neq$ HL60 (sécrétion de médiateurs par les cellules musculaires). La proximité des HCSCMC lors de l'infiltration des PN pourrait stimuler l'invasion de ces derniers dans la paroi artérielle. Dans le modèle étudié, la présence de fMLF pourrait s'accompagner de la production de cytokines inflammatoires par les HCSCMC, entraînant la stimulation des capacités invasives des  $\neq$ HL60.

Une expérience complémentaire montre que la mobilité du modèle de neutrophiles vers les HCSCMC semble s'effectuer de façon indépendante des ERO.

4) Identification de certains médiateurs exprimés par les cellules musculaires lisses et impliqués dans les interactions avec un modèle de neutrophiles

Une analyse de certains gènes exprimés par les cellules musculaires HCSCMC en coculture avec  $\neq$ HL60 en comparaison avec une culture seule de cellules musculaires HCSCMC a montré des tendances à la hausse du gène TOLLIP et des tendances à la baisse des gènes CXCL1 et

CXCL2. Mais cela n'explique pas la stimulation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires observée.

L'IL8, connue pour jouer un rôle dans le développement des lésions d'athérosclérose, apparaît comme la chémokine la plus fortement exprimée par les HCSMC. L'interleukine 1 $\beta$  est également exprimée. Elle stimule la sécrétion de la protéine MMP9 et le recrutement des neutrophiles au foyer inflammatoire.

La concentration en IL8, IL1 $\beta$ , MCP-1/CCL2 et SDF1/CXCL12 dans une coculture  $\neq$ HL60/HCSMC et dans une culture seule de  $\neq$ HL60 et de HCSMC, en présence ou non de fMLF, a été mesurée. Il apparaît que, dans le modèle de coculture, IL8 et CCL2 sont fortement sécrétés comparativement à IL1 $\beta$  et CXCL12, en présence ou non de fMLF. Cette augmentation est plus forte dans le cas de la coculture  $\neq$ HL60/HCSMC que dans celui des cultures de  $\neq$ HL60 et de HCSMC seules, mais il s'agit d'un effet additif et non synergique. Ces deux cytokines, ainsi que l'IL6 également sécrétée, pourraient être impliquées dans la mobilité et la production de MMP9 du modèle de neutrophiles.

Le candidat résume dans la partie « Conclusion et perspectives » l'essentiel de ses résultats.

D'une part, les ERO ne modifient pas *in vitro* les activités enzymatiques des MMPs des cellules vasculaires endothéliales ou musculaires de coronaires humaines.

D'autre part, les cellules musculaires lisses de coronaires humaines stimulent la production de MMP9 et la mobilité des  $\neq$ HL60 (modèle de neutrophiles).

Par ailleurs, les enzymes antioxydantes (SOD et catalase) augmentent la production de MMP9 par les  $\neq$ HL60, semblent diminuer l'effet stimulant des HCSMC, et ont peu d'effets sur la mobilité du modèle de neutrophiles vers les cellules musculaires lisses de coronaires humaines.

Enfin, l'IL8, l'IL6 et le MCP-CCL2, connus pour être impliqués dans le recrutement et l'activation leucocytaire au cours de l'athérosclérose, sont exprimés par les HCSMC et/ou sécrétés dans le modèle de coculture  $\neq$ HL60/HCSMC.

Le candidat conclut en précisant que le modèle de coculture qu'il a étudié pourrait illustrer *in vitro* un exemple de communication entre cellules immunitaires et cellules vasculaires lors de l'inflammation de la paroi vasculaire au cours de l'athérosclérose. Il permet aussi d'évaluer *in vitro* l'impact de médiateurs sur certains aspects du développement du processus d'athérosclérose.

A la lecture de ce mémoire de thèse correctement illustré et bien organisé, il nous apparaît que le candidat a fourni un travail expérimental très important et que les résultats et conclusions qui s'en dégagent reposent sur une démarche scientifique parfaitement appropriée. Cet excellent mémoire mérite donc d'être défendu publiquement en vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université H. Poincaré de Nancy.

Fait à Liège le 8 septembre 2008



Bernard Pirotte  
Professeur à l'Université de Liège

